

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 763 799**

51 Int. Cl.:

<b>A61L 27/36</b>	(2006.01)
<b>A61L 27/24</b>	(2006.01)
<b>A61L 27/56</b>	(2006.01)
<b>A61L 27/58</b>	(2006.01)
<b>A61L 27/48</b>	(2006.01)
<b>A61L 27/52</b>	(2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.12.2016 PCT/CN2016/111926**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **29.06.2017 WO17107997**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.12.2016 E 16877807 (4)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.10.2019 EP 3369439**

54 Título: **Procedimiento para preparar un armazón de crecimiento celular con propiedades de memoria estructural**

30 Prioridad:

**25.12.2015 CN 201510986265**

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

**01.06.2020**

73 Titular/es:

**BEIJING RUIJIAN GAOKE BIOTECHNOLOGY CO., LTD. (100.0%)  
Room No.102 and 202, Building No.15, Chaoqian Road No.A1, Science and Technology Park ,Changping District Beijing 102200, CN**

72 Inventor/es:

**SUN, WENQUAN y HUANG, SENLI**

74 Agente/Representante:

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

**ES 2 763 799 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

Procedimiento para preparar un armazón de crecimiento celular con propiedades de memoria estructural

5 **Sector técnico**

La presente invención se refiere a un procedimiento para preparar un armazón de crecimiento celular, que es un armazón de crecimiento celular poroso, que no tiene reticulación química, y tiene una actividad biológica, una estructura tridimensional estable y una característica de memoria estructural, para su utilización en los sectores de la ciencia de los materiales, la ingeniería de tejidos y la medicina regenerativa, en particular, a un procedimiento para preparar un armazón de crecimiento celular que tenga una propiedad de memoria estructural.

**Estado de la técnica anterior**

15 Debido a que las lesiones, los traumatismos y la cirugía provocan a menudo defectos en los tejidos blandos de un cuerpo humano, la medicina moderna debe resolver el problema que representa el crecimiento por sí mismo de los tejidos blandos necesarios para los cuerpos humanos. Se han desarrollado localmente y en el extranjero diversos materiales de relleno y apósitos para la reparación de defectos de tejidos blandos, entre los que se incluyen un hidrogel y un material de relleno de tipo esponja poroso preparado a base de materiales poliméricos sintetizados artificialmente y materiales biológicos naturales. El colágeno purificado mediante tratamiento ácido o enzimático con tejidos animales como materias primas, se puede preparar en un hidrogel de colágeno, y la estabilidad del colágeno en una formulación de hidrogel se puede mejorar mediante un tratamiento apropiado de reticulación química, de modo que el colágeno no sea fácil de degradar *in vivo*. La suspensión o hidrogel de colágeno se puede preparar en un material de esponja de colágeno poroso mediante liofilización, y mediante un tratamiento de fijación de reticulación química posterior, no solo se puede aumentar la estabilidad del colágeno en el material de esponja, sino que también se puede retener la propiedad estructural porosa del material de esponja de colágeno. El material de esponja de colágeno poroso se utiliza ampliamente en la medicina clínica en la hemostasia de heridas, el relleno de sitios de defectos tisulares y el transporte de fármacos, etc.

30 Las bibliografías de Patente china CN1235947C y CN101549171B dan a conocer procedimientos específicos para preparar estos materiales de esponja de colágeno, respectivamente. En las que, la solución técnica dada a conocer en la bibliografía de Patente CN1235947C es remojar tejidos animales (piel, cartílago, tendón, etc.) con contenidos ricos en colágeno con una solución de ácido clorhídrico o ácido acético a temperatura ambiente, obtener una malla de colágeno extracelular de los tejidos animales después de la enzimólisis, obtener una suspensión de colágeno mediante el tratamiento de molienda y homogeneización, y colocar la suspensión de colágeno en un molde, para preparar un relleno de esponja de colágeno mediante conformación por extrusión y liofilización, en el que se utiliza el tratamiento con un reticulante químico antes de la liofilización o después de la misma. La bibliografía de Patente CN101549171B propone que, después de extraer la solución de colágeno tipo II de alta pureza, la solución de colágeno tipo II se concentra con polietilenglicol, y posteriormente el colágeno de tipo II concentrado se reticula con un reticulante que contiene carbodiimida y N-hidroxisuccinimida, y se liofiliza para producir una esponja de colágeno.

Las soluciones técnicas anteriores obtienen, ambas, una esponja de colágeno mediante reticulación química, pero las deficiencias son obvias: la esponja de colágeno preparada por acidificación y enzimólisis tiene inconvenientes tales como poca estabilidad, falta de actividad biológica y degradación rápida.

45 Además, en el sector técnico, se añaden también otros materiales de macromoléculas biológicas, tales como hialuronato de sodio, quitosana, quitina, sulfato de condroitina, en la preparación de una esponja de colágeno para preparar un material de esponja compuesto y se mejoran las propiedades biológicas de la esponja de colágeno. Por ejemplo, la bibliografía de Patente china CN101862475B da a conocer una solución técnica en la que se añade hialuronato de sodio a la solución de colágeno, seguido de reticulación química para preparar un material compuesto de colágeno. En la bibliografía de Patente china CN103007336 A, se añade quitosana al colágeno de piel de pescado y después de la liofilización y la reticulación, el material se liofiliza nuevamente para preparar una esponja compuesta a base de colágeno de piel de pescado. Aunque la estabilidad de la esponja de colágeno se mejoró mediante el tratamiento de reticulación química, y el material compuesto de la esponja de colágeno que contiene otras macromoléculas biológicas tales como el ácido hialurónico y la quitosana tiene una mejor actividad biológica, la estabilidad de estos materiales de esponja disminuye significativamente aún después de la esterilización por radiación, y es probable que tenga lugar una inflamación relativamente grave en el relleno de grandes áreas de tejidos blandos o en la reparación de heridas.

60 Mientras que la solución técnica anterior mejora la estabilidad de la esponja de colágeno por medio de una reticulación química, y el material compuesto de esponja de colágeno que contiene otras macromoléculas biológicas, tales como el ácido hialurónico y la quitosana tiene una mejor actividad biológica, existe todavía un problema en la práctica de que la estabilidad de estos materiales de esponja disminuye significativamente después de la esterilización por radiación, especialmente, es probable que ocurra una inflamación relativamente grave en el relleno de grandes áreas de tejidos blandos o en la reparación de heridas.

