

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 672 622**

51 Int. Cl.:

**A61F 2/00** (2006.01)

**A61L 27/36** (2006.01)

**A61L 27/48** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.03.2011 PCT/US2011/029751**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.09.2011 WO11119804**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.03.2011 E 11715629 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.03.2018 EP 2550028**

54 Título: **Preparación de amazones tisulares regenerativos**

30 Prioridad:

**25.03.2010 US 317443 P**

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

**15.06.2018**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**OWENS, RICK, T.;  
SUN, WENDELL;  
LIU, MIKE y  
MAO, YONG**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

ES 2 672 622 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**

Preparación de armazones tisulares regenerativos

La presente descripción está relacionada con dispositivos para tratar defectos o lesiones en tejidos u órganos, incluidos armazones tisulares para tratar defectos en tejidos.

5 Actualmente en los procedimientos médicos y quirúrgicos se usan materiales humanos, animales y sintéticos para aumentar el tejido o reparar o corregir defectos de tejido. Para ciertos propósitos, se necesitan materiales con formas preformadas estables. Por ejemplo, para ciertos defectos óseos y defectos del tejido blando, se necesitan dispositivos estructurados tridimensionales estables que correspondan con el sitio del defecto y que permitan la regeneración del tejido con una estructura deseada. Sin embargo, los diversos dispositivos y métodos para reparar o  
10 corregir defectos de tejido u órgano han tenido ciertas desventajas.

Por consiguiente, existe la necesidad de dispositivos mejorados con mejor estabilidad para aplicaciones médicas.

En ciertas realizaciones, se proporciona un método para obtener un armazón tisular. El método comprende disolver un polímero en un disolvente para preparar una disolución; mezclar la disolución con una matriz tisular acelular (ATM, *acellular tissue matrix*) en forma de partículas para crear una mezcla; colocar la mezcla en un molde; secar la  
15 mezcla para formar un armazón tisular con una forma tridimensional estable, en donde el armazón tisular tiene una respuesta inmunológica o inflamatoria reducida cuando está implantado en un ser humano que el polímero solo.

En ciertas realizaciones, se proporciona un armazón tisular. El armazón tisular comprende una ATM en forma de partículas y un polímero, en donde la ATM se recubre con el polímero para formar un armazón tisular tridimensional estable para regeneración tisular, y en donde el armazón tisular tiene una respuesta inmunológica o inflamatoria reducida cuando se implanta en un ser humano que el polímero solo, particularmente en donde el polímero comprende un polímero sintético. La patente US 2007/0014729 describe un método para formar un implante tisular 3D, el método comprende criodesecar una matriz acelular y entonces rehidratarla con una disolución de polímero biocompatible antes de implantarlo.  
20

**Breve descripción de los dibujos**

25 La figura 1 ilustra la implantación de un armazón tisular en un defecto, según ciertas realizaciones.

La figura 2 es un diagrama de flujo que muestra un proceso para producir un armazón tisular, según ciertas realizaciones.

La figura 3 es una gráfica de datos de calorimetría diferencial de barrido (DSC) de una matriz dérmica acelular porcina (pADM) tratada con disolventes orgánicos, según el Ejemplo 2.

30 La figura 4 es una gráfica de datos de DSC de pADM en presencia de polímeros, según el Ejemplo 2.

La figura 5A es un explante subdérmico de cuatro semanas teñido con hematoxilina y eosina que comprende poli-4-hidroxitirato (P4HB) con amplificación x100, según el proceso descrito en el Ejemplo 2.

La figura 5B es un explante subdérmico de cuatro semanas teñido con hematoxilina y eosina que comprende pADM y P4HB con amplificación x100, según el proceso descrito en el Ejemplo 2.

35 La figura 5C es un explante subdérmico de cuatro semanas teñido con hematoxilina y eosina que comprende P4HB con amplificación x400, según el proceso descrito en el Ejemplo 2.

La figura 5D es un explante subdérmico de cuatro semanas teñido con hematoxilina y eosina que comprende pADM y P4HB con amplificación x400, según el proceso descrito en el Ejemplo 2.

40 La figura 6A es un explante subdérmico de doce semanas teñido con hematoxilina y eosina que comprende P4HB con amplificación x100, según el proceso descrito en el Ejemplo 2.

La figura 6B es un explante subdérmico de doce semanas teñido con hematoxilina y eosina que comprende pADM y P4HB con amplificación x100, según el proceso descrito en el Ejemplo 2.

La figura 6C es un explante subdérmico de doce semanas teñido con hematoxilina y eosina que comprende P4HB con amplificación x400, según el proceso descrito en el Ejemplo 2.

45 La figura 6D es un explante subdérmico de doce semanas teñido con hematoxilina y eosina que comprende pADM y P4HB con amplificación x400, según el proceso descrito en el Ejemplo 2.

La figura 7A es un explante subdérmico de cuatro semanas teñido con hematoxilina y eosina que comprende policaprolactona (PCL) con amplificación x100, según el proceso descrito en el Ejemplo 2.

La figura 7B es un explante subdérmico de cuatro semanas teñido con hematoxilina y eosina que comprende pADM y PCL con amplificación x100, según el proceso descrito en el Ejemplo 2.

La figura 7C es un explante subdérmico de cuatro semanas teñido con hematoxilina y eosina que comprende PCL con amplificación x400, según el proceso descrito en el Ejemplo 2.

- 5 La figura 7D es un explante subdérmico de cuatro semanas teñido con hematoxilina y eosina que comprende pADM y PCL con amplificación x400, según el proceso descrito en el Ejemplo 2.

La figura 8A es un explante subdérmico de doce semanas teñido con hematoxilina y eosina que comprende PCL con amplificación x100, según el proceso descrito en el Ejemplo 2.

- 10 La figura 8B es un explante subdérmico de doce semanas teñido con hematoxilina y eosina que comprende pADM y PCL con amplificación x100, según el proceso descrito en el Ejemplo 2.

La figura 8C es un explante subdérmico de doce semanas teñido con hematoxilina y eosina que comprende PCL con amplificación x400, según el proceso descrito en el Ejemplo 2.

La figura 8D es un explante subdérmico de doce semanas teñido con hematoxilina y eosina que comprende pADM y PCL con amplificación x400, según el proceso descrito en el Ejemplo 2.

- 15 La figura 9A es un explante subdérmico de cuatro semanas teñido con hematoxilina y eosina que comprende éster bencílico del ácido hialurónico (BHA) bajo amplificación x100, según el proceso descrito en el Ejemplo 2.

La figura 9B es un explante subdérmico de cuatro semanas teñido con hematoxilina y eosina que comprende pADM y BHA con amplificación x100, según el proceso descrito en el Ejemplo 2.

- 20 La figura 9C es un explante subdérmico de cuatro semanas teñido con hematoxilina y eosina que comprende BHA con amplificación x400, según el proceso descrito en el Ejemplo 2.

La figura 9D es un explante subdérmico de cuatro semanas teñido con hematoxilina y eosina que comprende pADM y BHA con amplificación x400, según el proceso descrito en el Ejemplo 2.

La figura 10A es un explante subdérmico de doce semanas teñido con hematoxilina y eosina que comprende BHA con amplificación x100, según el proceso descrito en el Ejemplo 2.

- 25 La figura 10B es un explante subdérmico de doce semanas teñido con hematoxilina y eosina que comprende explante de pADM y BHA con amplificación x100, según el proceso descrito en el Ejemplo 2.

La figura 10C es un explante subdérmico de doce semanas teñido con hematoxilina y eosina que comprende BHA con amplificación x400, según el proceso descrito en el Ejemplo 2.

- 30 La figura 10D es un explante subdérmico de doce semanas teñido con hematoxilina y eosina que comprende pADM y BHA con amplificación x400, según el proceso descrito en el Ejemplo 2.

La figura 11A es un explante de cuatro semanas teñido con hematoxilina y eosina que comprende quitosano y pADM bajo amplificación x100, según el proceso descrito en el Ejemplo 2.

La figura 11B es un explante de ocho semanas teñido con hematoxilina y eosina que comprende quitosano y pADM bajo amplificación x100, según el proceso descrito en el Ejemplo 2.

- 35 La figura 11C es un explante de cuatro semanas teñido con hematoxilina y eosina que comprende quitosano y pADM bajo amplificación x400, según el proceso descrito en el Ejemplo 2.

La figura 11D es un explante de ocho semanas teñido con hematoxilina y eosina que comprende quitosano y pADM bajo amplificación x400, según el proceso descrito en el Ejemplo 2.

#### **Descripción de realizaciones ilustrativas**

- 40 La expresión "matriz tisular acelular", como se emplea en esta memoria, se refiere generalmente a cualquier matriz tisular que esté sustancialmente libre de células y/o componentes celulares. Para crear matrices acelulares dentro del alcance de la presente descripción se puede usar piel, partes de la piel (p. ej., dermis) y otros tejidos tales como vasos sanguíneos, válvulas cardíacas, fascia, cartilago, hueso y tejido conjuntivo nervioso. Se pueden ensayar o
- 45 evaluar de varias maneras matrices tisulares acelulares para determinar si están sustancialmente libres de células y/o componentes celulares. Por ejemplo, con microscopía óptica se pueden inspeccionar tejidos procesados para determinar si quedan células (vivas o muertas) y/o componentes celulares. Adicionalmente, se pueden usar ciertos ensayos para identificar la presencia de células o componentes celulares. Por ejemplo, se pueden usar ensayos de ADN u otros de ácido nucleico para cuantificar los materiales nucleares que quedan dentro de las matrices tisulares. Generalmente, la ausencia de restos de ADN u otros ácidos nucleicos será indicativa de una descelerización
- 50 completa (es decir, retirada de células y/o componentes celulares). Finalmente, se pueden usar otros ensayos que

identifican componentes específicos de la célula (p. ej. antígenos de superficie) para determinar si las matrices tisulares son acelulares.

