

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 711 800**

51 Int. Cl.:

**A61L 27/36** (2006.01)

**A61K 38/39** (2006.01)

**A61L 27/60** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.10.2008 PCT/CZ2008/000128**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.04.2009 WO09049568**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.10.2008 E 08839688 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.11.2018 EP 2211922**

54 Título: **Implante anisotrópico y su método de producción**

30 Prioridad:

**17.10.2007 CZ 20070725**

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

**07.05.2019**

73 Titular/es:

**MEDICEM TECHNOLOGY S.R.O. (100.0%)  
Karlovarska trida 20  
273 01 Kamenne Zehrovice, CZ**

72 Inventor/es:

**DRUNECKY, TOMAS;  
MATOUSKOVA, EVA;  
STEHLICEK, PETR;  
STOY, VLADIMIR y  
VESELY, PAVEL**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 711 800 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

Implante anisotrópico y su método de producción

**Campo de la invención**

La invención se refiere a un método de producción de un implante acelular deshidratado estéril (trasplante) que, durante su rehidratación por medio de agua o fluidos corporales, exhibe expansión anisotrópica. Un producto de este tipo puede denominarse o bien un implante o bien un trasplante, dependiendo del contexto y de la costumbre en diversas áreas de especialización. En la presente solicitud, se usan ambos términos según el contexto; sin embargo, es importante tener en cuenta que son mutuamente intercambiables. Se esteriliza el implante usando radiación mientras está en un estado esencialmente deshidratado, preferiblemente usando electrones acelerados. El implante puede derivar de diversos tejidos animales, especialmente de tejidos de mamíferos, tales como, por ejemplo, tejidos humanos o porcinos, tales como, por ejemplo, piel, placenta, pericardio, peritoneo, pared intestinal, tendón, vaso sanguíneo, etc. El implante, tal como se produce con el método según la invención, es adecuado para uso en medicina humana y veterinaria, por ejemplo como vendaje temporal de heridas y quemaduras, para la reparación, sustitución o regeneración de tejidos y como sustrato para cultivo celular en laboratorio.

**Antecedentes de la invención**

Desde hace mucho tiempo, ha sido habitual el trasplante de tejidos y órganos para una serie de indicaciones. Una de las técnicas bien establecidas es el autotrasplante, donde se usa el propio tejido del paciente (p. ej., piel, hueso, vena o tejido graso) de una localización para reemplazar el tejido en otro lugar. No siempre es esto posible; sin embargo, y en una serie de situaciones, el paciente necesita recibir un trasplante (p. ej., corazón, riñón, retina y otros) de un donante adecuado. Los principales problemas de estos así llamados alotrasplantes son el rechazo de tejidos y, cada vez más, la falta de donantes debido a la altamente creciente demanda. Por lo tanto, se hace un esfuerzo por sustituir los alotrasplantes naturales de diversas formas. Por ejemplo, es posible cultivar autotrasplantes de las células del paciente usando ingeniería de tejidos. Estos autotrasplantes superan fácilmente la barrera de la inmunidad; sin embargo, tienen ciertos inconvenientes: la necesidad de recoger tejido del paciente (biopsia), cultivo laborioso y caro y un prolongado intervalo de tiempo entre la biopsia y la aplicación del trasplante. Se usa habitualmente esta técnica cuando se reemplaza piel en el caso de quemaduras de tercer grado, mientras que, en el caso de otros tejidos y órganos, esta técnica es, en este punto, experimental. Por ejemplo, las Patentes Estadounidenses 6.878.383, 6.432.710, 5.858.390, 5.665.372 y 5.660.850 (Boss, Jr. *et al.*) describen técnicas y medios para la implantación de fibroblastos autólogos con objeto de producir hiperplasia del tejido del paciente.

Se ha usado autotrasplante usando una capa de piel epidérmica creada artificialmente en pacientes con quemaduras durante una serie de años. En el año 1979, Rheinwald y Green (Green H. *et al.*, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1979; 76: 5665-8.) desarrollaron un método para el cultivo seriado de queratinocitos humanos para autotrasplante. Desde 1981, se han usado injertos epidérmicos cultivados autólogos en los EE.UU. para la curación de quemaduras extensas (O'Connor NE. *et al.*, Lancet 1981; 1: 75-8). El inconveniente del método es el prolongado intervalo de tiempo necesario para el cultivo de queratinocitos autólogos, además de la fragilidad del material cultivado, la difícil manipulación, la elevada sensibilidad a los antibióticos, a la infección y a otros factores de estrés y la difícil evaluación de la asimilación del injerto (Navsaria HA. *et al.*, Trends in Biotechnology 1995; 15: 91-100). Se describen, por lo tanto, diversas mejoras del método, tales como:

La Patente US 4.299.816 (M.G. Eisinger) describe la curación modificada de quemaduras usando injertos de células epidérmicas artificialmente cultivadas. La Patente US 5.716.411 (Orgill *et al.*) describe un método de curación que lleva a regeneración de la piel para quemaduras y heridas, usando una cubierta biosintética consistente en una matriz de colágeno y glicoaminoglicanos, que permite la penetración de células y vasos sanguíneos del tejido en curación, por una parte, y la aplicación de láminas de queratinocitos autólogos, por otra. WO 2006/107188 A1 (L. Lurvink *et al.*) describe una película polipeptídica no porosa adecuada para cultivo celular y su posterior uso para la curación de heridas y quemaduras. Se puede encontrar una revisión reciente de estos métodos en TISSUE ENGINEERING Vol. 12, Nº 9, 2006 Update on Tissue-Engineered Biological Dressings, M. Ehrenreich y Z. Ruzczak.

No sólo los injertos epidérmicos cultivados autólogos, sino también los alogénicos, tienen un elevado efecto curativo en quemaduras dérmicas profundas, sitios de biopsia, úlceras crurales y otros defectos de la piel (Bolivar-Flores J. *et al.*, Burns 1990; 16: 3-8.; Matouskova E. *et al.*, Burns 1993; 19: 118-23,4,5).

El éxito del procedimiento depende también de la selección de células donantes. P. Brychta *et al.* describen en la Patente checa Nº CZ 282711 un alotrasplante epidérmico cultivado procedente de células embrionarias o fetales para la curación de defectos y heridas de la piel, esencialmente según el procedimiento de Reinwald y Green, pero usando células alogénicas, que son bien recibidas por el paciente.

También se realiza un esfuerzo para aumentar la resistencia mecánica y la viabilidad de los queratinocitos (p. ej., por cultivo sobre un sustrato sintético) y para desarrollar técnicas que permitan la asimilación permanente del tejido cultivado en quemaduras de tercer grado. Un ejemplo de sustrato usado para el cultivo de queratinocitos es una membrana basada en ácido hialurónico (Laser skin, FIBIA, Italia), diversos tipos de matrices de colágeno combinadas con fibroblastos o también diversos sustratos hechos de polímeros sintéticos (p. ej., pHEMA experimental en la Clinic

- of Burn Medicine, FNKV en Praga 10). Para rellenar quemaduras profundas, se desarrollan sustitutos dérmicos, tales como Integra (colágeno combinado con glucosa aminoglicano condroitin-6-sulfato y fibroblastos alogénicos; Integra LifeSciences Corporation, Plainsboro, New Jersey, EE.UU.), Dermagraft (poligalactina sembrada con fibroblastos alogénicos dérmicos; Advanced Tissue Sciences, La Jolla, CA, EE.UU.), o la ya mencionada AlloDerm - dermis alogénica congelada (LifeCell Corporation, The Woodlands, TX, EE.UU.). Sin embargo, todos estos sustitutos dérmicos deben estar cubiertos por un delgado injerto dermoepidérmico autólogo durante la segunda etapa (después de 2-3 semanas de vascularización); el cubrimiento de quemaduras de tercer grado usando alogénico cultivado no ha tenido éxito hasta la fecha.
- Otra solución a los problemas de alotrasplante es el uso de tejidos u órganos de otras especies diferentes a la humana, el así llamado xenotrasplante. En este caso, es también necesario vencer el rechazo de tejido extraño por el sistema inmunitario, y es también necesario prevenir la posibilidad de contaminación por microbios, gérmenes y virus causantes de enfermedad del donante al paciente. Se dirige una gran cantidad de atención a prevenir la posibilidad de transmisión de priones de los animales al hombre (p. ej., la famosa "enfermedad de las vacas locas"). Por otro lado, la ventaja reside en el hecho de que los tejidos y órganos animales son mucho más accesibles que los humanos.
- Un ejemplo bien conocido de xenotrasplante son las válvulas cardíacas porcinas, usadas para reemplazar válvulas cardíacas humanas. Se entrecruzan las válvulas porcinas usando glutaraldehído (p. ej., Patente US 4.076.468, Liotta *et al.*; Patente US 4.247.292, W.A. Angell), que lleva a varios resultados deseables: se suprime la reacción de rechazo del organismo, aumenta la estabilidad hidrolítica y enzimática del xenotrasplante y, además, el glutaraldehído actúa como agente esterilizante químico.
- Uno de los inconvenientes de este método es el cambio de las propiedades mecánicas del tejido y, en algunos casos, incluso una liberación a largo plazo de glutaraldehído tóxico por los polialdehídos insolubles, que pueden formarse durante el proceso y no pueden eliminarse por simple extracción.
- Se usa una porción significativa de trasplantes en forma de así llamadas "cubiertas biológicas" para el vendaje de heridas y el soporte curativo resultante. Dependiendo de la naturaleza de la herida y de otras circunstancias, se usan cubiertas biológicas, sintéticas y semisintéticas. Se considera generalmente que las cubiertas biológicas son las más efectivas. Una cubierta biológica típica para la curación de, por ejemplo, quemaduras es la piel de mamíferos, pero especialmente la piel humana (alotrasplante) o la piel de cerdo (xenotrasplante) en diversos grosores, recogida de individuos muertos y guardada fresca a temperaturas frías durante un corto período de tiempo, o durante incluso un período de tiempo mayor cuando se congela. Se obtuvo mucha experiencia gracias a los xenotrasplantes de piel de cerdo.
- Los vendajes de heridas "vivos" (es decir, alotrasplantes o xenotrasplantes no procesados que contienen todos los componentes de la piel viva) son muy efectivos, pero su inconveniente reside en su limitada vida útil y en la posibilidad de transferencia de infección. Se sugirieron determinadas soluciones en una serie de patentes, p. ej., los productos AlloDerm y XenDerm de la LifeCell Corp., Texas, EE.UU., basadas en un método de criopreservación según la patente US 4.865.871 (S. Livesey *et al.*). Este método permite congelar y posiblemente liofilizar tejidos y células sin dañar su estructura o su función.
- Otro método es el almacenamiento de piel de cerdo en glicerina en presencia de nitrato de plata a temperatura ambiente, como se describe en la solicitud de patente CN 19951010722 (Kai Cao).
- Se describe la esterilización de piel de cerdo (después de limpiarla y procesarla usando hidrocarburos) en una solución de perclorato de sodio o peróxido de hidrógeno usando radiación gamma de una fuente de Co<sup>60</sup> en una solicitud de patente, TW 199001117733 (Chang Hong Chi *et al.*).
- Se describen otros métodos para la esterilización de piel de cerdo para uso médico en la solicitud de patente CN 19921005926 (Guohui Li *et al.*), que describe la esterilización en estado húmedo usando una fuente de radiación de cobalto, con posterior almacenamiento a temperatura fría, o la liofilización con posterior almacenamiento en glicerina a temperatura ambiente.
- También se recomienda la conservación usando glicerina para la placenta humana (amnios) usada para alotrasplantes por el Deutches Institut fur Zell- und Gewebersatz gGmbH (Delitzcher St 141, 04129 Leipzig, SRN).
- El Documento UA 12391U (E.Y.Fistal *et al.*) describe la curación de heridas necróticas tras quemaduras profundas usando piel de cerdo liofilizada.
- También se describen vendajes biológicos de heridas basados en colágeno para la curación de heridas, incluyendo quemaduras, en los documentos RU 2185179 y RU 2124354.
- Se puede atenuar el problema de la esterilidad y de la vida útil mediante la eliminación de células del trasplante, que, por lo tanto, se volverá parcial o totalmente acelular. Se puede encontrar un esfuerzo por resolver este problema en el documento de patente N° CN 20031124306 (Hu Jie), que describe el xenotrasplante como un vendaje biológico para heridas y quemaduras. Se puede desproveer parcialmente al tejido animal, tal como piel, pared del intestino delgado o placenta, de células según la invención anterior usando agua y una solución de detergente, y se hace esto