La bibliografía de Patente US2012/0263763A1 describe un material de esponja basado en matriz tisular acelular fibrótico. Un procedimiento para preparar este material es preparar un material de esponja basado en matriz tisular con piel de cerdo como materia prima, seguido de eliminación de la grasa, ultracriotomía, descelularización y eliminación de antígenos, limpieza, homogeneización fibrótica, inactivación de virus, esterilización y liofilización de la suspensión de matriz acelular, el material de esponja liofilizado se puede esterilizar con oxirano o radiación. El efecto positivo generado por este procedimiento es hacer que este material de matriz tisular extracelular retenga mejor las características estructurales básicas de la matriz tisular original sin utilizar reticulación química; además del componente de colágeno, también están contenidos otros componentes importantes de la matriz tisular extracelular, tales como elastina, fibronectina y proteoglicano; sin tratamiento con ácido y sin enzimas en el proceso de preparación, este material de esponja tiene una buena biocompatibilidad, es compatible con el rápido crecimiento de las células huésped y tiene una mejor estabilidad del colágeno, lo que reduce la respuesta inflamatoria. Sin embargo, el problema existente es que este material de esponja obtenido por este procedimiento tiene una resistencia y elasticidad de estructura deficientes, es propenso a aplastarse y deformarse después de ser presionado, y no puede mantener la estructura del material original y recuperar la forma original.

Al resumir los procedimientos técnicos dados a conocer en las bibliografía anteriores, el problema importante es: no importa si se utiliza el hidrogel de colágeno purificado después de la acidólisis o la enzimólisis, o se utiliza la suspensión de material de matriz tisular homogeneizada después de la descelularización, cuando se prepara un material de esponja de colágeno poroso, la técnica anterior liofiliza en primer lugar el hidrogel o la suspensión, seguido de un tratamiento de reticulación química adicional para mejorar la resistencia mecánica del material y aumentar la estabilidad del colágeno en el material de esponja, el tratamiento de reticulación química hace que el material de matriz tisular pierda muchas características naturales excelentes, poseídas inherentemente por el armazón de crecimiento celular poroso,

La Patente CN104107456 da a conocer un agregado de colágeno estructuralmente estable libre de antígenos que puede ser utilizado como material de armazón de ingeniería de tejidos y su preparación a partir de piel o tendón de animales que se cortan, purifican y descelularizan y posteriormente se sumergen en una solución acética, se someten a centrifugación múltiple, se liofilizan y se esterilizan para obtener agregados de colágeno libres de antígenos que contienen principalmente fibras de colágeno y haces de fibras de colágeno.

### Contenido de la invención

El problema técnico a resolver en la presente invención es dar a conocer un procedimiento para preparar un armazón de crecimiento celular que tenga una propiedad de memoria estructural, el armazón preparado por este procedimiento no solo tiene una excelente biocompatibilidad y una completa biodegradabilidad, sino que también es compatible con el crecimiento de las células y el crecimiento de tejidos y órganos *in vivo* e *in vitro*.

Por lo tanto, la solución técnica que resuelve dicho problema en la presente invención es: un procedimiento para preparar un armazón de crecimiento celular que tiene una propiedad de memoria estructural, en el que, el procedimiento comprende: **etapa 1**, recolección de materia prima: recoger una materia prima de tejido biológico para preparar una matriz de tejido acelular, incluyendo dicha materia prima, sin que constituya limitación, piel, cartílago, vasos sanguíneos, menisco, estómago, intestino delgado, intestino grueso, diafragma, tendón, ligamento, tejido nervioso, vejiga y uretra de un cuerpo humano o animal, un tejido rico en colágeno que se corta y separa, en piezas pequeñas o pequeñas láminas de 1-20 mm; **etapa 2**, desinfección de la materia prima: remojar las piezas pequeñas o láminas pequeñas obtenidas en la etapa 1 con carbonato de sodio al 2 % durante 4~48 horas o con otra solución alcalina con un pH de 10,5~12,5; **etapa 3**, tratamiento de descelularización: tratar las piezas pequeñas o láminas pequeñas remojadas en la etapa 2 para descelularizarlas con desoxicolato de sodio al 0,1-2,0 %, Triton X-100, o con 10~200 unidades por litro de dispasa durante 4~36 horas; **etapa 4**, enjuague de un material de matriz de tejido acelular: después del tratamiento de descelularización en la etapa 3, enjuagar las piezas pequeñas o láminas pequeñas con 1-6 litros de solución salina normal u otra solución isosmótica neutra por kilogramo de material 2-5 veces, cada vez durante 1~12 horas; **etapa 5**: trituración de la matriz de tejido acelular: después del enjuague del material de matriz de tejido acelular en la etapa 4, triturar las pequeñas piezas o láminas pequeñas con una picadora para moler el material de la matriz de tejido acelular en un material de matriz de tejido acelular microfibroso o floculante; **etapa 6**, tratamiento de acidificación: remojar del material de matriz de tejido acelular microfibroso o floculante obtenido en la etapa 5 en 5~200 ml de una solución de ácido clorhídrico o ácido acético con pH ajustado a 2,8-3,5 para realizar el tratamiento de acidificación durante 1~24 horas, triturar y moler posteriormente el material de matriz en partículas de tipo hidrogel, y ajustar el pH a 4,0-6,5 con una solución de hidróxido de sodio; **etapa 7**, mezcla y moldeo por inyección: mezclar uniformemente el material de matriz de tejido acelular microfibroso o floculante en una proporción del 60~90 % con el material de matriz de tejido acelular de tipo hidrogel tratado por acidificación en una proporción de 40~10 a temperatura ambiente de 20~30 °C y, posteriormente, inyectarlo en un molde de envasado; **etapa 8**, tratamiento de congelación: colocar el molde que contiene una suspensión de material de matriz de tejido acelular en un congelador a -20 °C o menos para ultracongelación, o ultracongelación adicional después de la primera descongelación para aumentar la estructura de huecos de la suspensión; **etapa 9**, tratamiento con radiación: tratar el material ultracongelado con rayos X, rayos gamma o haz de electrones; **etapa 10**, preparar el material de matriz de tejido acelular tratado en la etapa 9 en un perfil de armazón de crecimiento celular poroso sólido que no tiene reticulación química, y tiene una actividad biológica, una estructura tridimensional estable y una

característica de memoria estructural. Y el material de matriz de tejido acelular del almacén de crecimiento celular poroso en dicha **etapa 10** es un material de matriz de tejido acelular microfibroso o floculante que tiene un diámetro de fibra de 2-250 micras y una longitud de 100-3.000 micras y un material de matriz de tejido acelular de tipo hidrogel tratado por acidificación que tiene un diámetro de partículas de 2-150 micras. El contenido de los materiales de matriz de tejido acelular total en el material de matriz es de 10-100 mg/cm<sup>3</sup>, el espacio hueco total es del 90~99 % y el espacio hueco del material de matriz con partículas mayores de 25 micras es del 80~98 %. El material de matriz de tejido acelular microfibroso o floculante en dicho almacén representa el 60 %~90 % en proporción de masa en peso seco, y dicho material de matriz de tejido acelular de tipo hidrogel tratado por acidificación representa el 40 %~10 % en proporción de masa en peso seco.