La presente descripción proporciona armazones tisulares tridimensionales para tratar defectos en tejidos u órganos. Los armazones tisulares incluyen una ATM que tiene la capacidad biológica para soportar la regeneración tisular. En algunas realizaciones, los armazones tisulares pueden soportar crecimiento interno y la diferenciación celulares. Por ejemplo, los armazones se pueden usar para el crecimiento interno tisular, cirugía ortopédica, aplicaciones periodontales, remodelado tisular, restauración tisular, cirugía plástica, cirugía cosmética, y la sustitución de tejido perdido, por ejemplo para lumpectomía, parotidectomía, o escisión de tumores, como se describe adicionalmente más adelante. En una realización, los armazones tisulares producen una respuesta tisular regenerativa, como lo demuestra la presencia de células semejantes a fibroblastos y vasos sanguíneos.

Adicionalmente, los armazones tisulares pueden incluir uno o más materiales poliméricos, como se describe adicionalmente más adelante. En ciertas realizaciones, los armazones tisulares de la presente descripción pueden aumentar la aceptación del componente polimérico por medio de la atenuación o reducción de la respuesta inmunológica o inflamatoria. Como se emplea en esta memoria, los componentes poliméricos incluyen polímeros sintéticos. En ciertas realizaciones, los materiales poliméricos en los armazones tisulares pueden proporcionar una estructura tridimensional estable para la ATM, lo que aumenta la integración y biocompatibilidad del implante. Como se emplea en esta memoria, se entenderá que la estructura tridimensional estable se refiere a un material que tiende a mantener una forma predeterminada (p. ej. formado para conformarse a un sitio de implante) cuando está en un estado de reposo.

En diversas realizaciones, se pueden usar los armazones tisulares de la presente descripción para el tratamiento en numerosos sitios anatómicos diferentes. Según diversas realizaciones, se pueden usar armazones tisulares en una amplia gama de aplicaciones. Ciertas aplicaciones ejemplares incluyen, pero no se limitan a, apósito absorbente, regeneración dérmica (por ejemplo, para tratamientos de todo tipo de úlceras y quemaduras), regeneración nerviosa, regeneración de cartílago, regeneración o reparación de tejido conjuntivo (por ejemplo, funda de tendón/ligamento), regeneración ósea, aplicaciones periodontales, revestimiento de herida/espuma, apósito de vendaje integrado, sustrato/base para injertos de piel, regeneración vascular, cirugía cosmética, recubrimiento de implante de metal y/o polímero (por ejemplo, para aumentar la integración y biocompatibilidad del implante), y sustitución de tejido perdido (p. ej., tras un traumatismo, reducción de mama, mastectomía, lumpectomía, parotidectomía, o escisión de tumores). En una realización, el uso de armazones tisulares comprende una matriz tisular acelular (ATM) en forma de partículas; y un polímero; en donde la ATM se recubre con el polímero para formar un armazón tisular tridimensional estable para regeneración tisular, y en donde el armazón tisular tiene una respuesta inmunológica o inflamatoria reducida cuando se implanta en un ser humano que el polímero solo, para uso en al menos uno de apósitos absorbentes, regeneración dérmica, regeneración nerviosa, regeneración de cartílago, regeneración o reparación de tejido conjuntivo, regeneración ósea, aplicaciones periodontales, recubrimiento de herida/espuma, apósitos de vendaje integrado, como sustrato o base para injertos de piel, regeneración vascular, cirugía cosmética, recubrimiento de implante de metal y/o polímero y sustitución de tejido perdido.

El armazón tisular obtiene una respuesta inmunológica o inflamatoria reducida cuando se implanta en un ser humano comparado con la del polímero o polímeros usados para producir el armazón solos. En algunas realizaciones, se puede ensayar el efecto del armazón tisular en el anfitrión usando varios métodos. En algunas realizaciones, se puede ensayar el efecto del armazón tisular en el anfitrión midiendo la respuesta inmunológica o inflamatoria al armazón implantado. En algunas realizaciones, la respuesta inmunológica o inflamatoria al armazón tisular se puede medir mediante varios métodos. En algunas realizaciones, se puede medir la respuesta inmunológica o inflamatoria usando métodos histológicos. Por ejemplo, se puede teñir el armazón explantado, y observar bajo microscopio para evaluación histológica, como se describe adicionalmente más adelante. En algunas realizaciones, se puede demostrar la respuesta inmunológica o inflamatoria al armazón midiendo el número de células inflamatorias (p. ej., leucocitos). En algunas realizaciones, se puede demostrar la respuesta inmunológica o inflamatoria atenuada al armazón mediante un reducido número de células inflamatorias, como se describe adicionalmente más adelante. Por ejemplo, se pueden medir células inflamatorias mediante métodos de tinción inmuno-histoquímica diseñados para identificar linfocitos, macrófagos y neutrófilos. También se pueden usar métodos inmuno-histoquímicos para determinar la presencia de citocinas inflamatorias, incluidas interleulina-1, TNF-alfa, y TGF-beta. En una realización, se proporciona el uso de ATM para reducir la respuesta inmunológica de un material polimérico cuando se implanta en el cuerpo. El tejido polimérico puede incluir polímeros sintéticos o que ocurren de manera natural.

En una realización, se proporciona un armazón tisular que produce una respuesta tisular regenerativa. El armazón puede incluir una matriz tisular acelular (ATM) en forma de partículas; y un polímero; en donde la ATM se recubre con el polímero para formar un armazón tisular tridimensional estable para regeneración tisular, y en donde el armazón tisular tiene una respuesta inmunológica o inflamatoria reducida cuando se implanta en un ser humano que el polímero solo. La respuesta tisular regenerativa se demuestra por la presencia de células semejantes a fibroblastos y vasos sanguíneos.

En diversas realizaciones, se pueden usar armazones tisulares de la presente descripción para tratar cualquiera de una amplia variedad de trastornos. A partir de diversas afecciones médicas, incluidas, por ejemplo, malformaciones congénitas, lesiones traumáticas, infecciones, y resecciones oncológicas pueden surgir defectos tisulares. Así, los armazones tisulares se pueden usar para reparar defectos en cualquier tejido blando, p. ej., tejidos que conectan, soportan o rodean otras estructuras y órganos del cuerpo. Los armazones tisulares también se pueden usar para tratar defectos óseos, p. ej., como injerto articular para soportar regeneración de cartílago. El tejido blando puede ser cualquier tejido no óseo.

Los armazones tisulares se pueden usar para tratar los tejidos blandos en muchos sistemas de órganos diferentes. Estos sistemas de órganos pueden incluir, aunque sin quedar limitados a ellos, el sistema muscular, el sistema genitourinario, el sistema gastrointestinal, el sistema integumentario, el sistema circulatorio y el sistema respiratorio. Los armazones tisulares también son útiles para tratar tejido conjuntivo, incluida la fascia, una capa especializada que rodea los músculos, huesos y articulaciones, del pecho y de la pared abdominal y para la reparación y refuerzo de debilidad tisular en anatomía urológica, ginecológica y gastroenterológica.

En otra realización, el defecto de tejido u órgano se selecciona del grupo que consiste en piel, hueso, cartílago, menisco, dermis, miocardio, periostio, arteria, vena, estómago, intestino delgado, intestino grueso, diafragma, tendón, ligamento, tejido neural, músculo estriado, músculo liso, vejiga, uretra, uréter y gingival. En una realización, el uso de armazones tisulares comprende una matriz tisular acelular (ATM) en forma de partículas; y un polímero; en donde la ATM se recubre con el polímero para formar un armazón tisular tridimensional estable para la regeneración tisular, y en donde el armazón tisular tiene una respuesta inmunológica o inflamatoria reducida cuando se implanta en un humano que el polímero solo, para uso en la regeneración, reparación, y/o sustitución de un defecto en al menos uno de piel, hueso, cartílago, menisco, dermis, miocardio, periostio, arteria, vena, estómago, intestino delgado, intestino grueso, diafragma, tendón, ligamento, tejido neural, músculo estriado, músculo liso, vejiga, uretra, uréter, y gingival.

Por ejemplo, la figura 1 ilustra la implantación de un armazón tisular en un defecto de cartílago, según ciertas realizaciones. Como se muestra, se puede usar un armazón tisular 180 para tratar un defecto de cartílago en un hueso largo 500 (p. ej., fémur o húmero). En diversas realizaciones, se puede usar un armazón 180 para tratar una superficie articular o cartílago 510 de cualquier articulación. En diversas realizaciones, el armazón tisular 180 se puede colocar en un defecto o área escindida de una superficie articular o cartílago 510.

Como se señala, el armazón tisular 180 comprende una ATM y un polímero. En algunas realizaciones, la ATM comprende tejidos de dos fuentes de tejido diferentes, por ejemplo, cartílago 190, y hueso desmineralizado 200. En algunas realizaciones, el armazón tisular 180 se puede usar para reparar defectos de otro tejido u órgano. En algunas realizaciones, el armazón tisular 180 puede comprender dermis y cartílago. En algunas realizaciones, el armazón tisular comprende cartílago 190 sin hueso desmineralizado 200. En algunas realizaciones, el armazón tisular 180 puede comprender hueso desmineralizado 200 sin cartílago 190. En algunas realizaciones, el armazón tisular 180 puede comprender dermis.

En ciertas realizaciones, un método para obtener un armazón tisular comprende disolver un polímero en una disolución; mezclar la disolución con una ATM en forma de partículas para formar una mezcla; y moldear y dar forma al armazón tisular a una estructura tridimensional estable eliminando el disolvente.

La figura 2 ilustra la preparación de un armazón tisular tridimensional. Los armazones pueden incluir una ATM (etapa 100). En algunas realizaciones, la ATM se puede derivar de, por ejemplo, dermis, cartílago, hueso, hueso desmineralizado, vasos sanguíneos, válvulas cardiacas, fascia o tejido conjuntivo nervioso. En algunas realizaciones, la ATM en forma de partículas comprende partículas de tamaño uniforme. En algunas realizaciones, la ATM en forma de partículas comprende una ATM dérmica. En algunas realizaciones, la ATM dérmica es una matriz de tejido humano. En algunas realizaciones, la ATM dérmica es una matriz de tejido porcino. En algunas realizaciones, la ATM en forma de partículas es una matriz de tejido de cartílago, que puede ser derivada de cartílago humano. En algunas realizaciones, la matriz de tejido de cartílago se deriva de cartílago porcino. En algunas realizaciones, la ATM en forma de partículas comprende una matriz de tejido óseo. En algunas realizaciones, la matriz de tejido óseo se deriva de hueso humano. En algunas realizaciones, la matriz de tejido óseo se deriva de hueso porcino.