sobre la superficie que estará en contacto con la herida. La estructura celular de otras partes, tales como la epidermis, permanecerá preservada. Se entrecruza luego el tejido usando un agente apropiado, tal como glutaraldehído, se lavará y se almacenará en estado húmedo a una temperatura inferior a 4°C.

5 Otro documento, CN 20051126108 (Dong Qun Lin), describe el modo de eliminación de células de la piel de mamíferos por la acción repetida de una solución de NaOH 2N a 5N, seguido de lavado en una solución detergente y en agua.

Otro documento, CN20041022506 (Dai Weihua *et al.*), describe el modo de preparación de una dermis acelular biodegradable usando la acción combinada de enzimas, álcalis y otros agentes químicos.

10 La solicitud publicada US 20050186286 (Yoshihiro Takami) describe el método de eliminación de células de piel de mamífero (p. ej., humana o de cerdo) usando una acción combinada de enzimas proteolíticas y detergentes, mientras que se designa la piel así preparada para uso como alotrasplante o xenotrasplante para la curación de quemaduras. Se realiza la esterilización por inmersión posterior de la dermis acelular en una solución de azida.

15 Una matriz xenodérmica acelular similar es OASIS, producida por AelsLife, que proporciona un marco para una migración tridimensional de células. Esta cubierta biológica de heridas, que según el fabricante contiene importantes compuestos no celulares y estructuras presentes en la piel viva, se produce por liofilización de dermis porcina después de eliminar las células usando enzimas y detergentes.

El vendaje biosintético E\*Z DERM, del fabricante Brennen Medical Inc., usa un xenoinjerto de dermis porcina tratado por entrecruzamiento de colágeno usando aldehídos.

20 El documento de patente JP19900247300 (Koide Mikio) describe una cubierta biológica que utiliza una matriz de colágeno desnaturalizada, formada a partir de dermis bovina acelular por entrecruzamiento y desnaturalización inducida por calor de las estructuras de colágeno. Esta estructura es, según la citada invención, apropiada para siembra usando queratinocitos autólogos para una superior eficacia de curación.

Otros esfuerzos para resolver el problema fueron diversos sustitutos de piel semisintéticos, por ejemplo, un armazón procedente de un colágeno bovino reconstituido, sembrado con fibroblastos humanos (es decir, el vendaje INTEGRA antes mencionado).

25 Otro ejemplo de un trasplante combinado es la "piel recombinada: (RK) según la Patente CZ N° 281176. Se prepara RK usando cultivo de queratinocitos humanos sobre una dermis porcina libre de células. Burns 1993; 19: 118-23). Se usa la dermis desecada para el cultivo de queratinocitos humanos y, después del cultivo, la dermis, con una capa de queratinocitos (o RK), se desprende de la placa de Petri y se aplica a la herida. Se aplica RK con los queratinocitos en contacto con la herida y la dermis en la parte exterior ("boca abajo"). En comparación con injertos epidérmicos simples, la RK muestra la ventaja de una durabilidad superior, del desprendimiento de la placa de Petri sin acción enzimática y de una fácil manipulación. Una ventaja en comparación con los cultivos de queratinocitos sobre sustratos sintéticos y geles basados en colágeno es que la consistencia de la RK es similar a la de la piel, y esto da como resultado una excelente adhesión a la herida y un efecto hemostático. Es posible producir RK usando queratinocitos tanto autólogos como alogénicos. Se cultivan los queratinocitos sobre el lado epidérmico de la epidermis, es decir, donde la membrana basal divide la dermis de la epidermis. El inventor de la invención antes citada menciona que se puede esterilizar la dermis libre de células usando radiación gamma para una mejor vida útil a temperatura ambiente y una superior seguridad. Un inconveniente de la dermis así esterilizada con radiación gamma es, sin embargo, su degradación parcial y pérdida de durabilidad en estado húmedo.

30

35

40 Se describe un vendaje biológico combinado para quemaduras similar en la solicitud de patente TW20000118374 (Yang Mei-Ru *et al.*), donde se combinan fibroblastos humanos vivos en una dermis porcina acelular con queratinocitos humanos cultivados sobre el lado de la membrana basal de una matriz acelular.

45 Un problema general, que evita una aceptación significativa del uso de estos materiales biológicos, es el hecho de que es imposible usar un procedimiento de esterilización rutinario y fiable. Otro problema específico que evita un uso más amplio de los materiales antes mencionados es su limitada o exigente vida útil, y finalmente, pero no menos importante, su coste de fabricación. También exhiben un problema difícil los materiales deshidratados que se hinchan isotrópicamente durante la rehidratación, es decir, el aumento (relativamente) igual de todas las dimensiones del trasplante tras la rehidratación. La presente invención aporta una solución a estos problemas.

### Compendio de la invención

50 La materia objeto de la invención es un método de fabricación de una matriz acelular, estéril, sustancialmente deshidratada y al menos parcialmente desnaturalizada, definiéndose dicho método en las Reivindicaciones 1-3.

55 Los inventores vieron que la presencia de células alogénicas o autógenas trasplantadas no siempre es necesaria para la curación de heridas y la regeneración de tejidos, en la medida en que esté presente un material apropiado que estimule, soporte y dirija la replicación, diferenciación y migración de las propias células del paciente. Este material es una matriz de colágeno acelular especialmente procesada obtenida a partir de un material biológico autólogo, alogénico o incluso xenogénico. La matriz consiste mayoritariamente en colágeno y proteínas relacionadas, tales como

elastina, fibrina o queratina. Estos componentes de la matriz y sus concentraciones cambian dependiendo del origen del tejido y de su método de procesamiento, y por razones de simplicidad se les denominará "colágeno", ya que en todos los casos el colágeno es el principal componente de la matriz. Además de proteínas ("colágeno"), la matriz también contiene un cierto nivel de lípidos y lipoproteínas (hasta un 20% en peso), una cierta cantidad de componentes azucarados (polisacáridos, glicoproteínas y glicoproteoglicanos) y sal. El contenido en proteínas es típicamente de entre el 70% (en peso) y el 95% (en peso), preferiblemente de entre el 80% y el 90% (en peso).

La matriz acelular se caracteriza, a saber, por estar esencialmente deshidratada y consistir principalmente en colágeno, cuyas fibrillas exhiben una organización estructural similar a la forma en que estaban en el tejido original, pero además también están parcialmente desnaturalizadas y, al menos en estado deshidratado, se orientan preferentemente en una cierta dirección o direcciones seleccionadas. La desnaturalización parcial es beneficiosa, ya que aumenta la resistencia a la biodegradación, de tal forma que las fibrillas proporcionan más tiempo para la migración y unión de las células del huésped durante la curación. Una degradación del implante excesivamente rápida puede dejar atrás un foco inflamatorio, que curará con dificultad y puede llevar a cicatrización. La desnaturalización parcial de las fibrillas de colágeno también aumenta la resistencia mecánica en estado húmedo.

La orientación de las fibrillas de colágeno también da al implante mayor resistencia en la dirección escogida y dirige la migración y diseminación de células a lo largo de la superficie del implante, más que su penetración en el implante. Esto está además respaldado por el hecho de que la matriz acelular, según esta invención, tiene una baja porosidad en estado deshidratado en comparación con las cubiertas biológicas de heridas liofilizadas, cuya porosidad es normalmente superior al 75% (en volumen). Según la invención, la porosidad del implante es inferior al 70% (en volumen), preferiblemente inferior al 60% (en volumen), e incluso más preferiblemente inferior al 50% (en volumen). Una baja porosidad y una ventajosa orientación de fibrillas son importantes especialmente para implantes usados como cubiertas biológicas de heridas, por ejemplo, quemaduras, que se supone que se separan espontáneamente una vez se ha completado la curación. La regeneración de la capa epidérmica requiere la migración de queratinocitos desde el borde de la herida hasta las áreas de curación, siendo éstas la interfaz entre la herida y la superficie del implante. La infiltración de células en la estructura del implante no sería ventajosa, ya que podría dar lugar a la unión de nuevo del trasplante a la herida. Cuando el trasplante es subcutáneo, por ejemplo, la migración de células a lo largo de su superficie dará como resultado la formación de un fino quiste fibroso, lo cual es indeseable en muchos casos.