En comparación con el estado de la técnica anterior, el almacén de crecimiento preparado mediante el procedimiento de preparación dado a conocer en la presente invención es un almacén de crecimiento celular poroso que no tiene reticulación química y tiene una actividad biológica, una estructura tridimensional estable y una propiedad de memoria estructural, que es un material poroso que tiene una propiedad especial que se prepara mezclando, en cierta proporción, un material de tejido fibroso o floculante y un material de hidrogel acidificado, seguido de procesos de congelación/descongelación y extrusión y radiación. Este almacén no solo tiene una excelente biocompatibilidad y una completa biodegradabilidad, sino que también es compatible con el crecimiento de las células y el crecimiento de tejidos y órganos *in vivo* e *in vitro*, por lo que es adecuado para la reparación de traumatismos y defectos de tejidos blandos humanos.

### Descripción de los dibujos

La figura 1 es un diagrama estructural esquemático de un ejemplo de la presente invención;

La figura 2 es un diagrama esquemático de una curva de calorimetría diferencial de barrido (DSC) del producto de almacén en la figura 1;

La figura 3 es un diagrama esquemático de una curva sobre la relación entre la estabilidad y el diámetro de partícula de dos materiales que forman el producto de almacén;

La figura 4 es un diagrama esquemático de una curva sobre la relación de la morfología de la formación del producto de almacén en la figura 1.

La figura 5 es un diagrama esquemático de un flujo para preparar el almacén de crecimiento celular que tiene la propiedad de memoria estructural en la presente invención.

### Descripción detallada de las realizaciones

Con referencia a la figura 5, la presente invención se refiere a un procedimiento para preparar un almacén de crecimiento celular que tiene una propiedad de memoria estructural, comprendiendo el procedimiento: **etapa 1**, recolección de materia prima: recoger una materia prima de tejido biológico para preparar una matriz de tejido acelular, incluyendo dicha materia prima, sin que constituya limitación, piel, cartílago, vaso sanguíneo, menisco, estómago, intestino delgado, intestino grueso, diafragma, tendón, ligamento, tejido nervioso, vejiga y uretra de un cuerpo humano o animal, un tejido rico en colágeno que se corta y separa, en piezas pequeñas o láminas pequeñas de 1-20 mm; **etapa 2**, desinfección de la materia prima: remojar las pequeñas piezas o pequeñas láminas obtenidas en la etapa 1 con carbonato de sodio al 2 % durante 4~48 horas o con otra solución alcalina con un pH de 10,5~12,5; **etapa 3**, tratamiento de descelularización: tratar las piezas pequeñas o láminas pequeñas remojadas en la etapa 2 para descelularizarlas con desoxicolato de sodio al 0,1~2,0 %, Triton X-100, o con 10~200 unidades por litro de enzima neutra durante 4~36 horas; **etapa 4**, enjuague de un material de matriz de tejido acelular: después del tratamiento de descelularización en la etapa 3, enjuagar las piezas pequeñas o láminas pequeñas con 1-6 litros de solución salina normal u otra solución isosmótica neutra por kilogramo de material 2-5 veces, cada vez durante 1~12 horas; **etapa 5**: trituración de la matriz de tejido acelular: después del enjuague del material de la matriz de tejido acelular en la etapa 4, triturar las piezas pequeñas o láminas pequeñas con una picadora para moler el material de matriz de tejido acelular en un material de matriz de tejido acelular microfibroso o floculante; **etapa 6**, tratamiento de acidificación: remojar el material de matriz de tejido acelular microfibroso o floculante obtenido en la etapa 5 en 5~200 ml de una solución de ácido clorhídrico o ácido acético con pH ajustado a 2,8~3,5 para realizar el tratamiento de acidificación durante 1~24 horas, triturar y moler posteriormente el material de la matriz en partículas de tipo hidrogel, y ajustar el pH a 4,0-6,5 con una solución de hidróxido de sodio; **etapa 7**, mezcla y moldeo por inyección: mezclar uniformemente el material de matriz de tejido acelular microfibroso o floculante en una proporción del 60~90 % con el material de matriz de tejido acelular de tipo hidrogel tratado por acidificación en una proporción de 40~10 a temperatura ambiente de 20~30 °C y, posteriormente, inyectarlo en un molde de envasado; **etapa 8**, tratamiento de congelación: colocar el molde que contiene una suspensión de material de matriz de tejido acelular en un congelador a -20 °C o menos para ultracongelación, o ultracongelación adicional después de la primera descongelación para aumentar la estructura de huecos de la suspensión; **etapa 9**, tratamiento con radiación: tratar el material ultracongelado con rayos X, rayos gamma o haz de electrones; **etapa 10**, preparar el material de matriz de tejido acelular tratado en la etapa 9 en un perfil de almacén de crecimiento celular poroso sólido que no tiene

reticulación química, y tiene una actividad biológica, una estructura tridimensional estable y una característica de memoria estructural. Y el material de matriz de tejido acelular del armazón de crecimiento celular poroso en dicha **etapa 10** es un material de matriz de tejido acelular microfibrroso o floculante que tiene un diámetro de fibra de 2-250 micras y una longitud de 100-3.000 micras y un material de matriz de tejido acelular de tipo hidrogel tratado por acidificación que tiene un diámetro de partículas de 2-150 micras. El contenido de los materiales de matriz de tejido acelular total en el material de matriz es de 10~100 mg/cm<sup>3</sup>, el espacio hueco total es del 90~99 % y el espacio hueco del material de matriz con partículas mayores de 25 micras es del 80~98 %. El material de matriz de tejido acelular microfibrroso o floculante en dicho armazón representa el 60 %~90 % en proporción de masa en peso seco, y dicho material de matriz de tejido acelular de tipo hidrogel tratado por acidificación representa el 40 %~10 % en proporción de masa en peso seco.