La ATM se puede seleccionar para proporcionar una variedad de diferentes propiedades biológicas y mecánicas. Por ejemplo, la ATM se puede seleccionar para permitir el crecimiento interno y remodelado de tejido para permitir la regeneración de tejido que normalmente se encuentra en el sitio donde se implanta la matriz. Por ejemplo, la ATM, cuando se implanta sobre o dentro de cartílago, se puede seleccionar para permitir la regeneración del cartílago sin excesiva formación de fibrosis o cicatriz. Además, la ATM no debe producir excesiva reacción inflamatoria, y en última instancia debe ser remodelada para producir un tejido similar al tejido anfitrión original. En algunas realizaciones, la ATM comprende colágeno, elastina, y canales vasculares. En ciertas realizaciones, la ATM puede incluir ALLODERM® o Stratice™, que son matrices dérmicas acelulares humana y porcina, respectivamente. Ejemplos de tales materiales se pueden encontrar en las patentes de EE. UU. nos 6.933.326 y 7.358.284. Como alternativa, se pueden usar otras matrices tisulares acelulares adecuadas, como se describe adicionalmente más adelante.

Se puede preparar una ATM en forma de partículas mediante molienda criogénica (*cryomilling*) de ATM (etapa 110). La ATM en forma de partículas se puede derivar de muchas fuentes de tejido diferentes. Las fuentes de tejido pueden ser, por ejemplo, dermis, cartílago, vasos sanguíneos óseos, válvulas cardíacas, fascia y tejido conjuntivo nervioso. Estos se describen en detalle más adelante. En algunas realizaciones, para preparar una ATM en forma de partículas se pueden usar dos o más tipos diferentes de tejidos.

Adicionalmente, los armazones tisulares pueden incluir uno o más materiales poliméricos. En algunas realizaciones, los materiales poliméricos se pueden seleccionar de varios polímeros. En ciertas realizaciones, los polímeros se pueden seleccionar, por ejemplo, de quitosano, éster bencílico del ácido hialurónico (BHA), policaprolactona (PCL), o poli-4-hidroxibutirato (P4HB). En algunas realizaciones, el polímero se puede disolver en un disolvente adecuado seleccionado de varios disolventes (etapa 120). En algunas realizaciones, el disolvente se puede seleccionar, por ejemplo, de dioxano, N-metil-2-pirrolidona (NMP), DMSO, o ácido acético. En una realización, la PCL se disuelve en dioxano. En otra realización, la PCL en dioxano o disolvente NMP usado en la preparación del armazón tisular puede ser aproximadamente del 5-30 % (peso/volumen). En una realización adicional, la PCL en dioxano o disolvente NMP usado en la preparación del armazón tisular puede ser el 5 %, 8 %, 10 %, 12 %, 15 %, 18 %, 20 %, 25 %, o 30 % (peso/volumen), 5 % al 30 % (peso/volumen), 10 % al 30 % (peso/volumen) y cualquier valor intermedio. En otra realización, el P4HB se disuelve en dioxano o NMP. En incluso otra realización, el P4HB en dioxano o disolvente NMP usado en la preparación del armazón tisular puede ser aproximadamente el 5-40 % (peso/volumen). En una realización adicional, el P4HB en dioxano o disolvente NMP usado en la preparación del armazón tisular puede ser el 5 %, 8 %, 10 %, 12 %, 15 %, 18 %, 20 %, 25 %, 30 % o 40 % (peso/volumen), o del 5 % al 40 % (peso/volumen), 10 % al 30 % (peso/volumen) y cualquier valor intermedio. En otra realización, el BHA se disuelve en DMSO. En incluso otra realización, el BHA en DMSO usado en la preparación del armazón tisular puede ser aproximadamente el 5-50 % (peso/volumen). En una realización adicional, el BHA en DMSO usado en la preparación del armazón tisular puede ser el 5 %, 8 %, 10 %, 12 %, 15 %, 18 %, 20 %, 25 %, 30 %, 40 %, o 50 % (peso/volumen), 5 % al 50 % (peso/volumen), o 10 % al 40 % (peso/volumen), y cualquier valor intermedio. En incluso otra realización, el quitosano se disuelve en ácido acético. En una realización adicional, la concentración de ácido acético es 0,1-0,5 M (intervalo de pH 2,53-2,88). En una realización adicional, el pH de la mezcla de quitosano y ácido acético puede ser 4,0-5,5. En incluso otra realización, el quitosano en ácido acético usado en la preparación del armazón tisular puede ser el 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, o 5 % (peso/volumen), y cualquier valor intermedio. Cada uno de estos materiales del armazón puede impartir propiedades diferentes al producto final que permiten las manipulaciones de remodelado/persistencia *in vivo*, propiedades biomecánicas, y respuesta biológica global.

La disolución de polímero se puede mezclar con la ATM en forma de partículas (etapa 130). Las mezclas de ATM y polímero/disolvente se colocan o empaquetan entonces en moldes u otros recipientes para producir la forma tridimensional deseada (etapa 140). En algunas realizaciones, se pueden seleccionar moldes de varios moldes. En algunas realizaciones, los moldes se pueden seleccionar de tubo eppendorf, tubo de metal, tubo de inyección, o un molde con la forma del defecto de tejido u órgano para cuya reparación se diseña el armazón tisular.

El disolvente se puede retirar a través de un proceso de secado (etapa 150). En algunas realizaciones, el disolvente se puede retirar a través de varios procesos de secado. En algunas realizaciones, los procesos de secado se pueden seleccionar de criodesecar, secado al aire, secado por calentamiento, secado en una atmósfera de argón o nitrógeno, o secado ayudado por vacío. Los armazones tisulares resultantes consisten en partículas tisulares regenerativas recubiertas por un armazón de soporte polimérico/sintético y son estables bajo esfuerzo mecánico. Adicionalmente, el proceso de secado puede incluir un secado pasivo, en donde el disolvente se evapora a una atmósfera normal.

En ciertas realizaciones, la forma y estabilidad del armazón tisular son importantes. En algunas realizaciones, la forma y el tamaño deseados o realizados del armazón tisular resultante son determinados por la forma y el tamaño de un molde usado para producir el armazón. En algunas realizaciones, la forma deseada o realizada del armazón tisular es una forma tridimensional estable. En algunas realizaciones, el molde usado para preparar el armazón tisular tridimensional estable puede ser un tubo eppendorf, un tubo de metal, un tubo de inyección o un molde en forma de defecto del tejido u órgano en el que será implantado el armazón tisular. En algunas realizaciones, el armazón tisular es en forma cilíndrica. En algunas realizaciones, el armazón tisular es en forma tubular. En algunas realizaciones, la forma del armazón tisular corresponde a la forma del defecto o lesiones del tejido u órgano. En algunas realizaciones, la resistencia mecánica, porosidad, hidratación y conductancia de fluido son controladas controlando la velocidad de congelación, la temperatura de congelación y la composición del recipiente de moldeo.

En algunas realizaciones, el armazón tisular se hace de un tamaño o con una forma de manera que pueda corresponder a la forma del defecto de tejido u órgano. En algunas realizaciones, el armazón tisular se puede preparar usando dos o más tipos diferentes de tejidos. Por ejemplo, uno de los tejidos en el armazón tisular puede ser cartílago y el segundo tejido puede ser hueso desmineralizado. En algunas realizaciones, se puede usar armazón de cartílago/hueso desmineralizado para reparar defectos osteocondrales (figura 1).

### Matrices tisulares acelulares

La expresión "matriz tisular acelular" como se emplea en esta memoria, se refiere generalmente a cualquier matriz tisular que esté sustancialmente libre de células y/o componentes celulares. Para crear matrices acelulares dentro

del alcance de la presente descripción se puede usar piel, partes de la piel (p. ej., dermis) y otros tejidos tales como vasos sanguíneos, válvulas cardíacas, fascia, cartílago, hueso y tejido conjuntivo nervioso. Se pueden ensayar y evaluar de varias maneras matrices tisulares acelulares para determinar si están sustancialmente libres de células y/o componentes celulares. Por ejemplo, con microscopía óptica se pueden inspeccionar tejidos procesados para determinar si quedan células (vivas o muertas) y/o componentes celulares. Adicionalmente, se puede usar cierto análisis para identificar la presencia de células o componentes celulares. Por ejemplo, se puede usar análisis de ADN u otros de ácido nucleico para cuantificar los materiales nucleares que quedan dentro de las matrices tisulares. Generalmente, la ausencia de restos de ADN u otros ácidos nucleicos será indicativa de descelularización completa (es decir, retirada de células y/o componentes celulares). Finalmente, se pueden usar otros análisis que identifican componentes específicos de las células (p. ej., antígenos de superficie) para determinar si las matrices tisulares son acelulares. Para crear matrices acelulares dentro del alcance de la presente descripción se puede usar piel, partes de la piel (p. ej., dermis) y otros tejidos tales como vasos sanguíneos, válvulas cardíacas, fascia, cartílago, hueso y tejido conjuntivo nervioso.

En general, las etapas implicadas en la producción de una ATM incluyen recolectar el tejido de un donante (p. ej., un cadáver humano o de origen animal) y la extracción de células bajo condiciones que conserven la función biológica y estructural. Por ejemplo, las funciones biológicas y estructurales deseadas incluyen la capacidad para soportar el crecimiento interno celular y la regeneración tisular, proporcionar soporte mecánico (p. ej., a un sitio quirúrgico o defecto), para impedir una excesiva respuesta inmunológica, inflamación, fibrosis y/o cicatrización. En ciertas realizaciones, el proceso incluye un tratamiento químico para estabilizar el tejido y evitar la degradación bioquímica y estructural junto o antes de la retirada de células. En diversas realizaciones, la disolución de estabilización detiene e impide la degradación osmótica, hipóxica, autolítica y proteolítica, protege frente a la contaminación microbiana, y reduce el daño mecánico que puede ocurrir con tejidos que contienen, por ejemplo, componentes de músculo liso (p. ej., vasos sanguíneos). La disolución de estabilización puede contener un tampón apropiado, uno o más antioxidantes, uno o más agentes oncóticos, uno o más antibióticos, uno o más inhibidores de proteasa, y/o uno o más relajantes del músculo liso.