La conservación de la orientación del colágeno en estado deshidratado también disminuye la rigidez tangencial del implante (tangencial a la orientación de las fibrillas); por lo tanto, incluso un implante deshidratado es más fácil de doblar y menos frágil que uno anisotrópico similar. Esto tiene una importancia práctica significativa, ya que el implante deshidratado no necesita ablandadores, y no se forman en él grietas y microrrupturas, que podrían dar como resultado una infiltración incontrolada de células en el implante, su desintegración y posible calcificación.

Otro importante resultado de la organización anisotrópica de las fibrillas de colágeno es el hinchamiento anisotrópico durante la rehidratación del implante. Según la invención, el implante se expande a diversas velocidades en diversas direcciones durante la rehidratación. Por ejemplo, si las estructuras del colágeno se orientan preferentemente en la dirección más larga (p. ej., cuando se usa un tendón), entonces la mayoría de la expansión por hidratación se exhibirá como un aumento del diámetro del implante, mientras que la longitud cambiará sólo un poco, o puede permanecer igual, aumentar ligeramente o incluso disminuir, según la relación entre anisotropía estructural e hinchamiento. En caso de un implante superficial, tal como una cubierta de herida por quemadura, se puede seleccionar la orientación de las fibrillas para que discurren preferiblemente en una dirección perpendicular a la superficie del plano principal del implante. En este caso, la expansión por hidratación se expresará especialmente o sólo como el aumento de grosor, mientras que la impronta permanecerá esencialmente inalterada. La anisotropía del hinchamiento tiene, aparte de las ventajas antes mencionadas, otra ventaja práctica: el cirujano puede ajustar mejor la forma y el tamaño del implante a los requerimientos del paciente individual. Por ejemplo, si se ha de cubrir una herida de una forma particular, se puede recortar simplemente un implante de un tamaño y una forma correspondientes del implante deshidratado, y permanecerá inalterado tras la hidratación. En caso de implantes deshidratados isotrópicos, las dimensiones deshidratadas deberían ser relativamente menores con objeto de compensar el efecto de la expansión por hidratación. Otra ventaja puede ser también el modo en que el implante deshidratado, fijado al tejido, mantiene su forma tras la hidratación y, por lo tanto, el tejido circundante retiene la tensión que seleccionó el cirujano durante la cirugía. En caso de un implante isotrópico, el tejido circundante perdería su tensión original como resultado de la expansión por hidratación del implante.

Significativo es también el hecho de que la anisotropía de la expansión permita una diferenciación simple del implante según esta invención con respecto a otros implantes de similar origen y propósito.

Se puede expresar la anisotropía del hinchamiento como una razón entre coeficientes de expansión lineal en tres dimensiones seleccionadas. Por ejemplo, una dirección seleccionada a lo largo del eje "z" puede ser el grosor  $t$  y su coeficiente de expansión lineal  $C_z = (t_{hidrat.})/(t_{deshidrat.})$ . De forma similar, podemos seleccionar la longitud como  $l$  como la dimensión en la dirección del eje "x" y definir el coeficiente de expansión lineal como  $C_x = (l_{hidrat.})/(l_{deshidrat.})$ . Y finalmente, como dimensión en la dirección del eje "y" podemos seleccionar la anchura  $w$  y definir el coeficiente de expansión lineal  $C_y = (w_{hidrat.})/(w_{deshidrat.})$ , donde el subíndice "hidrat." significa el tamaño (dimensión) tras la hidratación y el subíndice "deshidrat." significa el tamaño (dimensión) en el estado deshidratado original. En caso de un material deshidratado isotrópico, encontraremos siempre que  $C_z / C_y = C_x / C_z = C_y / C_x = 1$ , sin importar cuáles sean los valores

de  $C_x$ ,  $C_y$  y  $C_z$ . La expansión anisotrópica durante la hidratación se distingue por el hecho de que al menos una de las razones  $C_x$ ,  $C_y$  y  $C_z$  tiene un valor diferente de 1, y al menos uno de los coeficientes de expansión lineal  $C_x$ ,  $C_y$  y  $C_z$  tiene un valor inferior a los otros y su valor puede incluso ser inferior a 1. Al menos uno de los coeficientes de expansión lineal  $C_x$ ,  $C_y$  y  $C_z$  tiene, por el contrario, un valor significativamente superior a los otros, normalmente en al menos un 10%, preferiblemente en más de un 30%. Por ejemplo, los coeficientes de expansión lineal  $C_x$  y  $C_y$  pueden tener un valor inferior a 1, mientras que  $C_z$  tiene un valor superior a 1,2 y preferiblemente superior a 1,5.

5

Las fibrillas de colágeno de los implantes deshidratados anisotrópicos se orientan preferentemente en la dirección del coeficiente de expansión lineal más bajo, o, según sea el caso, en un plano perpendicular a la dirección, en donde el valor del coeficiente de expansión es el más alto.

10 Las fibrillas de colágeno pueden estar preferentemente orientadas en una cierta dirección incluso en un estado totalmente hidratado. Se puede conseguir esta orientación por desnaturalización parcial del colágeno en estado orientado, o por entrecruzamiento del colágeno (que es también una forma de desnaturalización). La orientación de las fibrillas del colágeno permanecerá entonces esencialmente mantenida incluso tras la hidratación del implante. Se puede usar esta orientación con ventaja para la dirección de la migración y de la proliferación de células en una cierta  
15 dirección, lo cual es ventajoso especialmente en la curación de quemaduras.

Se puede conseguir el entrecruzamiento del colágeno usando diversos métodos bien conocidos, por ejemplo, la acción de aldehídos, tales como, por ejemplo, formaldehído o glutaraldehído, o cationes polivalentes, tales como, por ejemplo,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Al^{3+}$  o  $Cr^{3+}$ . El entrecruzamiento reducirá aún más el hinchamiento y aumentará la fuerza y la resistencia hidrolítica de la matriz de colágeno. Este entrecruzamiento iónico es, en el estado implantado, frecuentemente  
20 inestable y la reducción gradual de la densidad de entrecruzamiento dará entonces lugar a un aumento gradual en el hinchamiento y al cambio de los factores de expansión lineal y sus mutuas proporciones. La cinética de estos procesos es controlable y, por lo tanto, se pueden usar estos procesos, por ejemplo, para producir presión dirigida o tensión sobre los tejidos en curación. Las matrices acelulares son fuertemente hidrofílicas y su volumen aumentará con la hidratación. Se define más frecuentemente la hidratación como una fracción de peso de agua en estado hidratado, o  
25 como contenido en agua en % en peso. El contenido en agua en el implante totalmente hidratado es superior al 33% (en peso) y preferiblemente superior al 50% (en peso). Se define el coeficiente de expansión de volumen como:  $C_v = C_x * C_y * C_z = (\text{volumen hidratado})/(\text{volumen deshidratado}) > 1$ .

20

25

Las matrices acelulares tienen  $C_v > 1,1$ , preferiblemente  $C_v > 1,5$ . En esto difieren, en principio, de estructuras porosas sustancialmente hidrofóbicas, que pueden formarse, por ejemplo, por entrecruzamiento covalente de tejidos con la ayuda de, por ejemplo, aldehídos, o pueden formarse a partir de polímeros sintéticos, tales como, por ejemplo, poliuretanos. En ese caso, durante la hidratación, el agua llena los poros y aumenta la masa del implante, pero su volumen no aumenta apreciablemente y su  $C_v$  está próximo o es esencialmente igual a 1.

30

Por la información anteriormente expuesta, se puede concluir que la materia objeto de la invención es más especialmente un método de producción de una matriz acelular, estéril, esencialmente deshidratada y al menos parcialmente desnaturalizada, obtenida a partir de un tejido animal y que contiene mayormente colágeno, cuyas fibrillas están en una disposición estructural similar a como estaban en el tejido original, concebida como un implante temporal en medicina humana o veterinaria, y cuya matriz exhibe cambios anisotrópicos de sus dimensiones durante la hidratación.

35

Durante la hidratación de la matriz acelular, cuando se producen los cambios anisotrópicos de las dimensiones de la matriz, las dos dimensiones mayores permanecen esencialmente constantes o se hacen más pequeñas, mientras que la dimensión más pequeña aumenta junto con el aumento de volumen de la matriz.

40

El implante temporal tiene ventajosamente una forma esencialmente plana, cuya impronta se define por sus dos dimensiones mayores, mientras que su grosor se define por su dimensión más pequeña.

Sus dos dimensiones más pequeñas aumentarán ventajosamente, mientras que su dimensión mayor permanece esencialmente constante o disminuye de tamaño.

45

El implante temporal tiene ventajosamente una forma esencialmente larga, tal como un prisma o un cilindro, cuyo diámetro se define por sus dos dimensiones más pequeñas, tales como, por ejemplo, su diámetro, mientras que su longitud o su altura se definen por su dimensión mayor.

Una matriz ventajosa en un estado deshidratado tiene una porosidad inferior al 70% (en volumen), ventajosamente inferior al 60% (en volumen) y lo más ventajosamente inferior al 50% (en volumen).

50

La matriz acelular ventajosamente consiste en fibrillas de colágeno que están, al menos en estado deshidratado, preferentemente orientadas en las direcciones en las que el coeficiente de expansión lineal de hidratación tiene el valor más bajo, y básicamente perpendicularmente a la dirección en la que el coeficiente de expansión lineal tiene el valor más alto.

La matriz acelular, en un estado deshidratado, tiene ventajosamente un contenido acuoso inferior al 20% (en peso), más ventajosamente inferior al 10% (en peso) y lo más ventajosamente inferior al 5% (en peso).