Por ejemplo, la figura 1 muestra un diagrama esquemático de la estructura morfológica de algunos productos involucrados en la presente invención, en la que, (A) en la figura es un armazón de crecimiento celular en forma de disco y forma de cilindro; (B) en la figura es un armazón de crecimiento celular en forma de pilar con un diámetro de 1,8 cm y una altura de 3,0 cm, que está en estado de contracción bajo una acción de presión (pellizcado con los dedos); (C) en la figura es el armazón que se recupera a la estructura y forma tridimensional original estable después de que se libere la presión (pellizcado con los dedos). Específicamente, el armazón de crecimiento celular preparado contiene 43 mg de material de matriz acelular por centímetro cúbico, es decir, el contenido de peso seco de la matriz de tejido es del 4,3 %. El armazón de crecimiento celular tiene buena elasticidad, el armazón en forma de cilindro con un diámetro de 1,8 cm y una altura de 3,0 cm puede contraerse a una altura de 5 mm bajo la acción de la presión, puede recuperar completamente la estructura y forma tridimensional estable original después de que se libere la presión, y no se deformará bajo múltiples presiones repetidas.

Por ejemplo, la figura 2 muestra un diagrama esquemático de la curva del calorímetro diferencial de barrido (DSC) del material de matriz tisular después de descelularizarse mediante una solución de desoxicolato de sodio al 0,5 %; en la que, (A) en la figura es un material de matriz de tejido acelular microfibrroso o floculante; (B) en la figura son partículas de tipo hidrogel de una matriz de tejido acelular después de ser tratadas con una solución de ácido acético 50 mM; (C) en la figura es un armazón de crecimiento celular preparado a partir del 70 % de material de matriz de tejido acelular microfibrroso y el 30 % de partículas de tipo hidrogel tratadas por acidificación. Específicamente, se utilizó el calorímetro diferencial de barrido (DSC) para comparar y medir las propiedades de estabilidad térmica de los materiales: (A) el material de matriz de tejido microfibrroso o floculante, (B) el material de matriz de tejido de tipo hidrogel tratado por acidificación, (C) el armazón de crecimiento celular preparado a partir del 70 % de material de matriz de tejido acelular microfibrroso en una proporción en peso seco y el 30 % de partículas de tipo hidrogel tratadas por acidificación en una proporción en peso seco. La temperatura de desnaturalización inicial del material de matriz de tejido microfibrroso o floculante es de 56,7 °C, el valor de entalpía térmica es de -56,4 J/gps (gramo de peso seco); la temperatura de desnaturalización inicial del material de matriz tisular de tipo hidrogel después del tratamiento de acidificación es de 39,0 °C, el valor de entalpía térmica es de -39,4 J/gps, lo que sugiere que la estructura helicoidal triple del colágeno después del tratamiento de acidificación se ha expandido para estar suelta e inestable; la temperatura de desnaturalización inicial del armazón de crecimiento celular preparado finalmente es de 55,3 °C, el valor de entalpía térmica es -54,3 J/gps, que conserva básicamente la estabilidad del material de matriz extracelular de la dermis de cerdo natural.

Por ejemplo, la figura 3 muestra un diagrama esquemático de la curva de la relación entre la estabilidad y el diámetro de partícula de las partículas de tipo hidrogel de la matriz de tejido acelular después del tratamiento de descelularización con una solución de desoxicolato de sodio al 0,5 % y el tratamiento con un ácido acético 50 mM. Específicamente, la estabilidad de las partículas de tipo hidrogel de la matriz de tejido acelular después de ser tratadas con ácido acético 50 mM está asociada con el diámetro de partícula (figura 3). Cuando el diámetro promedio de partícula disminuye de 140 micras a, aproximadamente, 15 micras, la temperatura de desnaturalización inicial disminuye de 55 °C a 35 °C, que es más baja que la temperatura corporal normal del ser humano. Cuanto más pequeña es la partícula de tipo hidrogel, peor es la estabilidad térmica.

En combinación con las figuras anteriores, se puede observar claramente cómo se consigue un armazón de crecimiento celular que tiene una propiedad de memoria estructural que se utiliza ampliamente en los sectores de la cirugía general, ortopedia, cirugía plástica, ingeniería de tejidos y medicina regenerativa, etc. mediante el procedimiento de preparación de la presente invención.

Para ser más específico, el denominado material de matriz para el crecimiento celular es un material que consiste en dos materiales de matriz de tejido acelular que tienen diferentes propiedades en una cierta proporción, es decir, las materias primas se derivan, sin que constituyan limitación, de piel, cartílago, vaso sanguíneo, menisco, estómago, intestino delgado, intestino grueso, diafragma, tendón, ligamento, tejido nervioso, vejiga y uretra, etc. del cuerpo humano o animal. El tejido rico en colágeno se corta y se separa, en piezas pequeñas o pequeñas láminas de 1-20 mm. Después de obtener dos materiales de matriz de tejido acelular que tienen diferentes propiedades, se puede producir el armazón de crecimiento celular que tiene la propiedad de memoria estructural. Por ejemplo, en primer lugar, se resuelve el problema de la estructura del tejido del armazón de crecimiento celular biológico, en este ejemplo dicho armazón se forma mezclando, en las respectivas proporciones de masa en peso seco, un material de matriz de tejido acelular microfibrroso o floculante que tiene un diámetro de fibra de 2-250 micras y una longitud de