El tejido es colocado entonces en una disolución de descelularización para retirar las células viables (p. ej., células epiteliales, células endoteliales, células de músculo liso y fibroblastos) de la matriz estructural sin dañar la integridad biológica y estructural de la matriz de colágeno. La integridad de la matriz de colágeno se puede ensayar de varias maneras. Por ejemplo, se puede usar calorimetría diferencial de barrido para identificar cambios en la temperatura de transición térmica que indican una reticulación (elevación en la temperatura de transición) o degradación de colágeno (disminución en las temperaturas de transición). Adicionalmente, la microscopía electrónica puede mostrar cambios en los patrones normales de colágeno, y los análisis de digestión enzimática pueden mostrar daño de colágeno. Además, la pérdida de diversos glicosaminoglicanos (p. ej., sulfato de condroitina y ácido hialurónico) puede indicar un cambio no deseado en la matriz tisular.

La disolución de descelularización puede contener un tampón apropiado, sal, un antibiótico, uno o más detergentes (p. ej., TRITON X-100™, deoxicolato de sodio, polioxietileno (20) mono-oleato de sorbitan), uno o más agentes para impedir la reticulación, uno o más inhibidores de proteasa, y/o una o más enzimas. Se describen métodos adecuados para producir ATM, por ejemplo, en H. Xu et al., A Porcine-Derived Acellular Dermal Scaffold That Supports Soft Tissue Regeneration: Removal of Terminal Galactose- $\alpha$ -(1,3)-Galactose and Retention of Matrix Structure. *Ing. Tisular. Parte A 15: 1807 (2009)*.

Tras el proceso de descelularización, la muestra de tejido se lava minuciosamente con solución salina. En algunas realizaciones ilustrativas, p. ej., cuando se usa material xenogénico, el tejido descelularizado es tratado entonces por la noche a temperatura ambiente con una disolución de desoxirribonucleasa (DNase). En algunas realizaciones, la muestra de tejido es tratada con una solución DNase preparada en tampón DNase (20 mM HEPES (ácido 4-(2-hidroxi-etil)-1-piperacinetano sulfónico), 20 mM CaCl<sub>2</sub> y 20 mM MgCl<sub>2</sub>). Opcionalmente, a la disolución de DNase se puede añadir una disolución antibiótica (p. ej., Gentamicina). Se puede usar cualquier tampón adecuado siempre que el tampón proporcione adecuada actividad de DNase.

Si bien una ATM se puede obtener de uno o más individuos de la misma especie que el receptor del armazón tisular, este no es necesariamente el caso. Así, por ejemplo, se puede obtener una ATM en el armazón tisular de tejido porcino. Las especies que pueden servir como receptores de ATM y donantes de tejidos u órganos para la producción de la ATM incluyen, sin limitación, mamíferos, tales como seres humanos, primates no humanos (p. ej., monos, babuinos o chimpancés), cerdos, vacas, caballos, cabras, ovejas, perros, gatos, conejos, cobayas, jerbos, hámsteres, ratas o ratones.

La eliminación de los epítomos  $\alpha$ -gal del material que contiene colágeno puede disminuir la respuesta inmune frente al material que contiene colágeno. El epítomo  $\alpha$ -gal se expresa en mamíferos no primates y en monos del Nuevo Mundo (monos de Sudamérica) en macromoléculas tales como las glicoproteínas de los componentes extracelulares. U. Galili et al., *J. Biol. Chem.* 263: 17755 (1988). Sin embargo, este epítomo está ausente en primates del Viejo Mundo (monos de Asia y África y simios) y seres humanos. Se producen anticuerpos Anti-gal en seres humanos y primates como resultado de una respuesta inmune a estructuras de carbohidratos del epítomo  $\alpha$ -gal en bacterias gastrointestinales. U. Galili et al., *Infect. Immun.* 56: 1730 (1988); R. M. Hamadeh et al., *J. Clin. Invest.* 89: 1223 (1992).

Como los mamíferos no primates (p. ej. cerdos) producen epítomos  $\alpha$ -gal, el xenotrasplante de material que contiene colágeno desde estos mamíferos a los primates a menudo tiene como resultado el rechazo porque el anti-Gal de primate se une a estos epítomos sobre el material que contiene colágeno. La unión da como resultado la destrucción del material que contiene colágeno por la fijación complementaria y por la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos. U. Galili et al., *Immunology Today* 14: 480 (1993); M. Sandrin et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 11391 (1993); H. Good et al., *Transplant. Proc.* 24: 559 (1992); B. H. Collins et al., *J. Immunol.* 154: 5500 (1995). Además, el xenotrasplante da como resultado una importante activación del sistema inmune para producir mayores cantidades de anticuerpos anti-gal de alta afinidad. Por consiguiente, en algunas realizaciones, cuando como fuente de tejido se usan animales que producen epítomos  $\alpha$ -gal, la sustancial eliminación de epítomos  $\alpha$ -gal de las células y de los componentes extracelulares del material que contiene colágeno, y la prevención de la reexpresión de epítomos  $\alpha$ -gal celulares pueden disminuir la respuesta inmune contra el material que contiene colágeno asociado con anticuerpo anti-gal que se une a los epítomos  $\alpha$ -gal.

Para eliminar los epítomos  $\alpha$ -gal, después de lavar el tejido minuciosamente con disolución salina para eliminar la disolución de DNase, la muestra de tejido se puede someter a uno o más tratamientos enzimáticos para retirar ciertos antígenos inmunógenos, si están presentes en la muestra. En una realización, la muestra de tejido puede ser tratada con una enzima  $\alpha$ -galactosidasa para eliminar epítomos  $\alpha$ -gal si están presentes en el tejido. En algunas realizaciones, la muestra de tejido es tratada con  $\alpha$ -galactosidasa a una concentración de 300 U/L preparada en 100 mM de tampón de fosfato con pH 6,0. En otras realizaciones, la concentración de  $\alpha$ -galactosidasa se aumenta a 400 U/L para una eliminación adecuada de los epítomos  $\alpha$ -gal del tejido extirpado. Se puede usar cualquier concentración adecuada de enzima y tampón, siempre que se logre una eliminación de antígenos suficiente.

Como alternativa, en lugar de tratar el tejido con enzimas, como fuente de tejido se pueden seleccionar animales que hayan sido genéticamente modificados para que carezcan de uno o más epítomos antigénicos. Por ejemplo, como fuente de tejido se pueden seleccionar animales (p. ej. cerdos) que hayan sido diseñados genéticamente para que carezcan de la fracción terminal  $\alpha$ -galactosa. Para descripciones de animales apropiados, véase la solicitud de EE. UU. en tramitación con la presente, n.º de serie 10/896.594, y la patente de EE. UU. n.º 6.166.288. Además, en el documento de Xu, Hui. et al., "A Porcine-Derived Acellular Dermal Scaffold that Supports Soft Tissue Regeneration: Removal of Terminal Galactose- $\alpha$ -(1,3)-Galactose and Retention of Matrix Structure", *Tissue Engineering*, Vol. 15, 1-13 (2009) se describen ciertos métodos ejemplares para procesar tejidos para producir matrices acelulares con o sin cantidades reducidas o carencia de fracciones de alfa-1,3-galactosa.

Después de formarse la ATM, en la ATM se pueden sembrar opcionalmente células viables histocompatibles para producir un injerto que pueda ser remodelado además por el anfitrión. En algunas realizaciones, a las matrices se pueden añadir células viables histocompatibles por técnicas estándar de cultivo simultáneo celular *in vitro* antes del trasplante, o por repoblación *in vivo* tras el trasplante. La repoblación *in vivo* puede ser mediante las propias células del receptor que migran a la ATM o mediante infusión o inyección de células obtenidas del receptor o células histocompatibles de otro donante a la ATM *in situ*. Se pueden usar diversos tipos de célula, incluidas células madre embrionarias, células madre de adulto (p. ej., células madre mesenquimales), y/o células neuronales. En diversas realizaciones, las células se pueden aplicar directamente a la parte interior de la ATM justo antes o después de la implantación. En ciertas realizaciones, las células se pueden colocar dentro de la ATM que va a ser implantada, y cultivada antes de la implantación. En una realización, se añaden células viables al armazón tisular antes de la implantación. En una realización, se añaden células viables al armazón tisular después de que el armazón sea implantado en un sitio anatómico deseado.

#### **Matriz acelular tisular en forma de partículas**

Se puede usar el siguiente procedimiento para producir matrices tisulares acelulares en forma de partículas usando ALLODERM®, STRATTICE™ LifeCell Corporation, Branchburg, NJ, u otras matrices tisulares acelulares adecuadas. Tras la extracción del paquete, la ATM se corta en tiras usando un reticulador Zimmer con rueda de corte "continua" sin interrupción. Las tiras largas resultantes de ATM se cortan en longitudes de aproximadamente 1 a aproximadamente 2 centímetros de longitud.

Un homogeneizador y una sonda esterilizada de homogeneizador, tal como un homogeneizador LabTeck Macro disponible de OMNI International, Warrenton Va., se ensamblan y se enfrían a temperaturas criogénicas usando nitrógeno líquido estéril que se vierte en la torre del homogeneizador. Una vez el homogeneizador ha alcanzado temperaturas criogénicas, la ATM previamente preparada en tiras como se ha señalado anteriormente se añade a la torre de homogeneización que contiene nitrógeno líquido estéril. El homogeneizador es activado entonces para fracturar criogénicamente las tiras de ATM. El tiempo y la duración de la etapa de fraccionamiento criogénico dependerá del homogeneizador utilizado, el tamaño de la cámara de homogeneización, la velocidad y el tiempo con los que funcione el homogeneizador y deben poder ser determinados por un experto en la técnica por simple variación de los parámetros para lograr los resultados deseados.