55

- 5 En ciertas realizaciones ventajosas, la matriz puede contener también aditivos ablandadores, conservantes o bactericidas. Los aditivos bactericidas ventajosos contienen plata, preferiblemente en estado coloidal e incluso más preferiblemente como un complejo de plata-proteína. Los aditivos ablandadores o conservantes ventajosos contienen compuestos miscibles con agua, tales como DMSO o compuestos polihidroxi seleccionados de las familias del glicol o la glicerina o sus derivados, trietanolamina y sacáridos.
- Una matriz acelular ventajosa es capaz de expandir su volumen en contacto con líquidos acuosos, con un factor de expansión de volumen mayor de 1,1, preferiblemente mayor de 1,5. Además, una matriz acelular ventajosa, una vez expuesta a soluciones acuosas adecuadas, es capaz de asumir una forma en la que contiene más de un 33% de agua (en peso), preferiblemente más de un 50% de agua (en peso).
- 10 Una matriz acelular ventajosa tiene el coeficiente de expansión lineal más alto un 10% superior, preferiblemente un 30% superior, al coeficiente de expansión lineal más bajo. Son preferibles las matrices acelulares cuyo coeficiente de expansión lineal más alto tiene un valor mayor de 1,2, preferiblemente mayor de 1,5, mientras que el coeficiente de expansión lineal más bajo tiene un valor menor de 1,1, preferiblemente menor de 1,05.
- 15 Los sólidos (materia seca) de la matriz acelular consisten predominantemente en proteínas, donde la proteína preferida ventajosamente contiene predominantemente colágeno. Incluso más preferiblemente, los sólidos (materia seca) de una matriz acelular contienen de un 70% (en peso) a un 95% (en peso), ventajosamente de un 80% (en peso) a un 90% (en peso) de proteínas de tipo colágeno. Ventajosamente, los sólidos (materia seca) de la matriz contienen, aparte de proteínas, una fracción menor de compuestos lipídicos, incluyendo lipoproteínas y fosfolípidos.
- 20 La matriz acelular es ventajosa cuando su fracción de proteína está al menos parcialmente desnaturalizada. Al menos la fracción de proteína de la matriz acelular está entrecruzada como resultado de una reacción con aldehídos o cationes polivalentes.
- Una matriz acelular ventajosa deriva de un mamífero, preferiblemente de un cerdo.
- Un tejido animal ventajoso para la matriz acelular es la piel, la placenta, el pericardio, la duramadre, el intestino, el tendón o el cartílago.
- 25 Se usa ventajosamente el implante temporal formado por la matriz acelular producida en la presente invención como cubierta de heridas, lo más ventajosamente como cubierta de quemaduras.
- Otra realización ventajosa de la matriz acelular es una que también contiene células de mamífero cultivadas. Preferiblemente, el mamífero es un cerdo y las células de mamífero cultivadas son queratinocitos humanos autólogos o alogénicos.
- 30 Otra realización ventajosa de la matriz acelular es una que se biodegradará espontáneamente después de cumplir su función.
- El método de fabricación según la invención, tal como se ha descrito anteriormente, incluye varias etapas básicas:
- 35 1) Recogida del implante, tal como de piel porcina o de tendón humano. Se realiza esta etapa básicamente del mismo modo que en el caso de otras, hasta ahora habituales, recogidas, pero con la importante ventaja de que, según la invención, la recogida del implante no es tan exigente en cuanto a las condiciones de transporte y posterior procesamiento rápido como sería en el caso de implantes que contienen células. Las estructuras de colágeno, que se convertirán en el implante final, son más estables que las estructuras celulares.
- 40 2) Eliminación de células. Según la invención, se pueden usar diversos métodos de eliminación de células para este implante, incluyendo métodos descritos en el estado actual de la tecnología. Éstos incluyen la eliminación de células mediante surfactantes, tales como detergentes, compuestos químicos tales como ácidos y álcalis, o enzimas, como se describe en posteriores solicitudes de patente y documentos, que se incluyen en la presente solicitud: CN200310124306 (Hu Jie), CN20051126108 (Dong Qun Lin), CN20041022506 20040512 (Dai Weihua *et al.*), US 2005 0186286 A1 (Yoshihiro Takami), JP19900247300 (Koide Mikio) y Patente CZ N° 281176 (E. Matouskova).
- 45 Según la invención, es ventajoso un método en dos etapas, donde, en la primera etapa, se expone el tejido recogido a una enzima proteolítica adecuada, tal como tripsina o papaína, y, en la segunda etapa, se expone el tejido, incluyendo potenciales restos de células, a una solución hipotónica fuerte, preferentemente a un exceso de agua destilada o desionizada. El agua desionizada eliminará el resto de células exponiéndolas a choque osmótico, que provocará una ruptura de sus membranas. Esta segunda etapa de eliminación de células se produce junto con una extracción en múltiples etapas del resto de enzima (tal como tripsina) y otros compuestos. Junto con la eliminación del resto de enzima, también se eliminan los péptidos solubles, así como polisacáridos, glicoproteínas y otros compuestos con supuesta actividad biológica. La eliminación de compuestos hidrosolubles es incluso más efectiva, ya que la solución hipotónica causa un gran hinchamiento del tejido, mejorando así la difusión de los extractos. Encontramos, sin embargo, que incluso una extracción exhaustiva no elimina estos compuestos hidrosolubles por completo, y se pueden detectar nuevos compuestos
- 50
- 55

orgánicos usando espectroscopia UV al final de cada etapa. Esto muestra que se siguen liberando nuevos compuestos, tales como polipéptidos y glicoproteínas, desde la estructura del colágeno; por lo tanto, se sigue preservando un cierto nivel de actividad biológica.

5 3. Deshidratación. Se realiza la deshidratación por eliminación de al menos la fracción sustancial de agua, o bien usando evaporación del agua presente en la estructura acelular, o bien mediante su extracción usando un  
 10 solvente adecuado, tal como etanol. "Fracción sustancial de agua" significa aquí la así llamada "agua libre", que es la fracción de agua cuya estructura y propiedades termodinámicas son enteramente como las del agua líquida (por ejemplo, punto de fusión, presión de vapor o capacidad térmica). Ésta es normalmente la mayor parte del agua en el tejido, excepto por el último 20% más o menos en peso, que consiste en agua más o  
 15 menos unida a la matriz de colágeno o a otros componentes hidrofílicos del implante. Esta así llamada "agua unida" tiene otras propiedades termodinámicas distintas a las del agua libre y funciona como plastificante del colágeno. Es difícil eliminar por completo el agua unida. El "implante deshidratado" pretende ser un implante que no contiene agua libre, y que tiene un contenido restante en humedad por debajo del 20% (en peso), preferiblemente por debajo del 10% (en peso). Para una mayor vida útil del producto, es especialmente  
 20 ventajoso mantener el contenido en humedad del producto por debajo del 5% (en peso). Si se realiza una extracción usando un solvente miscible en agua, esta etapa ya conduce a una desnaturalización parcial simultánea del colágeno. Con objeto de que la desnaturalización parcial sea efectiva, hacia el final de la extracción del agua el solvente debería contener más del 50% del compuesto orgánico en peso, preferiblemente más del 70% en peso. Se puede realizar la extracción de agua en varias etapas, con una concentración gradualmente creciente del solvente orgánico. Son solventes adecuados los alcoholes alifáticos inferiores C<sub>1</sub> a C<sub>4</sub>, las cetonas alifáticas inferiores tales como acetona, éteres tales como éter dimetílico, éter dietílico, dioxano o tetrahidrofurano, glicoles tales como etilenglicol, 1,2-propilenglicol, dietilenglicol o trietilenglicol, etc. El más adecuado es el alcohol etílico, que no sólo es un agente desnaturalizante efectivo para el colágeno y otras proteínas, sino que también es un conservante y un agente esterilizante, efectivo  
 25 incluso contra, por ejemplo, retrovirus. Su ventaja es también su relativamente baja toxicidad, su disponibilidad y la posibilidad de eliminar por completo sus restos usando evaporación. Si el solvente elegido no es volátil, se eliminará usando extracción mediante un solvente volátil, tal como metanol, etanol, acetona o agua.

30 4. Desnaturalización parcial del colágeno. Se realiza la desnaturalización o bien usando calor o bien a través de agentes orgánicos adecuados, tales como, por ejemplo, alcoholes, aldehídos, cetonas o su combinación adecuada. Es también posible inducir desnaturalización a través de entrecruzamiento parcial del colágeno, tal como usando cationes polivalentes, tales como Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Al<sup>3+</sup> o Cr<sup>3+</sup>. El entrecruzamiento puede mejorar la resistencia contra la biodegradación y, por lo tanto, puede prolongar el uso efectivo del implante.

35 Se describe la desnaturalización parcial de cubiertas biológicas por tratamiento con calor, entrecruzamiento o su combinación en los siguientes documentos, que se incluyen en la presente solicitud: JP19900247300 (Koide Mikio) y US 4.076.468 (Loiotta *et al.*); US 4.247.292 (W.A. Angell). Se puede realizar ventajosamente la desnaturalización del colágeno en combinación con deshidratación; sin embargo, también se pueden realizar ambas etapas por separado en cualquier orden. Un método ventajoso es la deshidratación por evaporación de agua con una posterior desnaturalización en estado deshidratado, por ejemplo usando tratamiento con calor. Se puede realizar una desnaturalización por solvente orgánico incluso rociando o pulverizando un agente  
 40 orgánico adecuado sobre el implante deshidratado. Se puede combinar la desnaturalización por solventes incluso con desnaturalización por calor mediante calentamiento controlado del implante, por ejemplo, mientras se evapora el agua o los solventes.

45 Es importante realizar la deshidratación y la desnaturalización de la matriz acelular bajo tensión mecánica en una o dos direcciones escogidas, normalmente en la dirección de las dimensiones mayores. Se puede conseguir tensión durante la deshidratación y la desnaturalización manteniendo una dimensión constante en direcciones deseables. Se puede conseguir esto, por ejemplo, fijando la matriz acelular con pinzas, estirándola usando uniones elásticas o rodillos, por unión a un marco adecuado, por presión sobre un sustrato adhesivo o usando succión para unir a un sustrato usando vacío, etc. La deshidratación y la desnaturalización en un estado estirado provocará la orientación de las estructuras de colágeno en la dirección en la que se estira la matriz de  
 50 colágeno acelular (o en la que se evita su contracción al menos durante la deshidratación y la desnaturalización).