100-3.000 micras con un material de matriz de tejido acelular de tipo hidrogel tratado por acidificación que tiene un diámetro de partículas de 2-150 micras, seguido de procesos de moldeo por inyección, congelación, compresión, radiación, entretejido de nuevo, en los cuales, el material de matriz para el crecimiento celular es el material de matriz para el armazón de crecimiento celular, el contenido de los materiales de matriz de tejido acelular total en el material de matriz para el armazón de crecimiento celular debe definirse dentro de un intervalo de 10~100 mg/cm<sup>3</sup>, la fracción total de huecos es del 90~99 % y, la fracción de huecos del material de matriz con partículas mayores de 25 micras está en el intervalo del 80~98 %. Durante la producción del armazón de crecimiento celular, la solución preferente es ajustar en el armazón la proporción del material de matriz de tejido acelular microfibroso o floculante para que sea del 60 %~90 % en proporción de masa en peso seco, y el material de matriz de tejido acelular de tipo hidrogel tratado por acidificación debe ser el 40 %~10 % en proporción de masa en peso seco; en el proceso de moldeo por inyección, el material de matriz de tejido acelular microfibroso o floculante y el material de matriz de tejido acelular de tipo hidrogel tratado por acidificación deben mezclarse uniformemente en una suspensión y posteriormente inyectarse en un molde; en el proceso de congelación, la suspensión mixta en el molde se puede producir en un cristal de hielo solo en las condiciones de -20 °C y después del tratamiento de radiación por rayos gamma, o un proceso de congelación se completa mediante un proceso de congelación-descongelación de la suspensión mezclada en el molde, como mínimo, dos veces; en los procesos de extrusión y entretejido de nuevo, el cristal de hielo debe extruirse para volver a entretejer el material de matriz de tejido acelular microfibroso o floculante y el material granular de matriz de tejido acelular de tipo hidrogel tratado por acidificación en la suspensión para producir una material de armazón poroso de crecimiento celular que tiene una estructura tridimensional estable y una propiedad de memoria de estructura. Solo después de someterse a los procesos anteriores puede producirse un material de armazón poroso de crecimiento celular que tenga una estructura tridimensional estable y una característica de memoria estructural en productos de armazón en diversas formas.

#### Ejemplos:

Ejemplo 1, se recolectó piel de cerdo fresca de un cuerpo de cerdo recién sacrificado y depilado, se eliminaron mecánicamente la grasa y la epidermis, y se tomó la dermis con un espesor de, aproximadamente, 1,5 mm. Después de que se lavaran la sangre y otras suciedades en la piel, se retiró manualmente el pelo restante en la piel. La dermis de cerdo se cortó en una pieza pequeña con una longitud de, aproximadamente, 1 cm y una anchura de, aproximadamente, 1 cm, y se enjuagó con agua purificada. Se pesaron 200 g de materia prima de dermis y se colocaron en un frasco de polipropileno de alta densidad de 1 l, a los que se añadieron 800 ml de solución alcalina que contenía carbonato de sodio al 2 % e hidróxido de sodio 10 mM, y se trataron en un lecho de agitación durante 20 horas (pH = 12,5). Después de tratarse con la solución alcalina, se utilizó una solución de ácido acético 0,5 M para realizar la neutralización ácido-base. Se desechó la solución después de la neutralización, se añadieron 800 ml de solución tampón de ácido hidroxietilpiperazinanosulfónico 5 mM (pH = 7,5) que contenía desoxicolato de sodio al 0,5 % y ácido etilendiaminetetraacético disódico 5 mM, y se trató en el lecho de agitación a temperatura ambiente durante la noche (aproximadamente 20 horas) para la descelularización. La pieza pequeña de material de dermis que se había sometido al tratamiento de descelularización se enjuagó rápidamente con solución salina normal estéril dos veces, cada una durante 30-60 minutos. La pieza pequeña de material de dermis se molió con un molino de alta velocidad, para preparar un material fino de matriz de tejido acelular, de modo que la anchura promedio de las partículas de tejido estuviera entre 500-2.000 micras y la longitud estuviera entre 2.000-5.000 micras. El material de matriz se recogió utilizando un procedimiento centrífugo, y el sobrenadante superior se desechó. Se añadió solución salina normal estéril, de modo que se suspendió el material de la matriz que se había centrifugado y sedimentado, y el material de la matriz se centrifugó y se enjuagó nuevamente. Se añadieron 800 ml de solución de ácido peroxiacético al 0,1 % para el tratamiento durante 60 minutos. El material de matriz se centrifugó y se recogió. El material de matriz se lavó con solución salina normal estéril suspendiendo, agitando, centrifugando y recogiendo dos veces, cada una durante 30~60 minutos. Se añadieron 500 ml de solución tampón de fosfato disódico y ácido etilendiaminetetraacético 10 mM (pH = 7,5) por 50 g de material de matriz, y se molió y se trituró con el molino de alta velocidad, para preparar un material de matriz de tejido acelular microfibroso o floculante, de modo que el diámetro de la microfibrilla estaba entre 2-250 micras y la longitud entre 100-3.000 micras. Mediante centrifugación, se desechó el sobrenadante y se recogió el material de microfibrilla matriz centrifugado y sedimentado. El material de matriz microfibroso o floculante se suspendió en solución salina al 0,9 %, para obtener una suspensión de material de matriz de tejido extracelular, en la que el contenido del material de matriz microfibroso en la suspensión era del 4,9 %. Posteriormente, se tomó algo de material de matriz microfibroso o floculante, y se le añadió ácido acético, de modo que la concentración final de ácido acético fue de 50 mM. El material de matriz se expandió mediante el tratamiento de acidificación y, posteriormente, se molió de manera continua con el molino de alta velocidad, para preparar una partícula de tipo hidrogel con un tamaño de 10-250 micras, se ajustó el pH del hidrogel acidificado a 6,5 con una solución de hidróxido de sodio, y el contenido del material de hidrogel fue del 1,5 %. El material de matriz de tejido microfibroso o floculante y el material de matriz de tejido de tipo hidrogel tratado por acidificación se mezclaron en una proporción del 70 % respecto al 30 % en peso seco. La suspensión de materiales de matriz mezclados se añadió a un molde en forma de disco y forma de cilindro, y se congeló en un refrigerador a -20 °C. Se formó una estructura porosa por congelación. Después de la congelación, se utilizó un tratamiento de rayos gamma de 25 kGy para preparar un armazón de crecimiento celular que fuera estable, tuviera una característica de memoria estructural y pudiera almacenarse a temperatura ambiente.