El material de la ATM en forma de partículas crio fracturada se clasifica por tamaño de partícula lavando el producto del homogeneizador con nitrógeno líquido mediante una serie de cribas de metal que también han sido enfriadas a temperaturas de nitrógeno líquido. Se ha encontrado especialmente útil utilizar una combinación de cribas dentro de

la torre de homogeneización del tipo descrito anteriormente en las que las partículas se lavan y clasifican primero para excluir las partículas de tamaño excesivo y después para excluir las partículas de tamaño demasiado pequeño.

Una vez aislada, la ATM en forma de partículas se retira y coloca en un vial para criodesecar una vez se ha evaporado el nitrógeno líquido estéril. Esta última etapa es para asegurar que se retira cualquier humedad residual que haya podido ser absorbida durante el procedimiento anterior.

El producto final puede ser un polvo que tiene un tamaño de partícula de aproximadamente 1 micrómetro a aproximadamente 900 micrómetros o un tamaño de partícula de aproximadamente 30 micrómetros a aproximadamente 750 micrómetros. Las partículas se distribuyen en torno a una media de aproximadamente 150-300 micrómetros. El material es fácilmente rehidratado por suspensión en solución salina normal u otro agente rehidratador adecuado similar. La ATM rehidratada puede ser suspendida de nuevo en solución salina normal o cualquier otro portador adecuado farmacéuticamente compatible.

Los siguientes ejemplos se proporcionan para explicar mejor las diversas realizaciones y no se deben interpretar de ninguna manera que limite el alcance de la presente descripción.

### Ejemplos

#### 15 Ejemplo 1. Preparación del almacén tisular regenerativo

La figura 2 ilustra un proceso de preparación de un almacén tisular regenerativo de ATM sintética. Se crearon armazones tisulares regenerativos tridimensionales a partir de ATM en forma de partículas usando materiales de almacén poliméricos. Se preparó la ATM a partir de tejido dérmico porcino y se criodesecó. La ATM seca se cortó en pedazos de  $\sim 1 \text{ cm}^2$  y se colocó en un vial de molienda criogénica de tamaño apropiado. Luego se colocó el vial en un molinillo de congelador SPEX 6800 que había sido preenfriado con nitrógeno líquido y sometido al protocolo de fractura criogénica. La ATM en forma de partículas fue retirada entonces del vial y se mantuvo bajo condiciones de almacenamiento en seco.

Un derivado de éster bencílico del ácido hialurónico al 100 % se solubilizó en sulfóxido de dimetilo (DMSO) con una concentración del 40 % (peso/volumen). Un ml de esta solución se mezcló entonces con 300 mg de matriz dérmica acelular en forma de partículas, como la preparada antes, y la mezcla fue transferida a un pequeño tubo eppendorf de 2 ml. La DMSO se retiró entonces con un proceso de criodesecado dejando un almacén tisular (40 % éster bencílico del ácido hialurónico, 60 % matriz dérmica acelular en peso) que retuvo la forma del tubo eppendorf (cilíndrica) en que se secó (etapa 150).

#### Ejemplo 2. Estudio funcional del almacén tisular

#### 30 Análisis calorímetro del efecto de disolventes orgánicos en la integridad de la matriz tisular

Los resultados *in vivo* sugirieron que la presencia de la matriz tisular regenerativa atenúa la respuesta inmunológica o inflamatoria al material del almacén como demuestra un número reducido de células inflamatorias.

Se trataron pADM, preparados como se describe en el Ejemplo 1, con un exceso de diferentes disolventes, incluidos dioxano, NMP, y DMSO, durante 2 h. Los materiales tratados fueron evaluados con calorímetro diferencial de barrido (DSC) para valorar la integridad de la matriz tisular. La figura 3 es una gráfica de datos de DSC de matriz dérmica acelular porcina (pADM) tratada con disolventes orgánicos.

De manera similar, se trataron pADM con diferentes polímeros, por ejemplo, poli-4-hidroxibutirato en dioxano o NMP y policaprolactona en dioxano o NMP, y se evaluó la integridad de la matriz tisular mediante DSC. La figura 4 es una gráfica de datos de DSC de pADM en presencia de polímeros, según el Ejemplo 2. El análisis DSC (figura 4) mostró que los termogramas de polímero y pADM eran aditivos.

### Evaluación histológica

Se ensayó el efecto de la implantación de pADM en presencia de poli-4-hidroxibutirato (P4HB) en un modelo de rata subdérmico inmuno-competente. A ratas inmuno-competentes se les implantó almacén tisular de pADM/P4HB o almacén de polímero de P4HB. Este modelo permitió la determinación de respuestas celulares e inmunológicas a los materiales de ensayo implantados. Se implantaron materiales de ensayo en posición subdérmica a través de una pequeña incisión en la superficie dorsal de ratas inmuno-competentes (*Rattus norvegicus*; Rata Lewis). Cuatro semanas (figuras 5A-D) y 12 semanas (figuras 6A-D) tras la implantación, se recogieron explantes y se lavaron con PBS y se fijaron en formalina al 10 %. Se embebió tejido fijado en parafina y se tiñeron secciones de las muestras de matriz tisular con hematoxilina y eosina (H y E) usando procedimientos estándar. D.C. Sheehan y B.B. Hrapchak, Theory and Practice de Histotechnology, 2ª edición, Columbus, OH, Battelle Press (1987). Entonces se observaron las muestras bajo microscopio a amplificación x100 (figuras 5A-B y 6A-B) y amplificación x400 (figuras 5C-D y 6C-D). Los análisis histológicos de los explantes (figuras 5A-D y 6A-D) mostraron que P4HB en presencia de pADM tenía una respuesta inflamatoria atenuada comparada con explantes de P4HB solo.

- 5 Las figuras 7A-D y 8A-D muestran la evaluación histológica de explantes de policaprolactona de 4 y 12 semanas. El efecto de la implantación de pADM se ensayó en presencia de policaprolactona (PCL) en un modelo de rata inmuno-competente subdérmico. A ratas inmuno-competentes se les implantó un armazón de pADM/PCL o un armazón de polímero PCL. Cuatro (figuras 7A-D) y 12 semanas (figuras 8A-D) tras la implantación, se recogieron explantes y se procesaron para evaluación histológica, como se ha descrito anteriormente. Entonces se observaron las muestras bajo microscopio a amplificación x100 (figuras 7A-B y 8A-B) y amplificación x400 (figuras 7C-D y 8C-D). El análisis histológico de los explantes (figuras 7A-D y 8A-D) mostraron que PCL en presencia de pADM tenía una respuesta inflamatoria atenuada comparada con explantes de PCL solo.
- 10 Las figuras 9A-D y 10A-D muestran la evaluación histológica de explantes del éster benzílico del ácido hialurónico (BHA) de 4 y 12 semanas. El efecto de la implantación de pADM se ensayó en presencia de BHA en un modelo de rata inmuno-competente subdérmico. A las ratas inmuno-competentes se les implantó un armazón de pADM/BHA o un armazón de polímero BHA. Cuatro (figuras 9A-D) y 12 semanas (figuras 10A-D) tras la implantación, se recogieron explantes y se procesaron para evaluación histológica, como se ha descrito anteriormente. Entonces se observaron las muestras bajo microscopio a amplificación x100 (figuras 9A-B y 10A-B) y amplificación x400 (figuras 9C-D y 10C-D). Los análisis histológicos de los explantes (figuras 9A-D y 10A-D) mostraron que BHA en presencia de pADM tenía una respuesta inflamatoria atenuada comparada con explantes de BHA solo.
- 15 Las figuras 11A-D muestran la evaluación histológica de explantes de quitosano/pADM de 4 y 8 semanas. El efecto de la implantación de pADM se ensayó en presencia de quitosano en un modelo de rata inmuno-competente subdérmico. A las ratas inmuno-competentes se les implantó un armazón de pADM/quitosano. Cuatro (figuras 11A, C) y 8 semanas (figuras 11B, D) tras la implantación, se recogieron explantes y se procesaron para la evaluación histológica, como se ha descrito anteriormente. Entonces se observaron las muestras bajo microscopio a amplificación x100 (figuras 11A-B) y amplificación x400 (figuras 11C-D). Los resultados mostraron que hubo una respuesta tisular regenerativa, como lo demuestra la presencia de células semejantes a fibroblastos y vasos sanguíneos.
- 20 La capacidad de moldear y formar matrices tisulares regenerativas hasta estructuras tridimensionales estables, como se ha descrito anteriormente, permitirá el desarrollo de productos novedosos que se pueden usar en una amplia variedad de aplicaciones médicas regenerativas. Cada uno de estos materiales de armazón puede impartir propiedades diferentes al producto final que permiten las manipulaciones de remodelado/persistencia *in vivo*, propiedades biomecánicas, y respuesta biológica global. Además, como se mostró anteriormente, el componente de matriz tisular regenerativa reduce/atenua la respuesta inflamatoria total a los materiales del armazón.
- 25
- 30