55 Si se realiza la desnaturalización sobre una matriz anisotrópica ya deshidratada, entonces normalmente ya no es necesario mantenerla bajo tensión; por lo tanto, la matriz deshidratada está estabilizada dimensionalmente hasta una cierta temperatura, que no se puede exceder durante la fabricación o el almacenamiento. Este límite de temperatura es primariamente dependiente del contenido en agua que queda en la matriz, que no debería exceder del 20% (en peso), preferiblemente del 10% (en peso) y lo más preferiblemente del 5% (en peso), en relación a la masa global de la matriz. Se realiza la desnaturalización entre las temperaturas de +15°C y 90°C, preferiblemente entre 30°C y 70°C.

60 5) Esterilización por radiación ionizante. Si se realiza la desnaturalización en la etapa 4 usando solventes adecuados, tales como etanol, tenemos dos niveles de esterilización. El primer nivel de esterilización durante el proceso de producción primeramente reducirá la carga microbiana para la esterilización final, y en segundo

lugar eliminará incluso esos gérmenes, contra los cuales el segundo nivel de esterilización puede no ser efectivo (p. ej., retrovirus).

Se realiza el nivel de esterilización final empaquetando en un envoltorio impermeable a microorganismos y virus, usando radiación. Ventajosamente, se usa un nivel mínimo de radiación ionizante para una carga microbiana dada, que reducirá la degradación del producto. El nivel recomendado es inferior a 50 kGray, preferiblemente inferior a 30 kGray. Esto es importante especialmente en caso de radiación gamma. Se da preferencia generalmente a la esterilización por electrones acelerados (haz de electrones, radiación beta), que es más suave para el material del implante y se puede dosificar con más precisión. Es importante reconocer las diferencias en el mecanismo de degradación para la radiación gamma y para los electrones acelerados. Los creadores de la presente invención se sorprendieron al descubrir que los implantes esterilizados por una combinación de radiación ionizante, especialmente por electrones acelerados, junto con agentes esterilizantes químicos que simultáneamente causan desnaturalización, especialmente etanol, mantienen sus excelentes propiedades mecánicas cuando se humedecen y no son citotóxicos incluso cuando están en contacto con las células del paciente o con células cultivadas sobre el implante en el laboratorio. Sin atender a diversas teorías, los inventores asumen que el efecto beneficioso de la radiación ionizante, tal como electrones acelerados, está causado primariamente por la liberación de fragmentos hidrosolubles de péptidos y proteoglicanos de la matriz por lo demás insoluble, lo que permite su mayor actividad biológica.

También se puede combinar el implante con agentes bactericidas o bacteriostáticos conocidos, tales como sulfonamidas, antibióticos, complejos de proteína-plata o plata coloidal extendidos por la matriz de colágeno. Esto es ventajoso especialmente durante la implantación en heridas infectadas o necróticas. Algunos aditivos actúan simultáneamente como ablandadores, tales como la glicerina y su diacetato o formaldehído, 1,2-propilenglicol, dietilenglicol, glucosa, trietanolamina o sulfóxido de dimetilo (DMSO). Éstos pueden actuar simultáneamente como conservantes suaves, ablandadores y agentes desnaturalizantes débiles. Su contenido puede ser de hasta el 50% (en peso), preferiblemente inferior al 30% (en peso). Estos aditivos ablandadores son miscibles con agua, y preferiblemente serán compuestos polihidroxi, lo más preferiblemente glicerina o sus derivados. Pueden incluso ser usados en combinación con compuestos de plata, como se describe, por ejemplo, en la solicitud CN199551010722 (Kai Cao), que se incluye en esta solicitud.

La materia objeto de la invención presentada es, por lo tanto, el método de fabricación de una matriz acelular, estéril, esencialmente deshidratada y al menos parcialmente desnaturalizada obtenida a partir de tejido animal y que contiene predominantemente estructuras de colágeno, que ya se definió anteriormente, que se basa en el procesamiento del tejido animal usando un método que comprende las siguientes etapas:

- a) recogida de tejido;
- b) eliminación de células por acción enzimática, surfactantes, ácidos, álcalis, soluciones acuosas hipotónicas o sus combinaciones, durante la formación de la matriz acelular;
- c) deshidratación de la matriz acelular por eliminación de una porción sustancial de agua, mientras que se mantiene la matriz bajo tensión mecánica en una o más direcciones seleccionadas;
- d) desnaturalización parcial de las estructuras de colágeno en la matriz acelular por la acción de un aumento de temperatura, de compuestos orgánicos, de cationes polivalentes o de sus combinaciones, mientras que se mantiene la matriz bajo tensión mecánica en una o más direcciones seleccionadas; o se mantienen las dimensiones de la matriz esencialmente constantes;
- e) esterilización de la matriz esencialmente deshidratada y al menos parcialmente desnaturalizada por radiación ionizante.

Según la invención, un método ventajoso de fabricación de la matriz acelular estéril es uno en el que se realiza la desnaturalización parcial de las estructuras de colágeno de la matriz usando compuestos orgánicos miscibles con agua, seleccionados del grupo que incluye alcoholes alifáticos C<sub>1</sub> a C<sub>4</sub>, aldehídos alifáticos, incluyendo formaldehído y glutaraldehído, cetonas alifáticas, incluyendo acetona, y éteres, incluyendo éter dimetilico, éter dietílico, dioxano y tetrahidrofurano.

Según la invención, un modo ventajoso de llevar a cabo la desnaturalización parcial de las estructuras de colágeno es bajo temperaturas de 15°C a 90°C, preferiblemente bajo 30°C a 70°C.

Los inventores encontraron y verificaron que el implante producido según la invención puede ser ventajosamente usado como cubierta biológica para quemaduras, úlceras cruales, áreas de recogida y otros defectos de la piel. Se puede poner el implante deshidratado directamente sobre la herida sangrante o rezumante, que hidratará el implante *in situ* sin un aumento significativo del área de cubierta de la herida y contribuirá a la reducción del sangrado y rezumado de la herida. Para este uso son especialmente adecuados implantes ablandados por aditivos adecuados, tales como glicerina. También se puede hidratar el implante estéril antes de su uso en una solución fisiológica estéril, posiblemente con la adición de agentes bactericidas apropiados (tales como furantoina, solución de ácido bórico o una solución de plata proteica en agua (un complejo de plata-proteína)), y ponerlo sobre la herida. Su gran ventaja es su capacidad para cubrir estrechamente los rasgos topográficos de la superficie herida, la reducción del dolor de la

herida y tener un efecto hemostático. Otra gran ventaja es el hecho de que la curación de todo el área se produce sin ningún cambio de vendajes de la herida, lo cual es necesario en caso de otros vendajes de heridas, es frecuentemente caro y es especialmente traumático para el paciente (en caso de quemaduras severas incluso hay que hacerlo bajo anestesia total). Otra ventaja en comparación con otras cubiertas biológicas es el hecho de que no importa qué lado está en contacto con la herida. La cubierta dérmica acelular protege la herida y acelera la curación apoyando la actividad biológica conectada con la curación, tal como la migración y proliferación de queratinocitos del paciente. Los queratinocitos nativos se adherirán a la superficie interna del implante (posiblemente a la fibrina creada sobre el implante tras el contacto con la sangre o el plasma del paciente) y migran sobre su superficie, de tal modo que el implante se vuelve parte de la piel durante el período de tiempo en que está teniendo lugar la curación activa. Tan pronto como se ha completado la curación y se ha renovado la capa cutánea epidérmica del paciente, el implante se secará y se desprenderá espontáneamente, sin necesidad alguna de retirada quirúrgica, la cual es necesaria para algunas otras cubiertas biológicas y que también es traumática para el paciente.

Otra ventaja del implante acelular estéril, tal como se produce según la invención, es su idoneidad como excelente sustrato para el cultivo celular, ya sea autólogo o alogénico. Se puede usar, por lo tanto, su superficie para cultivar células adecuadas, tales como queratinocitos, que formarán una cubierta biológica celular conocida como "piel recombinada" (RK), que se puede aplicar a quemaduras y otras áreas heridas. La principal ventaja de esta cubierta biológica celular es su capacidad para combinar el efecto estimulante de los queratinocitos cultivados con las propiedades del sustrato de membrana, siendo éste el implante según la invención. Si la prevención de la profundización de quemaduras dérmicas profundas tiene éxito aplicando RK en el plazo de 10 días tras la lesión, no es necesario un trasplante, se acelerará significativamente la curación y se ahorrarán las áreas de recogida y la repetición de la cirugía. La RK, junto con queratinocitos alogénicos trasplantados, se adherirá temporalmente durante la curación, se incorporarán queratinocitos a la epidermis en regeneración, proliferarán, migrarán, cerrarán la herida y estimularán la curación produciendo diversos factores de crecimiento. La xenodermis protegerá la herida y proporcionará un sustrato natural para la migración de queratinocitos autólogos. En el curso de una semana, los queratinocitos alogénicos fueron reemplazados por los propios queratinocitos. Se explicará además la presente invención mediante los siguientes ejemplos y figuras adjuntas. Estos ejemplos sirven como demostración de ciertas realizaciones ventajosas de la invención, y el experto en la técnica ciertamente verá que el alcance de las reivindicaciones de patente adjuntas no se limita por la inclusión de estos ejemplos a estos ejemplos únicamente.

#### Breve descripción de las figuras

La Fig. 1 es una micrografía que muestra una sección histológica a través de la epidermis porcina con un nivel de corion papilar.

La Fig. 2 es una micrografía de una sección histológica del implante tras la eliminación de células.

La Fig. 3 es una micrografía que muestra una sección histológica de un implante estéril orientado en plano tras deshidratación.

La Fig. 4 es una micrografía que muestra la tinción de estructuras de colágeno según Van Gieson en una sección histológica de un implante rehidratado estéril producido según la invención, aumento 400x.

La Fig. 5 muestra un implante estéril rehidratado preparado para uso como cubierta de quemaduras.