Ejemplo 2, se recogió piel de cerdo fresca de un cuerpo de cerdo recién sacrificado y depilado, se eliminaron

mecánicamente la grasa y la epidermis, después de que se hubieran lavado la sangre y otra suciedad en la piel y se extrajera manualmente el pequeño pelo restante en la piel, la dermis de cerdo se cortó en una pieza pequeña con un espesor de aproximadamente 2 mm, una anchura de 1 cm y una longitud de 1 cm, y se enjuagó con agua purificada una vez, y se pesaron 200 g de materia prima y se colocaron en un frasco de polipropileno de alta densidad. Se añadió una solución alcalina (que contenía carbonato de sodio al 2 %, hidróxido de sodio 10 mM y Triton X-100 al 0,2 %) y se colocó en un lecho de agitación para el tratamiento con la solución alcalina durante 20 horas. Se añadió una solución de ácido acético para realizar la neutralización ácido-base. Se añadió lauril sulfato de sodio al 0,5 % (disuelto en ácido etilendiaminotetraacético disódico 5 mM y solución tampón de ácido hidroxietilpiperazinoetanosulfónico 5 mM) para la descelularización, y se hizo oscilar en el lecho de agitación a temperatura ambiente durante 20 horas. El material se enjuagó rápidamente con solución salina normal estéril dos veces, cada una durante 30-60 minutos. El material se trituró con un molino de alta velocidad, el material se trituró a un tamaño de una longitud de, aproximadamente, 2,0~4,0 mm y una anchura de, aproximadamente, 0,5~2,0 mm. El material de matriz se centrifugó y se recogió, y el sobrenadante se desechó. El material de matriz recogido se remojó en una solución de ácido peroxiacético al 0,1 % para tratamiento durante 2 horas, y se enjuagó con solución salina normal estéril durante 1~2 veces, cada una durante 30~60 minutos. El material enjuagado con la solución salina normal se enjuagó con una solución tampón de fosfato disódico ácido etilendiaminotetraacético 10 mM, y se molió y trituró con el molino de alta velocidad, el material se trituró a un tamaño de una longitud de, aproximadamente, 500~2.500 mm y una anchura de, aproximadamente, 50~500 mm, se centrifugó y se recogieron las microfibras de matriz, y se desechó el sobrenadante. Las microfibras de matriz se suspendieron en solución salina al 0,9 %, para preparar y obtener una suspensión de material de microfibras de matriz de tejido extracelular, en la que el contenido del material era del 4,6 %. Se tomó un tercio de la suspensión de material de microfibras, y el material se diluyó y se acidificó con una solución de ácido acético 50 mM. El material que había sido sometido al tratamiento de acidificación se molió y trituró con el molino de alta velocidad, para preparar un material de hidrogel. El material de hidrogel acidificado se neutralizó con una solución de hidróxido de sodio, con un pH ajustado a 6,5, para preparar y obtener el material de hidrogel con un contenido del 1,7 %. El material de matriz de tejido microfibroso o floculante y el material de hidrogel acidificado se mezclaron en una proporción del 80 % respecto al 20 % en peso seco, y los materiales de matriz mezclados se vertieron en un molde. Después de congelar en un refrigerador a -20 °C, se utilizó un tratamiento de rayos gamma de 25 kGy para preparar y obtener un armazón de crecimiento celular de tejido biológico. Tal como se muestra en la figura 4, se utilizó el calorímetro diferencial de barrido (DSC) para comparar y medir las propiedades de estabilidad térmica de los materiales: (A) un material de matriz de tejido microfibroso o floculante descelularizado con lauril sulfato de sodio al 0,5 %, (B) un material de matriz de tejido de tipo hidrogel tratado por acidificación, (C) un armazón de crecimiento celular preparado a partir del 80 % de material de matriz de tejido acelular microfibroso en una proporción en peso seco y el 20 % de partículas de tipo hidrogel tratadas por acidificación en una proporción en peso seco. La temperatura de desnaturalización inicial del material de matriz de tejido microfibroso o floculante descelularizado con lauril sulfato de sodio al 0,5 % es 53,1 °C, el valor de entalpía térmica es -49,2 J/gps; la temperatura de desnaturalización inicial del material de matriz de tejido de tipo hidrogel después del tratamiento de acidificación es de 34,9 °C, el valor de entalpía térmica es de -30,2 J/gps; la temperatura de desnaturalización inicial del armazón de crecimiento celular finalmente preparado es de 53,3 °C, el valor de entalpía térmica es de -50,3 J/gps, que conserva básicamente la estabilidad del material de matriz extracelular de la dermis de cerdo natural.

## REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para preparar un almacén de crecimiento celular que tiene una propiedad de memoria estructural, en el que, el procedimiento comprende: **etapa 1**, recolección de materia prima: recoger una materia prima de tejido biológico para preparar una matriz de tejido acelular, incluyendo dicha materia prima, sin que constituya limitación, piel, cartílago, vaso sanguíneo, menisco, estómago, intestino delgado, intestino grueso, diafragma, tendón, ligamento, tejido nervioso, vejiga y uretra de un cuerpo humano o animal, un tejido rico en colágeno que se corta y se separa, en pequeñas piezas o pequeñas láminas de 1-20 mm; **etapa 2**, desinfección de la materia prima: remojar las pequeñas piezas o pequeñas láminas obtenidas en la etapa 1 con carbonato de sodio al 2 % durante 4~48 horas o con otra solución alcalina con un pH de 10,5~12,5; **etapa 3**, tratamiento de descelularización: tratar las piezas pequeñas o láminas pequeñas remojadas en la etapa 2 para descelularizarlas con desoxicolato de sodio al 0,1~2,0 %, Triton X-100, o con 10~200 unidades por litro de enzima neutra durante 4~36 horas; **etapa 4**, enjuague de un material de matriz de tejido acelular: después del tratamiento de descelularización en la etapa 3, enjuagar las piezas pequeñas o láminas pequeñas con 1-6 litros de solución salina normal u otra solución isosmótica neutra por kilogramo de material 2-5 veces, cada vez durante 1~12 horas; **etapa 5**: trituración de la matriz de tejido acelular: después del enjuague del material de matriz de tejido acelular en la etapa 4, triturar las piezas pequeñas o láminas pequeñas con una picadora para moler el material de matriz de tejido acelular en un material de matriz de tejido acelular microfibroso o floculante; **etapa 6**, tratamiento de acidificación: remojar el material de matriz de tejido acelular microfibroso o floculante obtenido en la etapa 5 en 5~200 ml de una solución de ácido clorhídrico o ácido acético con pH ajustado a 2,8~3,5 para realizar el tratamiento de acidificación durante 1~24 horas, triturar y moler posteriormente el material de matriz en partículas de tipo hidrogel, y ajustar el pH a 4,0~6,5 con una solución de hidróxido de sodio; **etapa 7**, mezcla y moldeo por inyección: mezclar uniformemente el material de matriz de tejido acelular microfibroso o floculante en una proporción del 60~90 % con el material de matriz de tejido acelular de tipo hidrogel tratado por acidificación en una proporción de 40~10 a temperatura ambiente de 20~30 °C y, posteriormente, inyectarlo en un molde de envasado; **etapa 8**, tratamiento de congelación: colocar el molde que contiene una suspensión de material de matriz de tejido acelular en un congelador a -20 °C o menos para ultracongelación, o ultracongelación adicional después de la primera descongelación para aumentar la estructura de huecos de la suspensión; **etapa 9**, tratamiento con radiación: tratar el material ultracongelado con rayos X, rayos gamma o haz de electrones; **etapa 10**, preparar el material de matriz de tejido acelular tratado en la etapa 9 en un almacén de crecimiento celular poroso que se puede almacenar a temperatura ambiente.
2. Procedimiento para preparar el almacén de crecimiento celular que tiene la propiedad de memoria estructural, según la reivindicación 1, en el que el material de matriz de tejido acelular del almacén de crecimiento celular poroso en dicha **etapa 10** es un material de matriz de tejido acelular microfibroso o floculante que tiene un diámetro de fibra de 2-250 micras y una longitud de 100-3.000 micras y un material de matriz de tejido acelular de tipo hidrogel tratado por acidificación que tiene un diámetro de partículas de 2-150 micras.
3. Procedimiento para preparar el almacén de crecimiento celular que tiene la propiedad de memoria estructural, según la reivindicación 2, en el que el contenido de los materiales de matriz de tejido acelular total en el material de matriz es de 10~100 mg/cm<sup>3</sup>, el espacio hueco total es del 90~99 % y el espacio hueco del material de matriz con partículas mayores de 25 micras es del 80~98 %.
4. Procedimiento para preparar el almacén de crecimiento celular que tiene la propiedad de memoria estructural, según la reivindicación 2, en el que el material de matriz de tejido acelular microfibroso o floculante en dicho almacén representa el 60 %~90 % en proporción de masa en peso seco, y dicho material de matriz de tejido acelular de tipo hidrogel tratado por acidificación representa el 40 %~10 % en proporción de masa en peso seco.