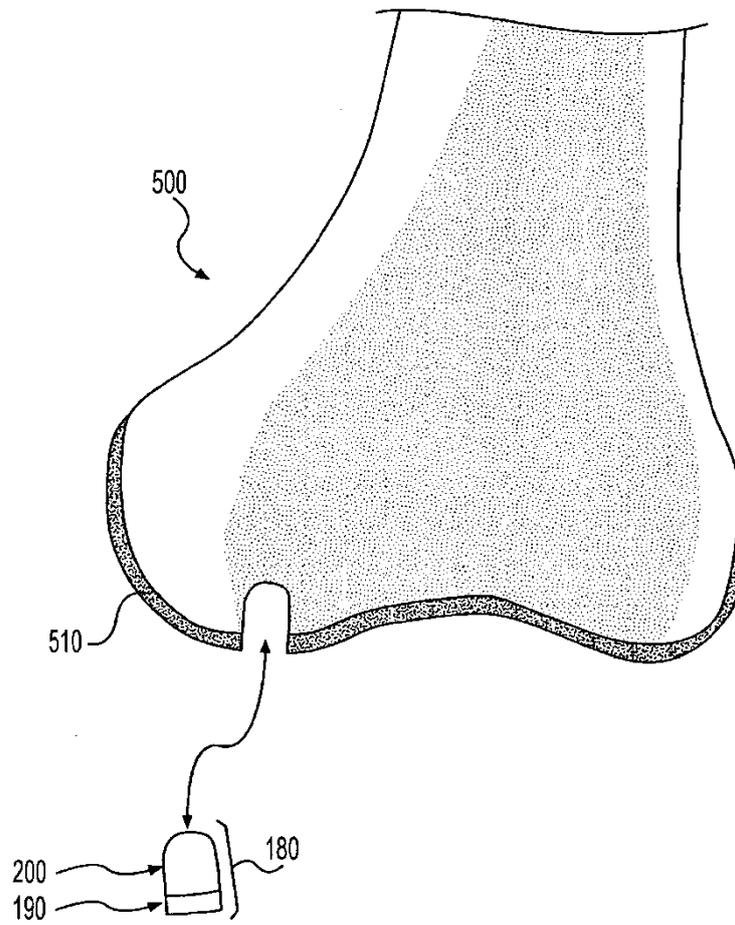
**REIVINDICACIONES**

1. Un método para obtener un almacén tisular, que comprende:  
 disolver un polímero en un disolvente para obtener una disolución;  
 5 mezclar la solución con una matriz tisular acelular (ATM, *acelular tissue matrix*) en forma de partículas para crear una mezcla;  
 colocar la mezcla en un molde; y  
 secar la mezcla para formar un almacén tisular con una forma tridimensional estable, en donde el almacén tisular tiene una respuesta inmunológica o inflamatoria reducida cuando está implantado en un ser humano que el polímero solo.
- 10 2. El método de la reivindicación 1, en donde el polímero comprende una policaprolactona, particularmente en donde el disolvente comprende dioxano o N-metil-2-pirrolidona.
3. El método de la reivindicación 2, en donde la policaprolactona en disolvente está presente en una cantidad que oscila entre 5-30 % (peso/volumen), particularmente entre 10-30 % (peso/volumen).
- 15 4. El método de la reivindicación 1, en donde el polímero es un poli-4-hidroxitirato, particularmente en donde el solvente comprende dioxano o N-metil-2-pirrolidona.
5. El método de la reivindicación 4, en donde el poli-4-hidroxitirato en disolvente está presente en una cantidad que oscila entre 5-40 %, particularmente entre 10-30 % (peso/volumen).
6. El método de la reivindicación 1, en donde el polímero comprende un derivado de éster bencílico del ácido hialurónico, particularmente en donde el disolvente comprende DMSO.
- 20 7. El método de la reivindicación 12, en donde el derivado de éster bencílico del ácido hialurónico en disolvente está presente en una cantidad que oscila entre 5-50 % (peso/volumen), particularmente entre 10-40 % (peso/volumen).
8. El método de la reivindicación 1, en donde el polímero comprende quitosano, particularmente en donde el disolvente comprende ácido acético, particularmente en donde el ácido acético es 0,1-0,5 M.
- 25 9. El método de la reivindicación 8, en donde el quitosano está presente en una cantidad que oscila entre 1-5 % (peso/volumen).
10. El método de la reivindicación 1, en donde la ATM en forma de partículas comprende partículas de tamaño uniforme.
11. El método de la reivindicación 1, en donde la ATM en forma de partículas comprende una ATM dérmica, particularmente en donde la ATM dérmica es una matriz de tejido humano o matriz de tejido porcino,  
 30 o en donde la ATM en forma de partículas es una matriz de tejido de cartílago, particularmente en donde la matriz de tejido de cartílago comprende una matriz de cartílago humano, o una matriz de cartílago porcino,  
 o en donde la ATM en forma de partículas comprende una matriz de tejido óseo, particularmente en donde la matriz de tejido óseo comprende un hueso humano, o un hueso porcino.
12. El método de la reivindicación 1, en donde colocar la mezcla en un molde comprende moldeo por inyección.
- 35 13. El método de la reivindicación 1, en donde la ATM en forma de partículas comprende una ATM de dos o más tipos diferentes de tejidos, particularmente en donde los dos o más tipos diferentes de tejidos comprenden dermis y cartílago, o en donde los dos o más tipos diferentes de tejidos comprenden cartílago y hueso, o en donde los dos o más tipos diferentes de tejidos comprenden matrices de tejido humano, o en donde los dos o más tipos diferentes de tejidos comprenden matrices de tejido porcino, o en donde los dos o más tipos diferentes de tejidos comprenden  
 40 matriz de tejido humano y matriz de tejido porcino.
14. Un almacén tisular preparado mediante el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, que comprende:  
 una matriz tisular acelular (ATM) en forma de partículas; y  
 un polímero;  
 45 en donde la ATM se recubre con el polímero para formar un almacén tisular tridimensional estable para regeneración tisular, y en donde el almacén tisular tiene una respuesta inmunológica o inflamatoria reducida cuando

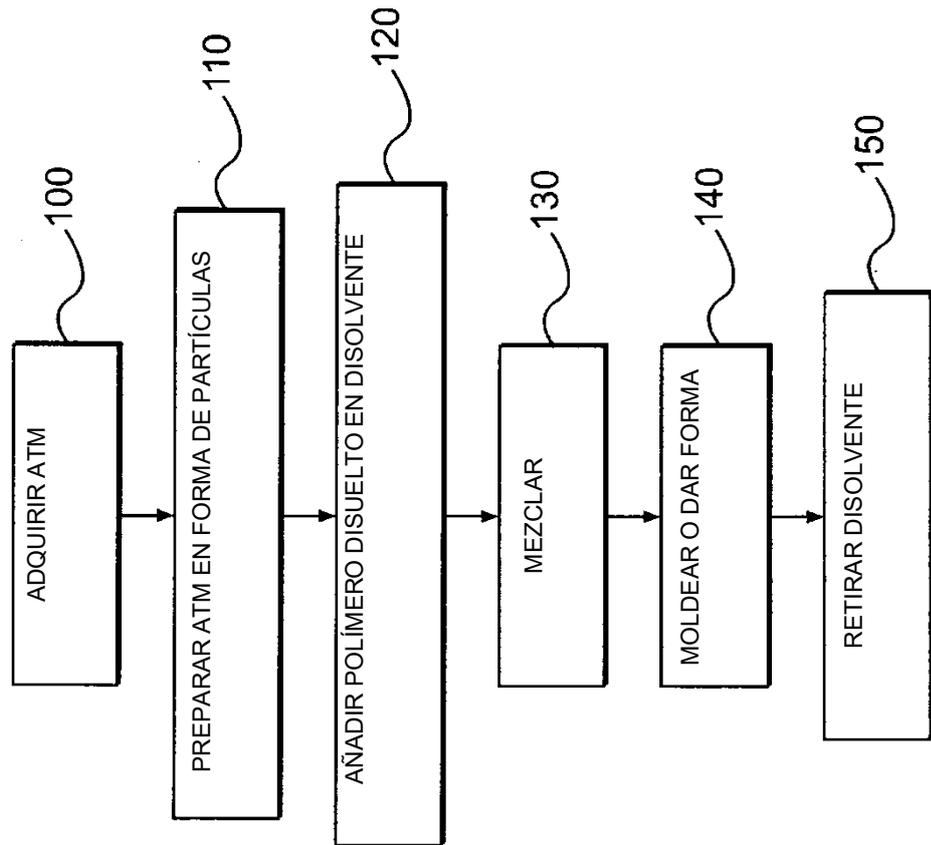
se implanta en un ser humano que el polímero solo, particularmente en donde el polímero comprende un polímero sintético.

**15.** Un almacén tisular según la reivindicación 14 para uso en el tratamiento de un defecto en el tejido seleccionado de hueso, cartílago y mama, particularmente para uso en uno o más de:

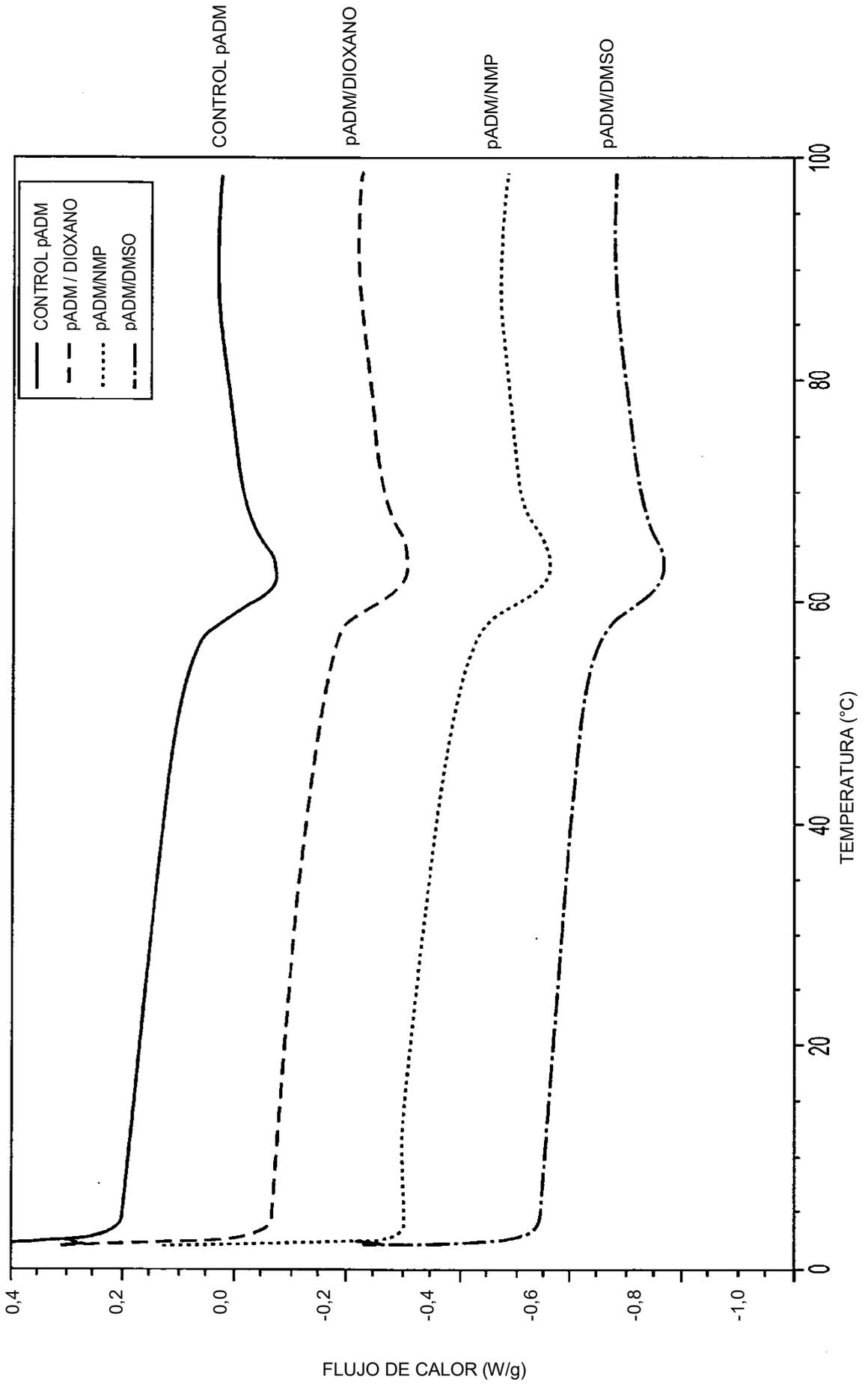
- 5 apósitos absorbentes, regeneración dérmica, regeneración nerviosa, regeneración de cartílago, reparación o regeneración tisular conjuntiva, regeneración ósea, aplicaciones periodontales, revestimiento de herida/espuma, apósitos de vendaje integrado, como sustrato o base para injertos de piel, regeneración vascular, cirugía cosmética, recubrimiento de implante de metal y/o de polímero y sustitución de tejido perdido,
- 10 o para uso en la reducción de la respuesta inmunológica de un material polimérico cuando se implanta en un sitio anatómico particularmente en donde la matriz comprende tejido dérmico, hueso, cartílago, o combinaciones de los mismos.