La Fig. 6 demuestra la aplicación del implante producido según la invención en una quemadura de 2º grado: Foto izquierda: conformación y adhesión de la cubierta a la herida sin vendajes externos

Foto derecha: quemadura de 2º grado tras curación y el autodesprendimiento de la cubierta.

La Fig. 7 es una micrografía que muestra una sección histológica de las muestras de tejido recién formado sobre una quemadura de 3º grado no necrótica bajo la cubierta hecha del implante producido según la invención (9 días después de la aplicación).

La Fig. 8 demuestra micrografías de preparaciones histológicas de piel recombinada (RK) formada por queratinocitos humanos cultivados en laboratorio sobre el implante producido según la invención.

Foto izquierda: Piel recombinada con queratinocitos humanos cultivados en inmersión sobre una matriz acelular porcina producida según la invención

Foto derecha: Piel recombinada con queratinocitos humanos cultivados sobre la interfaz de aire y matriz acelular porcina producida según la invención.

#### Ejemplos

##### Ejemplo 1

Piel porcina como xenotransplante

Usando un dermatomo, se cortó una capa de 300-400 micras de grosor de una epidermis porcina afeitada y limpia que incluía la capa del corion papilar. El histograma de la piel retirada está en la Fig. 1. Se sumergió la tira retirada de piel porcina 3 veces durante 20 minutos a 37°C y durante 12 horas a 4°C en una solución de tripsina al 0,25%, que eliminó la mayoría de las células dérmicas y separó la epidermis. Se lavó la epidermis obtenida 6 veces en agua desmineralizada (3x durante 1 hora, 1x durante 12 horas, 2x durante 0,5 horas) para eliminar el resto de células y la tripsina. El histograma de la Fig. 2 muestra que se conservaba la estructura no celular. Se unió entonces la tira de dermis con un adhesivo a una placa de Petri de vidrio y se secó a temperatura ambiente hasta peso constante. En este estado, la dermis contenía aproximadamente un 18% de agua. La dermis acelular así secada tenía la misma área de impronta que la dermis hidratada original, pero su grosor era menos de la mitad. Se sumergió entonces la dermis acelular estirada en etanol al 96% a 15°C durante un periodo de 24 horas. Se decantó luego el etanol y se desprendió la dermis de su sustrato de vidrio, se unió con pinzas desde dos direcciones opuestas y se secó a una temperatura de 50°C durante 1 hora.

Se puso entonces el xenotrasplante acelular deshidratado, que contenía un resto de un 9,5% de agua en peso, en una bolsa de esterilización aprobada para esterilización por radiación, se selló con calor en su interior y se expuso a una dosis de 25 kGy de radiación gamma. Se confirmó la esterilidad usando una prueba de esterilidad estándar. Tras la rehidratación, se recogió una sección histológica. La Fig. 3 muestra que se conserva la estructura fibrosa del tejido conectivo, pero es más compacta y las fibras se orientan en un plano. La tinción de Van Gieson en la Fig. 4 muestra que el implante consiste mayormente en polímeros de tipo colágeno, tales como colágeno y elastina. El análisis mostró que el implante contiene una mezcla aproximadamente al 85% (en peso) de mayormente colágeno con una cantidad menor de elastina y fibrina, donde el resto está compuesto por lípidos, polisacáridos y glicoproteínas.

La porosidad del implante estéril era de alrededor de un 55% en volumen, calculado usando la densidad en estado deshidratado. Se rehidrató el implante a 35°C en una solución isotónica de NaCl. Tras rehidratación hasta masa constante, el contenido en agua era del 62% (en peso). Se tomaron mediciones repetidas de las dimensiones en estado tanto deshidratado como hidratado con una precisión de hasta 0,01 mm, y se encontraron los siguientes coeficientes de expansión lineal:

Longitud:	$C_x = 1,02 \pm 0,01$
Anchura:	$C_y = 1,03 \pm 0,03$
Grosor:	$C_z = 1,54 \pm 0,29$
Coefficiente de expansión planar:	$C_a = 1,05 \pm 0,03$
Coefficiente de expansión en volumen:	$C_v = 1,63 \pm 0,20$

Las diferencias obvias en los coeficientes de expansión prueban claramente la expansión anisotrópica durante la rehidratación del implante. Se puede demostrar además esta anisotropía por los valores de las razones de los coeficientes de expansión lineal:

$C_x/C_y$	0,98
$C_z/C_x$	1,52
$C_z/C_y$	1,49

Después de un cierto periodo de almacenamiento, se usó el xenotrasplante como cubierta para una quemadura profunda de 2º grado en la cara. Se sumergió brevemente el implante en una solución fisiológica estéril, como se demuestra en la Fig. 5, después de lo cual se ablandó y se volvió flexible sin cambio alguno del área de impronta. Se puso entonces sobre la quemadura, a la que se adhirió bien, como es evidente en la parte izquierda de la Fig. 6. Durante la curación de la quemadura, el implante permaneció en su sitio original según la invención, comenzó a secarse gradualmente y, después de casi una semana, empezó a desprenderse del tejido curado. Después de 11 días, la herida se había curado y la cubierta se había desprendido por completo, como se demuestra en el lado derecho de la Fig. 6.

#### Ejemplo 2

Se usó el implante preparado según el Ejemplo 1 sobre una quemadura de 3º grado.

Se cortó cuidadosamente el tejido dañado. Se extrajo el trasplante deshidratado de su envase estéril, se ajustó al tamaño y la forma del área tratada usando tijeras, se puso sobre el área herida sangrante y se pulverizó con una solución antibiótica estéril. El xenotrasplante se ablandó rápidamente y se adhirió a la superficie del área herida, que dejó de sangrar. El implante retuvo su impronta de estado deshidratado, pero su grosor aumentó con la hidratación. Esto causó una perfecta conformación a la herida. Se cubrió el implante con una capa protectora de vendaje de tul graso durante los 3 primeros días. Después de 8 días, el implante se secó hasta tener una consistencia de tipo costra y comenzó a separarse de la piel recién formada bajo la cubierta. Comenzó a formarse lentamente nueva epidermis

bajo el implante, como se muestra en la Fig. 7. Después de completarse la curación, se formó piel sana y naturalmente estructurada, incluyendo una pigmentación natural, y libre de cicatrización.

### Ejemplo 3

#### Cartílago humano como alotrasplante

- 5 Se liberó de células cartílago recogido de una articulación de la cadera de un donante fallecido empapando repetidamente en una solución de tripsina y en agua destilada, y se unió luego, usando vacío, con su lado cóncavo sobre el lado convexo de un sustrato poroso de forma adecuada hecho de vidrio fritado. Mientras estaba sobre este sustrato, se puso en un exceso de una solución de 20 partes (en peso) de metanol y 5 partes (en peso) de sulfóxido de dimetilo (DMSO) a 35°C durante un período de 48 horas. Se deshidrató así el implante acelular, y al mismo tiempo se desnaturalizó parcialmente el colágeno en él contenido en un estado orientado en plano. Después de este período, se retiró el alotrasplante acelular de la solución y se evaporó el metanol a temperatura ambiente usando una corriente de aire. Al final de esta etapa, el trasplante contenía aproximadamente un 13% (en peso) de DMSO, aproximadamente un 4% (en peso) de agua y menos de un 0,5% (en peso) de metanol. Después de retirarlo del sustrato poroso, se puso el trasplante en un saco de esterilización estanco al agua y se esterilizó usando una dosis de radiación beta de 45 kGy procedente de un acelerador de electrones. Se determinó la esterilidad usando una prueba de esterilidad estándar.

- El implante así preparado es adecuado como sustituto experimental del cartílago de la articulación de la cadera en perros, donde se desliza sobre el cartílago dañado y se une usando una ligadura de material de sutura quirúrgico alrededor del cuello de la cabeza. El implante se hidratará *in situ* sin ningún cambio de su impronta, por lo que permanece durante todo el período en una posición estable con respecto a la articulación del paciente. El implante protege el cartílago contra la fusión y, por lo tanto, contra la pérdida permanente de movilidad. Además, el implante soporta y acelera la curación del cartílago. Cuando ha acabado la curación, el implante se degrada gradualmente y se reabsorbe, hasta que se ha curado el cartílago natural y se renueva la función de la articulación.

### Ejemplo 4

#### Piel porcina como matriz para el cultivo de queratinocitos (para la preparación de piel recombinada)

- 25 Se retiró la matriz acelular estéril del Ejemplo 1 de su envoltorio estéril, se puso sobre una placa de Petri usada para cultivo celular y se inundó cuidadosamente con un pequeño exceso de agua destilada. La xenodermis acelular se hidrató sin ningún cambio de su impronta, sólo su grosor aumentó a aproximadamente el doble como resultado de la hidratación. Se aspiró luego cuidadosamente el exceso de agua para prevenir cualquier deformación de la dermis hidratada, y se dejó que el resto del agua se evaporara en una campana de flujo laminar a temperatura ambiente. Se usó entonces la xenodermis acelular seca para el cultivo de queratinocitos humanos sobre fibroblastos 3T3 letalmente irradiados (no se replican, pero metabolizan y producen importantes factores de crecimiento), que crearon la así llamada piel recombinada (RK), que contiene queratinocitos alogénicos cultivados sobre dermis acelular xenogénica según la invención. Se determinó la estructura de la capa de queratinocitos por las condiciones de cultivo, como puede verse por la Fig. 8. Cuando se hizo el cultivo sobre la superficie del implante bajo inmersión, se obtuvo como resultado una capa de queratinocitos regular y lisa. Cuando se hizo el cultivo sobre una interfaz implante/aire, la capa de queratinocitos se autoestructuró en una forma similar a la epidermis natural, incluyendo la capa córnea, *stratum corneum*, y la membrana basal, *stratum basale*. Se puede usar la RK así preparada para la curación de quemaduras, úlceras cruales y otros defectos de la piel difíciles de curar.