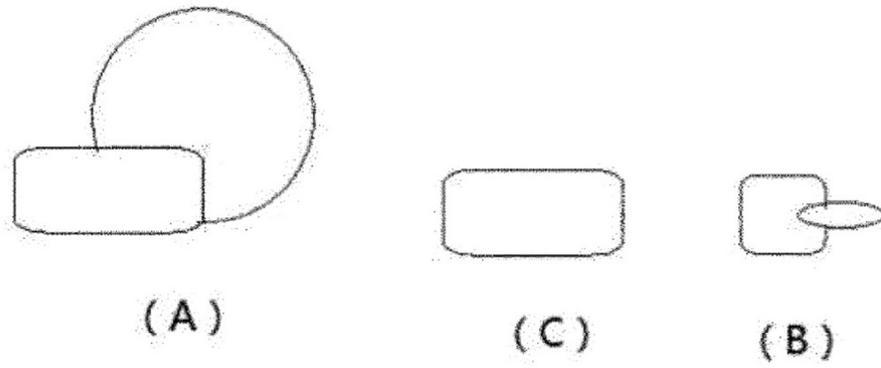


FIG. 1

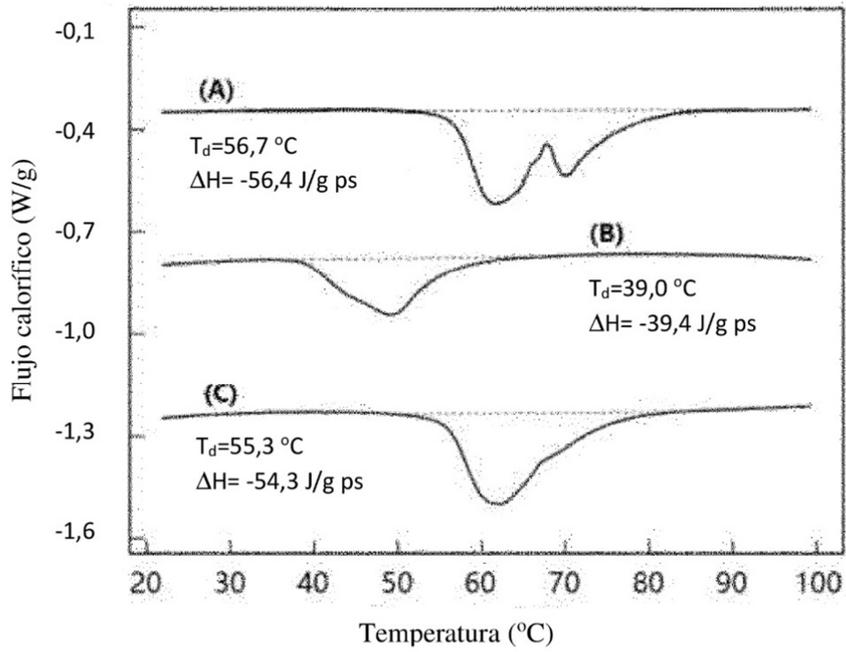


FIG. 2

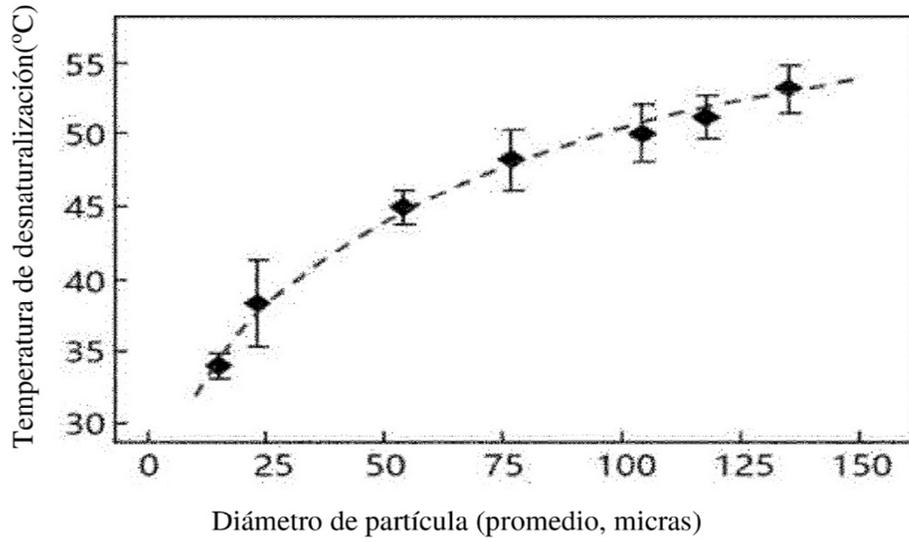


FIG. 3

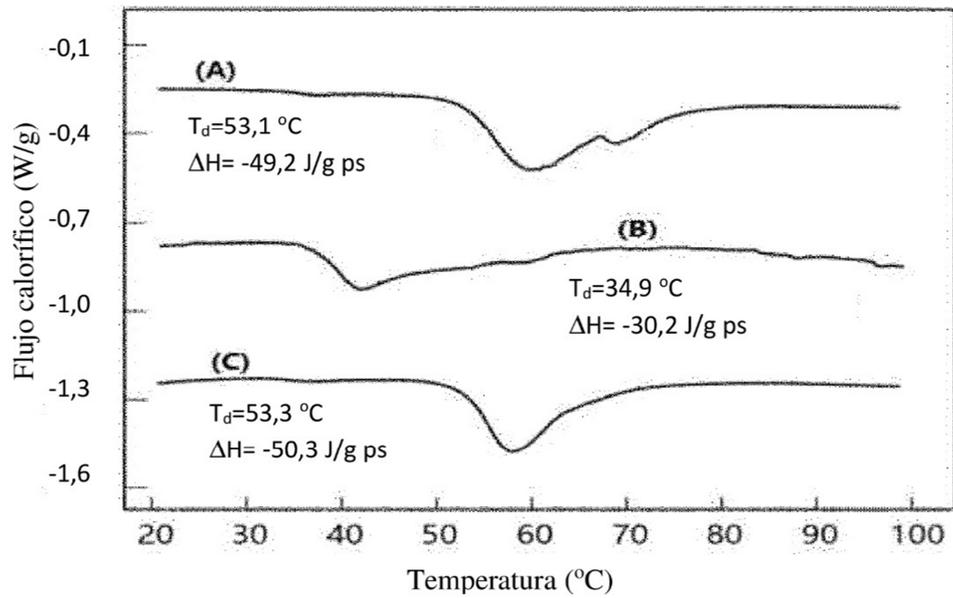


FIG. 4

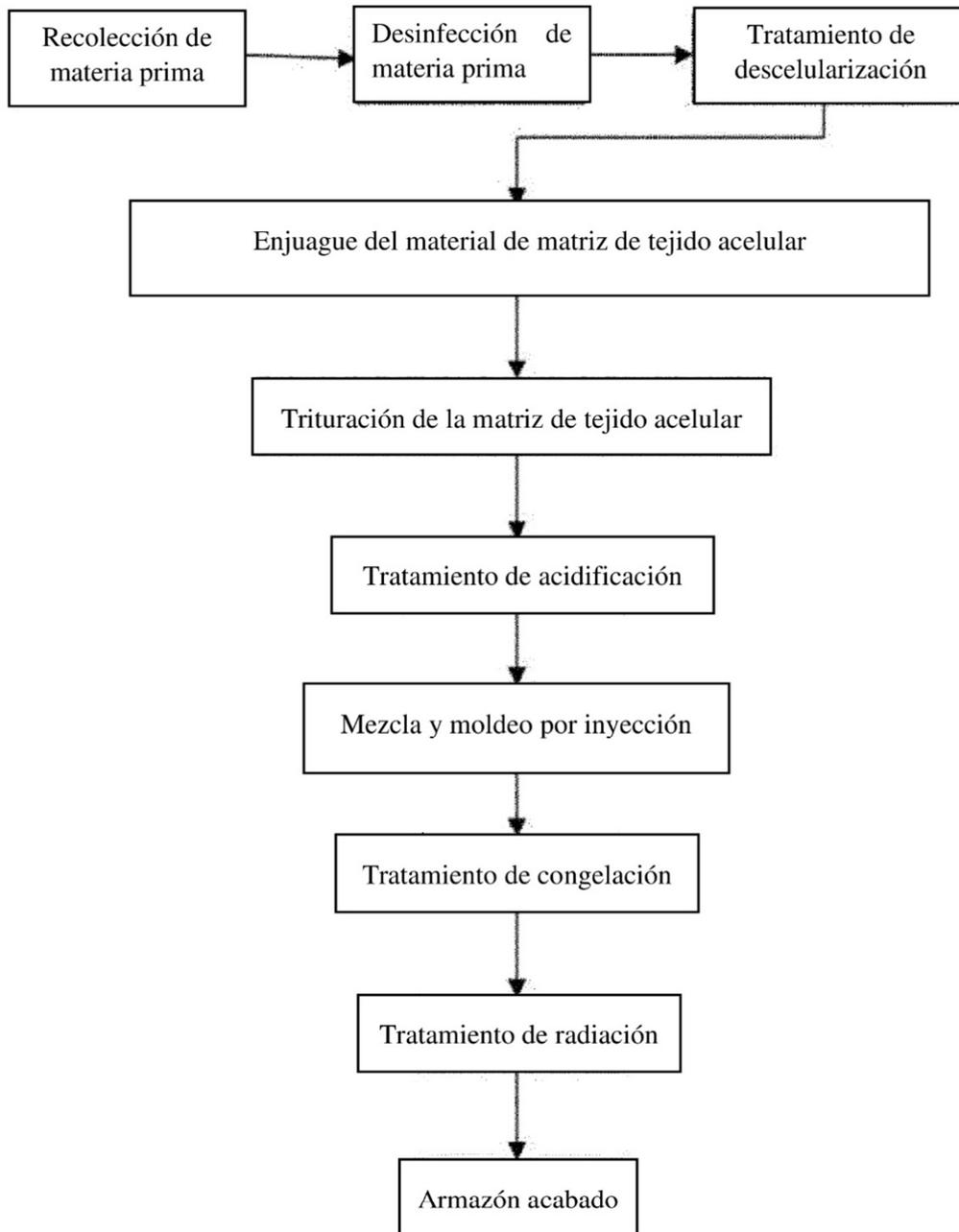


FIG. 5

**REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN**

5 *Esta lista de referencias citada por el solicitante es únicamente para mayor comodidad del lector. No forman parte del documento de la Patente Europea. Incluso teniendo en cuenta que la compilación de las referencias se ha efectuado con gran cuidado, los errores u omisiones no pueden descartarse; la EPO se exime de toda responsabilidad al respecto.*

**Documentos de patentes citados en la descripción**

10

- CN 1235947 C
- CN 101549171 B
- CN 101862475 B
- CN 103007336 A
- US 20120263763 A1
- CN 104107456