

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 826 392**

51 Int. Cl.:

**A61L 27/44** (2006.01)

**A61L 27/48** (2006.01)

**A61L 27/52** (2006.01)

**A61L 27/54** (2006.01)

**A61L 27/60** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.11.2014 PCT/US2014/066344**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.05.2015 WO15077300**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.11.2014 E 14863949 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.08.2020 EP 3071248**

54 Título: **Materiales de almacén de tejido para la regeneración de tejido y métodos de fabricación**

30 Prioridad:

**19.11.2013 US 201361906131 P**

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

**18.05.2021**

73 Titular/es:

**CORNELL UNIVERSITY (100.0%)  
Centre for Technology Licensing at, Cornell  
University (CTL), 395 Pine Tree Road Suite 310  
Ithaca, NY 14850, US**

72 Inventor/es:

**SPECTOR, JASON;  
STROOCK, ABRAHAM D. y  
MORGAN, JOHN**

74 Agente/Representante:

**MILTENYI , Peter**

ES 2 826 392 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

Materiales de armazón de tejido para la regeneración de tejido y métodos de fabricación

5 **Antecedentes de la divulgación**

La optimización de la orientación de células mediante armazones de tejido autólogo o artificial ha sido desde hace tiempo un tema de gran interés. Los productos "de tejido manipulado" disponibles para venta más predominantes y así con diferencia los más satisfactoriamente aplicados estuvieron todos originalmente previstos para servir de armazones de sustitución dérmica. Los armazones comercialmente disponibles son acelulares y comparten así los requisitos comunes de invasión de células hospedadoras y vascularización para lograr la incorporación duradera. Debido a que este proceso se prolonga, requiriendo un mínimo de varias semanas para completarse y necesitando cambios de apósito obligatorios, inmovilización de la herida y cuidados de enfermería, existe un interés significativo en desarrollar mejores armazones que puedan optimizar la tasa de invasión celular (Eppley, *Plast Reconstr Surg.* 107:757-762 (2001); Wong et al., *Plast Reconstr Surg.* 121:1144-1152 (2008)).

Actualmente, las sustituciones dérmicas acelulares disponibles se pueden clasificar en dos amplios grupos: productos derivados de dermis descelularizada y productos sintéticos basados en hidrogeles naturalmente derivados (Truong et al. *J. Burns Wounds* 4:e4 (2005)).

Los productos dérmicos descelularizados comercialmente disponibles se fabrican de dermis porcina o humana cadavérica descelularizada. Como resultado del proceso de descelularización, estos productos contienen una red interna de microcanales con una membrana basal intacta que son los restos de la microvasculatura dérmica nativa.

INTEGRA (Integra LifeSciences, Plainsboro, NJ), otro molde de regeneración dérmica comúnmente aplicado, comprende una capa porosa "dérmica" sintética de colágeno bovino de tipo I reticulado y condroitina-6-sulfato cubierto por una hoja de silicona semipermeable "epidérmica". Después de la implantación, la hoja de silicona se sustituye por autoinjerto de espesor dividido una vez se ha vascularizado la capa dérmica (Yannas et al., *Science* 215:174-176 (1982)). A diferencia de los productos dérmicos descelularizados, INTEGRA es representativo de productos sin una estructura vascular interna y se caracteriza en su lugar por una porosidad aleatoria (diámetro de poro medio 30-120  $\mu\text{m}$ ) (van der Veen et al., *Burns* 36:305-321 (2010)).

El uso de los armazones de sustitución de tejido actualmente disponibles tiene un costo asociado sustancial. Por ejemplo, la producción de productos dérmicos descelularizados requiere la adquisición y la recogida de tejido, así como los procesos de descelularización y de esterilización (Ng et al., *Biomaterials* 25:2807-2818 (2004)). Además, los armazones de tejido comercialmente disponibles son avasculares y propensos a altas tasas de fallos cuando se usan en ámbitos complejos, tales como heridas irradiadas o aquellas con tornillería o hueso expuesto. En dichos ámbitos complejos, la neovascularización es insuficiente usando productos de sustitución de tejido existentes.