- Se aplica la RK con los queratinocitos mirando hacia la herida y la dermis hacia afuera ("boca abajo"). Según la invención, la xenodermis, que sirve como sustrato de cultivo durante la fase de cultivo, sirve como una estructura de soporte para la transferencia de queratinocitos durante la aplicación del injerto; protege la herida de la infección, de la desecación y de los daños mecánicos. La ventaja en comparación con injertos cultivados simples es una mayor resistencia, una liberación de la placa de Petri sin acción enzimática (usando sólo 2 pinzas) y una fácil manipulación. Una ventaja en comparación con los cultivos de queratinocitos sobre geles basados en colágeno es la consistencia de la RK, que es similar a la piel ordinaria, y la resultante excelente adhesión a la herida, y también un efecto hemostático. Cuando se libera de la placa de Petri, el injerto no se contrae, los queratinocitos sobre el sustrato no se afectan durante la liberación como lo serían por enzimas. La RK con queratinocitos alogénicos tiene efectos estimulantes sobre la curación de las áreas de recogida de injertos y para la curación de quemaduras dérmicas profundas (2º grado).

- 50 La principal ventaja de esta cubierta biológica celular es su combinación de efectos estimulantes de los queratinocitos cultivados con las características de las membranas biológicas. En casos en donde es posible prevenir la profundización de quemaduras dérmicas profundas aplicando RK en el plazo de 10 días desde la lesión, no es necesario trasplantar, la curación se acelera sustancialmente y se ahorrarán áreas de recogida, y se evitarán cirugías repetidas. La RK con queratinocitos alogénicos trasplantados se adherirá temporalmente a través de la curación; los queratinocitos se incorporarán ellos mismos a la epidermis en regeneración, proliferarán, migrarán, cerrarán la herida y estimularán la curación produciendo diversos factores de crecimiento. La xenodermis protegerá la herida y proporciona un sustrato natural para la migración de queratinocitos autólogos. En una semana, los queratinocitos alogénicos son reemplazados por los propios queratinocitos del paciente.

## Ejemplo 5

## Tendón de pavo

Se liberó de células un tendón, recogido de la pata de un pavo, usando el método del Ejemplo 1, y luego se fijó en un aparato colocado en un recipiente, en donde se estiró sobre un rodillo y se traccionó mediante una línea, a la que se unió un peso de 12 kg. Se sumergió en una solución al 1% de cloruro de aluminio en este estado, y se dejó a 37°C durante 16 horas. Se cambió luego la solución 3 veces usando agua aprotogénica y luego con una mezcla de 20 partes (en peso) de acetona y 10 partes (en peso) de glicerina y 0,05 partes (en peso) de cloruro de sodio, y se dejó la estructura en esta solución durante 25 horas bajo la tensión creada por el peso de 12 kg y el aparato de estiramiento. Se secó después la estructura y, junto con el aparato de estiramiento, se trasladó a una cámara de desecación a vacío, precalentada a 70°C, donde se liberó del resto de solvente en un período de dos horas, y además se produjo una desnaturalización parcial inducida por calor del colágeno. Se completó el proceso de desnaturalización calentando hasta 88°C durante un período de 10 minutos, aún bajo tensión mecánica bajo nitrógeno. Se introdujo el implante acelular seco, con un resto de contenido en agua del 3% (en peso) en un envase de esterilización de plástico y se esterilizó usando 15 kGy de radiación beta utilizando un acelerador de electrones. Se aseguró la esterilidad usando una prueba de esterilidad estándar.

El implante acelular permaneció resistente durante la rehidratación y su diámetro aumentó, mientras que su longitud se había contraído. Tras la implantación, se hidrató aún más debido a una disminución de la densidad de entrecruzamiento, que puede definirse, por ejemplo, como una fracción molar de grupos que conectan dos cadenas en un polímero. Esto también dio como resultado una contracción gradual de la longitud y el aumento de tracción sobre los tejidos circundantes, lo que puede ser usado ventajosamente, por ejemplo, en cirugía reconstructiva u ortopédica.

## Ejemplo 6

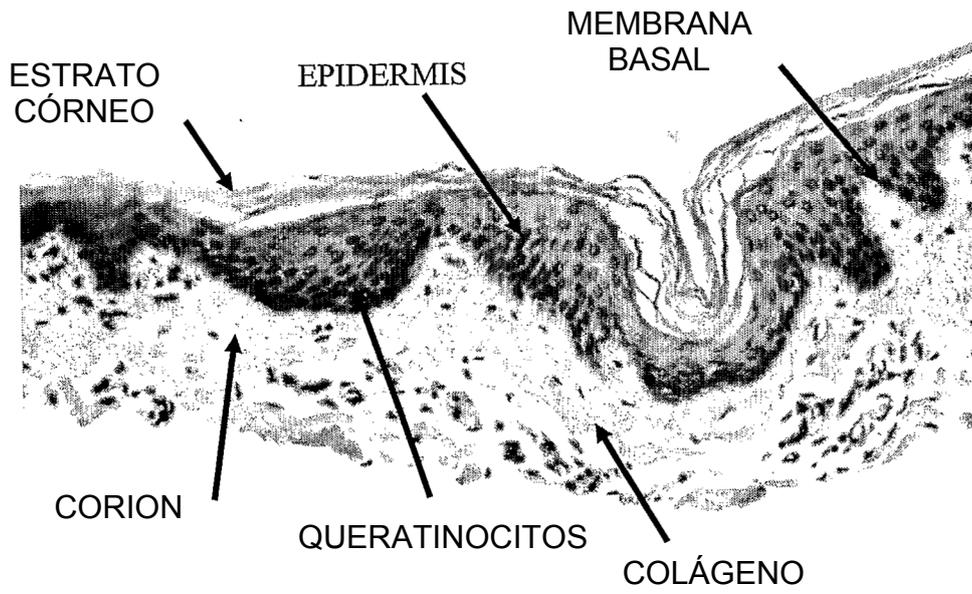
## Intestino delgado porcino

Se recogió un intestino delgado de un cerdo joven recién sacrificado, se lavó con agua, se volvió del revés y se empapó repetidamente en un exceso de una solución al 3% de dodecilsulfonato de sodio a 45°C. Después de esta etapa, se cerró un extremo del intestino con una pinza y se conectó el otro extremo a una fuente de agua desmineralizada presurizada a 30 mm Hg (4 kPa). Se mantuvo la sobrepresión en un baño de agua desmineralizada a 40°C durante 24 horas. Se cambió entonces el agua desmineralizada por una solución de alcohol isopropílico y alcohol terc-butílico (1:1, en peso) y se mantuvo a 70°C bajo una sobrepresión interna de la solución alcohólica durante otras 6 horas. Finalmente, se cambió la mezcla de alcoholes por metanol tres veces a temperatura ambiente. Se infló entonces la membrana orientada acelular y deshidratada con nitrógeno y se secó su exterior usando una corriente de aire limpio bajo una campana laminar, después de lo cual se plegó hasta dejarla plana entre dos placas de polipropileno y se introdujo en un saco de esterilización estanco al agua. Se esterilizó entonces en dos fases: en la primera fase, se esterilizó usando 5 kGy de radiación gamma, luego con una dosis de 15 kGy de electrones acelerados. La membrana acelular estéril está concebida para llenarla con una suspensión de fibroblastos alogénicos e implantarla en el paciente subcutáneamente con el fin de regenerar el tejido conectivo subcutáneo del paciente.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un método de fabricación de la matriz acelular, estéril, sustancialmente deshidratada y al menos parcialmente desnaturalizada obtenida a partir de tejido animal y que contiene predominantemente colágeno, cuyas fibrillas están en una disposición estructural similar a como estaban en el tejido original, y concebida como un implante temporal en medicina humana o veterinaria, caracterizada por procesar el tejido animal usando un método que comprende las siguientes etapas:
- a. eliminación de células por la acción de enzimas, surfactantes, ácidos, álcalis, soluciones acuosas hipotónicas o sus combinaciones;
- 10 b. deshidratación de la matriz acelular mediante eliminación de una cantidad significativa de agua, durante la cual la matriz se mantiene bajo tensión mecánica en una o más direcciones seleccionadas;
- c. desnaturalización parcial de las estructuras de colágeno en la matriz acelular mediante la acción de un aumento de temperatura, compuestos orgánicos, cationes polivalentes o una combinación de dichas acciones, mientras que la matriz se mantiene bajo tensión mecánica en una o más direcciones seleccionadas; o las dimensiones de la matriz en las direcciones seleccionadas se mantienen para ser esencialmente constantes;
- 15 d. esterilización de la matriz esencialmente deshidratada y al menos parcialmente desnaturalizada usando radiación ionizante.
- 20 2. Un método según la reivindicación 1, caracterizado por realizar la desnaturalización parcial de las estructuras de colágeno con ayuda de compuestos orgánicos miscibles con agua, seleccionados del grupo consistente en alcoholes alifáticos C<sub>1</sub> a C<sub>4</sub>, aldehídos alifáticos, incluyendo formaldehído y glutaraldehído, cetonas alifáticas, incluyendo acetona, y éteres, incluyendo éter dimetilico, éter dietílico, dioxano y tetrahydrofurano.
3. Un método según la reivindicación 1, caracterizado por llevar a cabo la desnaturalización parcial de las estructuras de colágeno a temperaturas de 15°C a 90°C, preferiblemente de 30°C a 60°C.