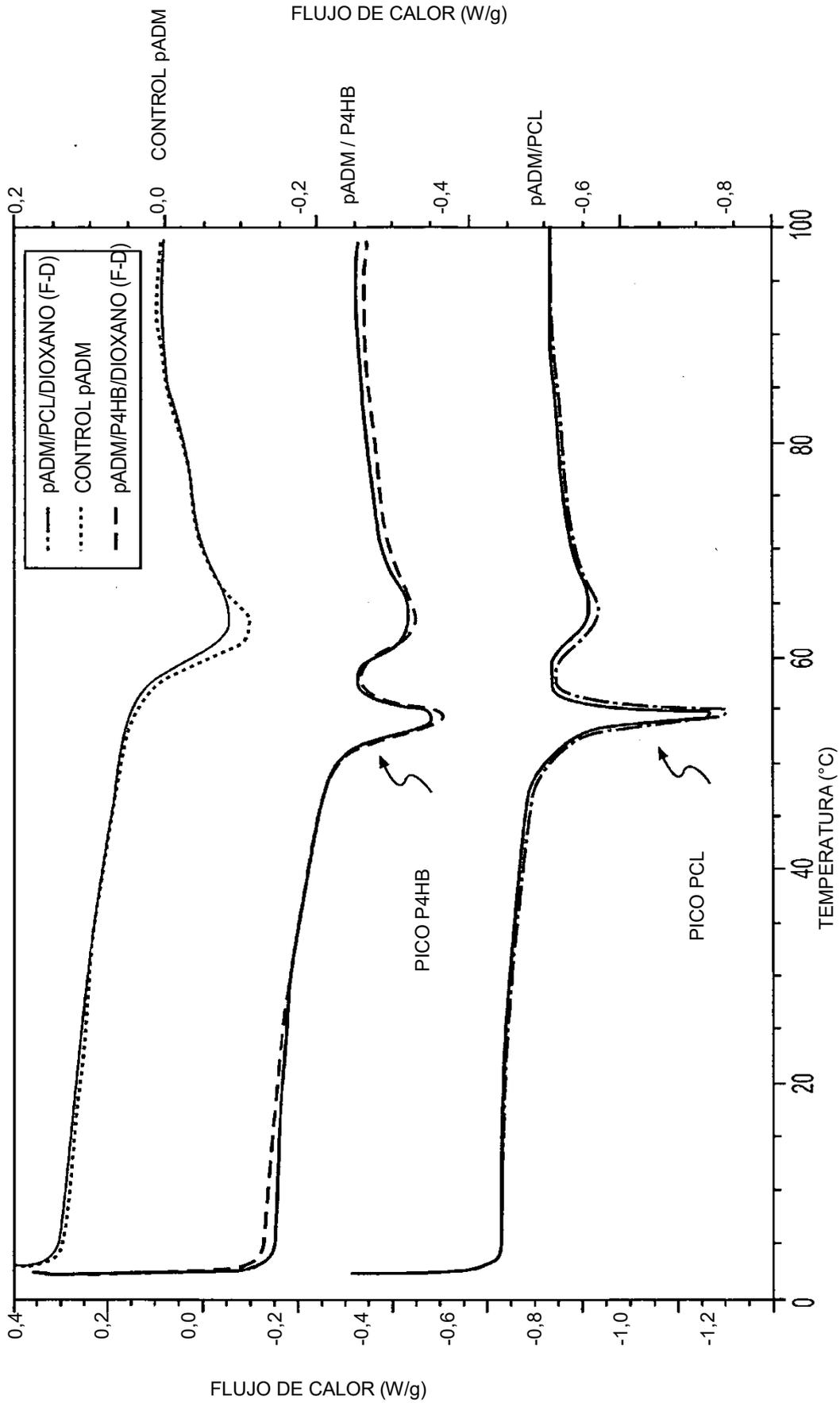
**FIG. 1**



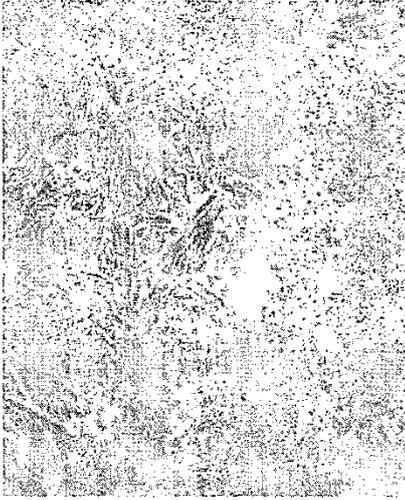
**FIG. 2**



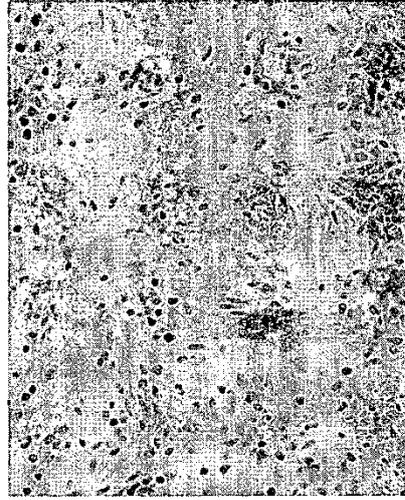
**FIG. 3**



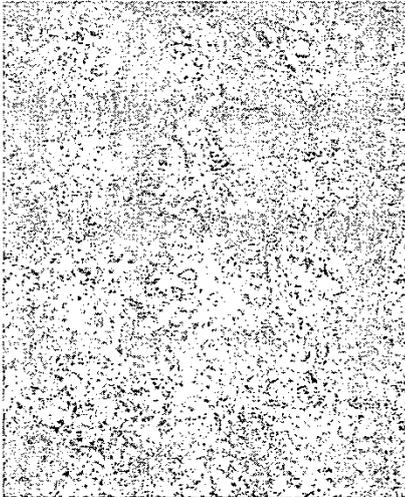
**FIG. 4**



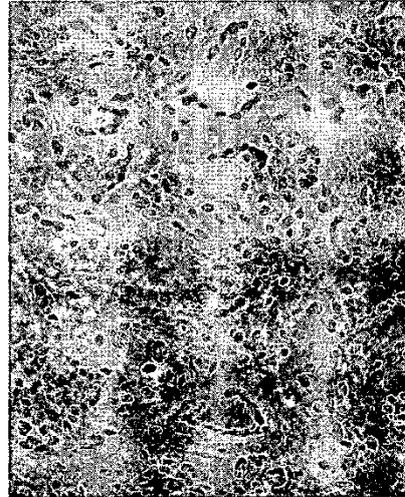
**FIG. 5B**



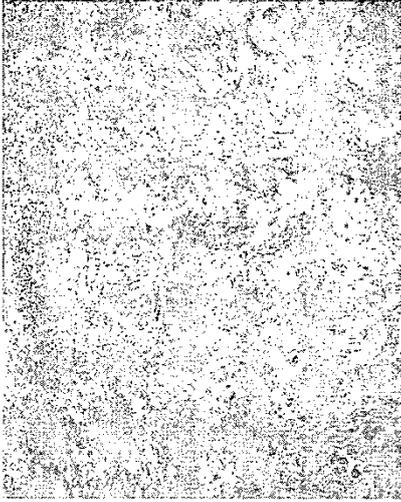
**FIG. 5D**



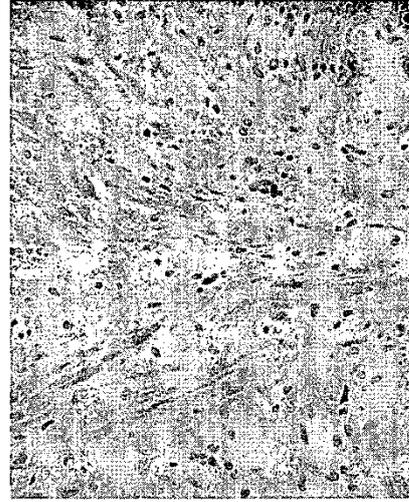
**FIG. 5A**



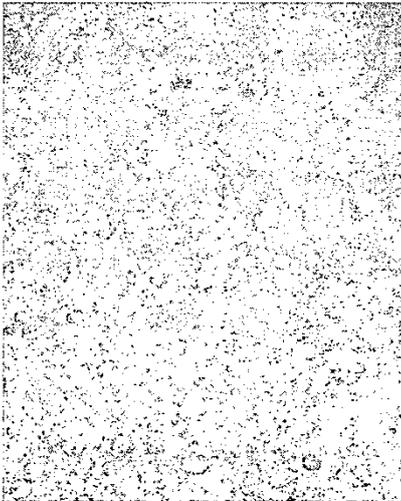
**FIG. 5C**



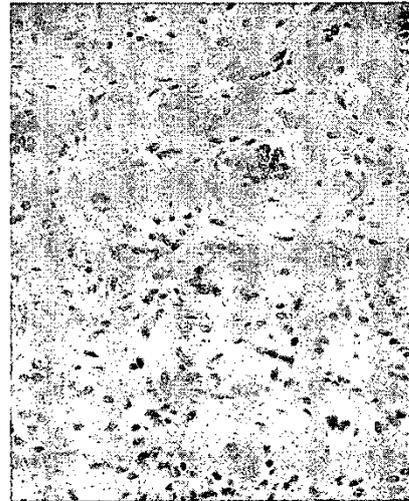
**FIG. 6B**



**FIG. 6D**



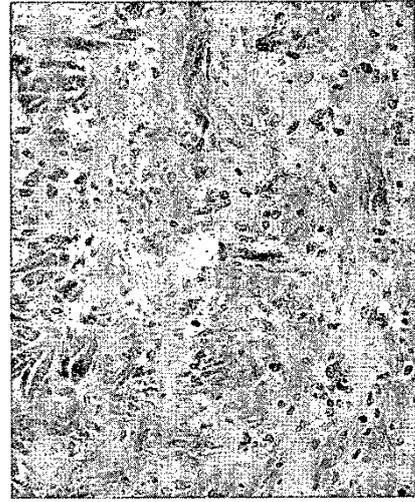
**FIG. 6A**



**FIG. 6C**



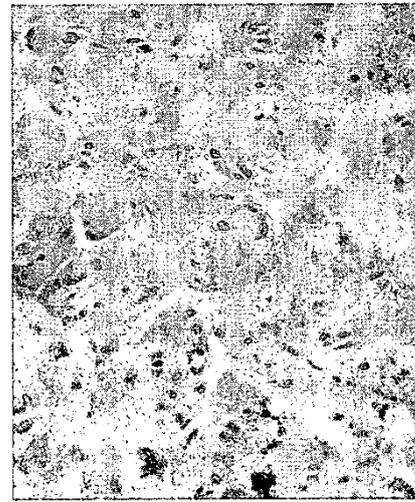
**FIG. 7B**



**FIG. 7D**



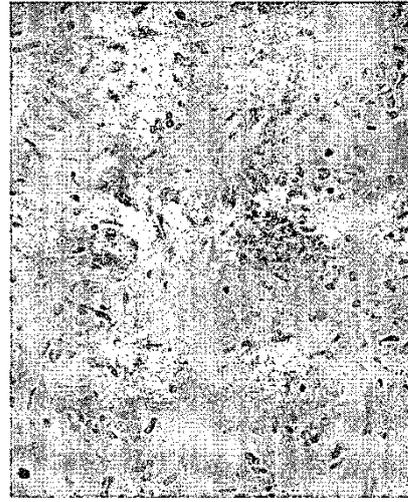