FIG. 1



**FIG. 2**

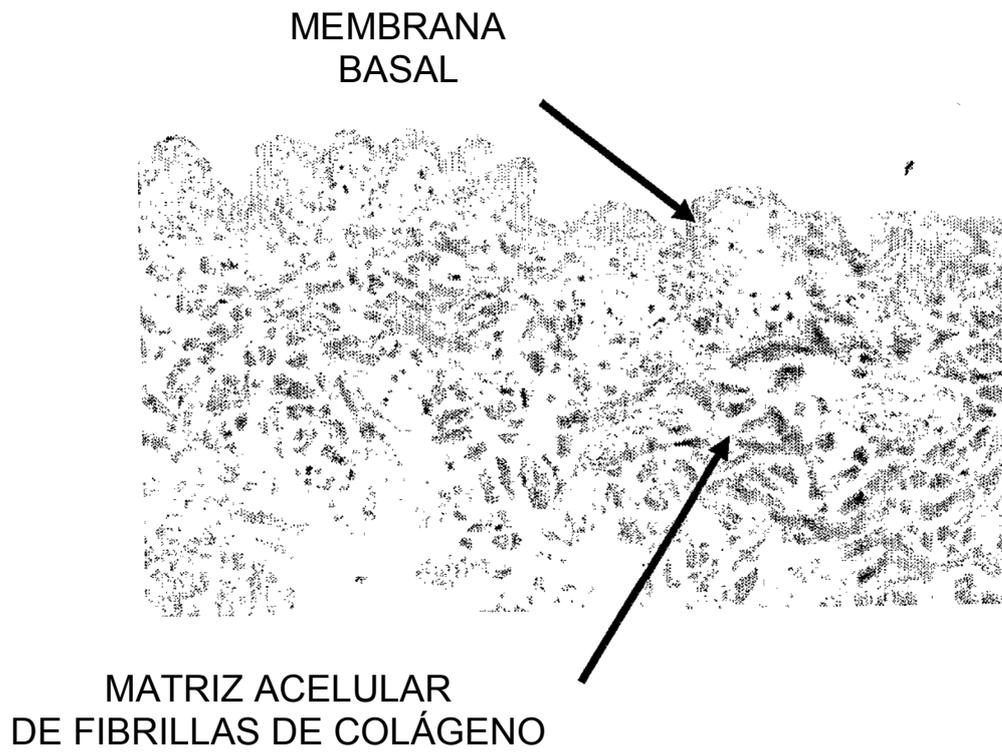
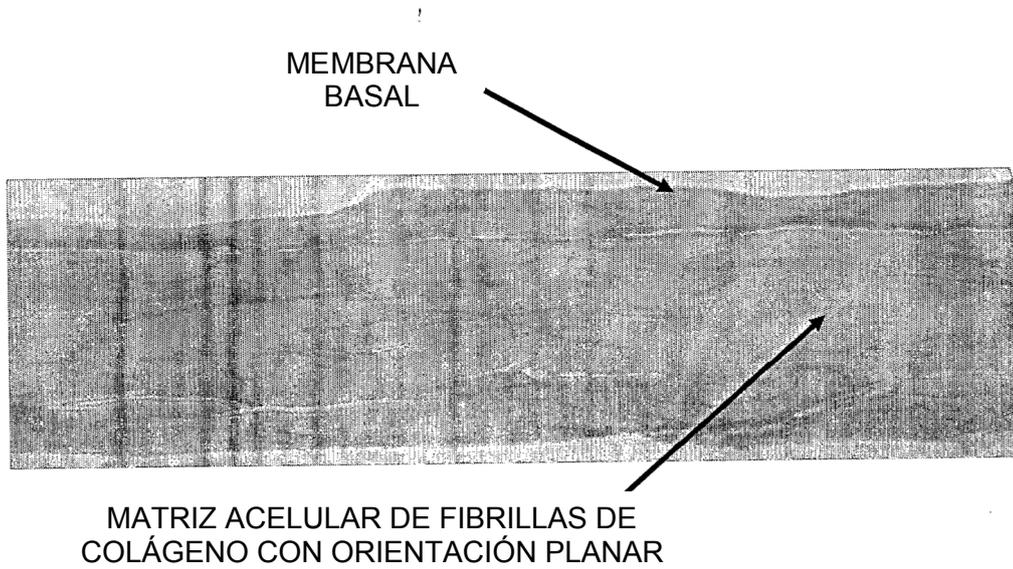


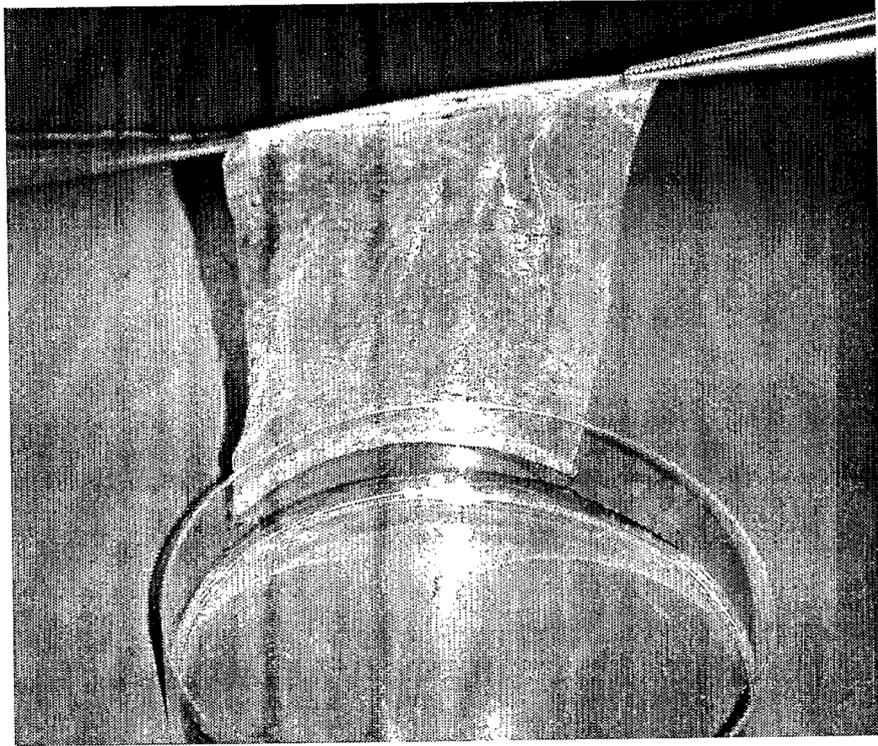
FIG. 3



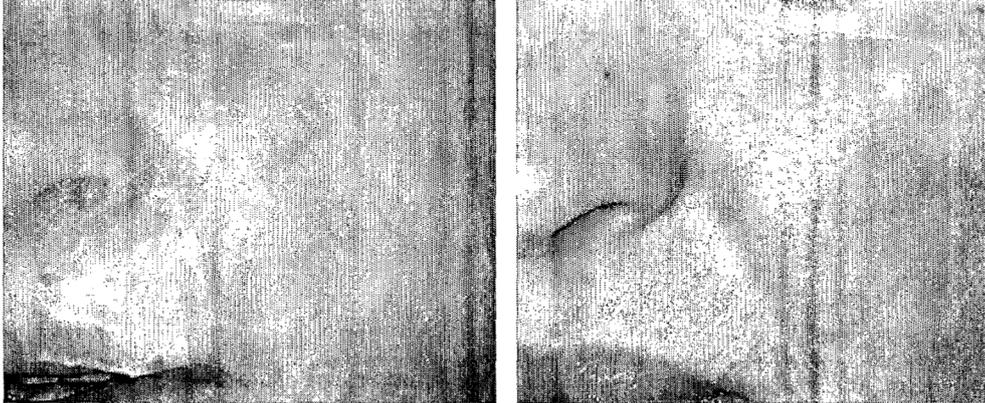
**FIG. 4**



FIG. 5



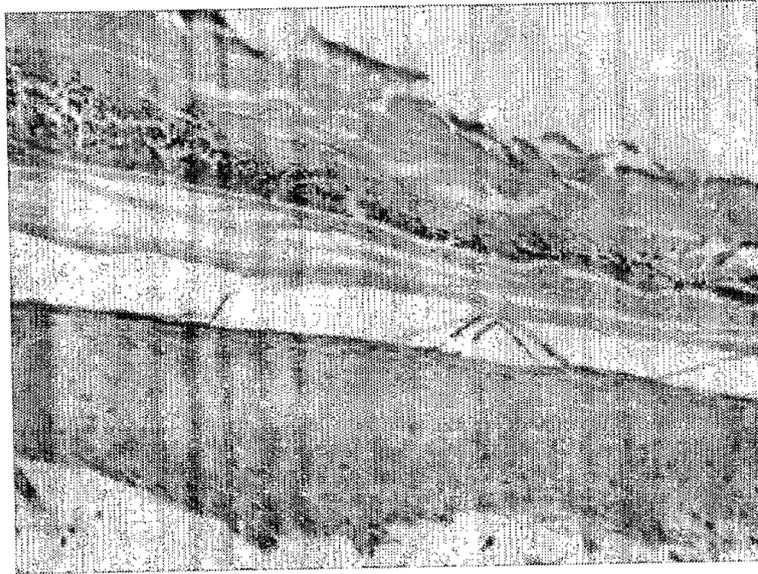
**FIG. 6**



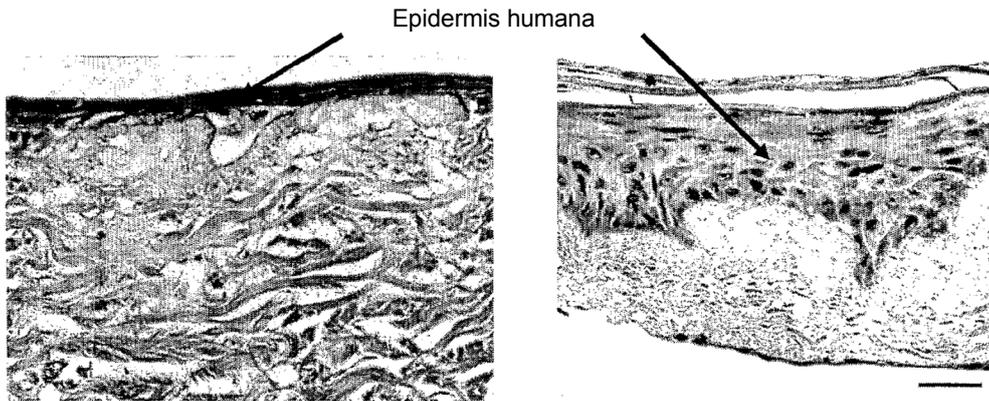
Conformación y adhesión de la cubierta a la herida sin vendaje externo

Quemadura de 2º grado tras curación y el autodesprendimiento de la cubierta

**FIG. 7**



**FIG. 8**



Piel re combinada con queratinocitos humanos cultivados en una inmersión sobre una matriz acelular porcina según la invención

Piel re combinada con queratinocitos humanos cultivados sobre la interfaz de aire y matriz acelular porcina según la invención