**FIG. 7A**



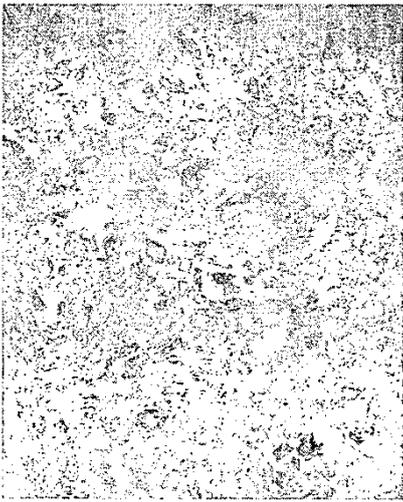
**FIG. 7C**



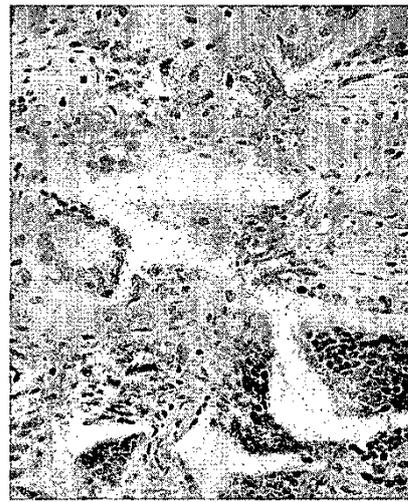
**FIG. 8B**



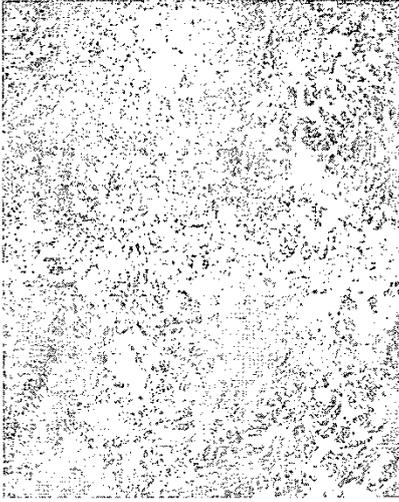
**FIG. 8D**



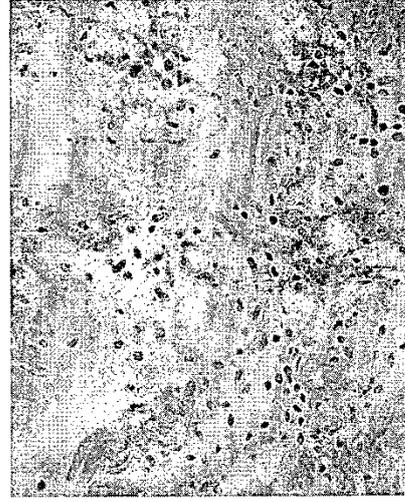
**FIG. 8A**



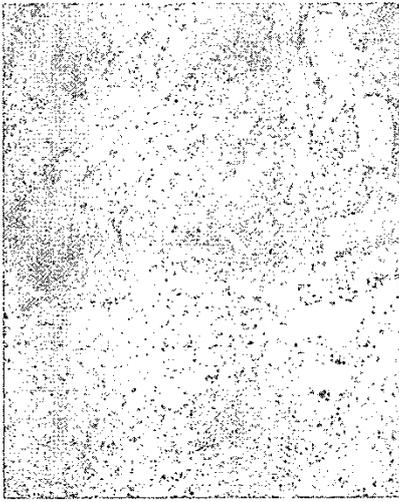
**FIG. 8C**



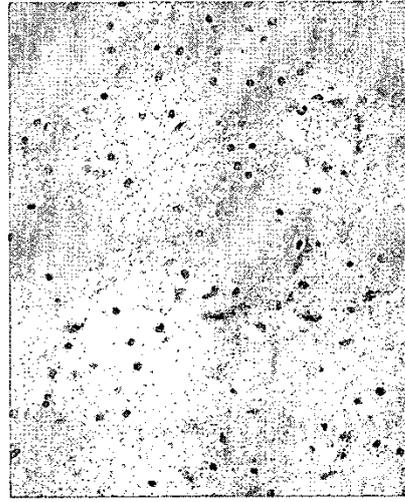
**FIG. 9B**



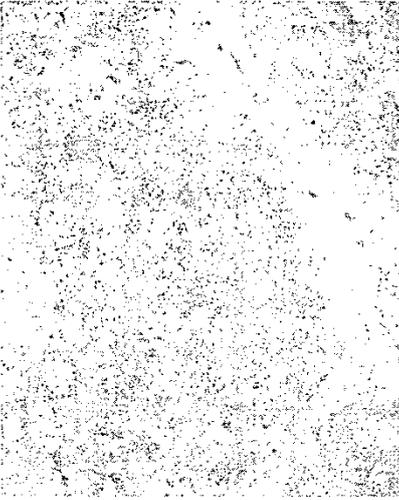
**FIG. 9D**



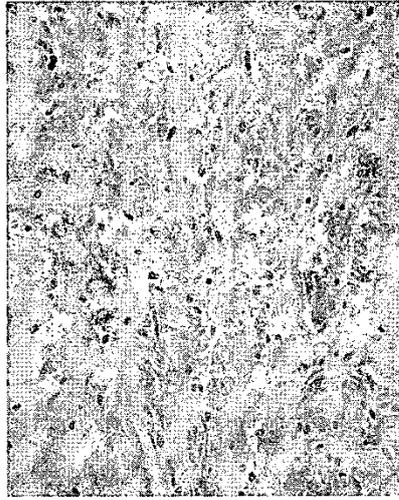
**FIG. 9A**



**FIG. 9C**



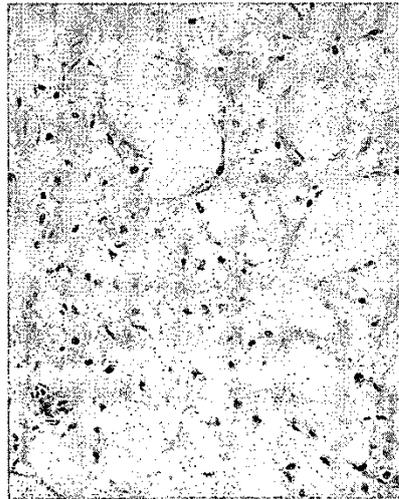
**FIG. 10B**



**FIG. 10D**



**FIG. 10A**



**FIG. 10C**



**FIG. 11B**



**FIG. 11D**



**FIG. 11A**



**FIG. 11C**