Son altamente deseados en la técnica armazones de tejido mejorados que promuevan la invasión celular óptima y la vascularización de tejido nuevo y circundante. El documento de patente WO 2011/089173 se refiere a una composición que comprende una suspensión de microesferas con un diámetro de 5 a 50  $\mu\text{m}$ . El documento de patente EP-A-0 648 480 desvela un material de implante de herida que comprende microesferas bioabsorbibles y una matriz bioabsorbible.

45

**Breve resumen de la divulgación**

En el presente documento se desvela un tipo de material de armazón de tejido fabricado de un hidrogel con microesferas incorporadas. En los armazones de tejido desvelados, las microesferas tienen una densidad diferente o mayor (p/v) de polímero con respecto a la densidad del hidrogel, densidad diferencial que facilita la invasión celular en el armazón de tejido. La invención se define por las reivindicaciones. Cualquier materia fuera del alcance de las reivindicaciones se proporciona sólo para fines de informar..

El material de armazón de tejido tiene microesferas con 1,0 % p/v de colágeno, incorporadas en un hidrogel que contiene 0,3 % p/v de colágeno.

55

Las realizaciones preferidas de la presente invención se exponen en las reivindicaciones dependientes.

Los materiales de armazón de tejido desvelados se pueden usar en un método de cicatrización o regeneración de tejido en un sujeto.

60

También se desvelan en el presente documento métodos de fabricación de un material de armazón de tejido. Los métodos implican las etapas de: (a) proporcionar una primera composición con microesferas, y una segunda composición con un material de polímero, teniendo la primera composición una densidad diferente de la segunda composición; (b) mezclar la primera y la segunda composiciones; y (c) provocar la reticulación del material de polímero en dicha mezcla, para formar un hidrogel con microesferas incorporadas. La primera y la segunda

65

composiciones contienen cada una colágeno, tal como colágeno humano o bovino, como polímero. El colágeno puede ser colágeno neutralizado. Las microesferas contienen 1,0 % p/v de colágeno. La reticulación se puede llevar a cabo, por ejemplo, por métodos térmicos.

- 5 También se desvelan materiales de armazón de tejido producidos por los métodos proporcionados anteriormente y desvelados adicionalmente en el presente documento, y apósitos para heridas que comprenden dichos materiales de armazón de tejido.

**Breve descripción de las figuras**

10 FIGS. 1A-1C. Siete días después de la implantación, las células infiltran los armazones de MSS (C), pero no infiltran 1 % de masa solo (A) y malamente infiltran 0,3 % de masa (B).

15 FIGS. 2A-2C. Catorce días después de la implantación, las células muestran excelente infiltración de los armazones de MSS (C), pero no infiltran más allá de la porción externa de 1 % de masa (A) y solo muestran una modesta infiltración de 0,3 % de masa (B).

20 FIGS. 3A-3D. Siete días después de la implantación, las células muestran infiltración más completa de los armazones de MSS con 1 % de microesferas en 0,3 % de masa (C), y 0,6 % de microesferas en 0,3 % de masa (D), con menos infiltración de 0,4 % de microesferas en 0,6 % de masa (A) y 0,4 % de microesferas en 0,2 % de masa (B).

25 FIGS. 4A-4B. Siete y catorce días después de la implantación, la infiltración celular de 1 % de microesferas en 0,3 % de masa (tinción azul, DAPI) incluye células CD31+ precursoras endoteliales (tinción roja).

FIGS. 5A-5D. Siete días después de la implantación. (A-C), identificación de MSS, 0,3 % de masa, 1 % de masa y armazones INTEGRA en ratón. (D), tamaños relativos de armazones después de la implantación.

30 FIGS 6A-6C. Siete días después de la implantación, las células infiltran el armazón de MSS hasta el centro del armazón (A) pero no infiltran 1 % de masa, excepto donde el armazón está dividido (B) y malamente infiltran 3 % de masa (C).

35 FIG. 7. Siete días después de la implantación. Tinción nuclear DAPI (azul) que demuestra la invasión celular al centro de MSS y precursores endoteliales CD31+ (rojo).

FIGS. 8A-8E. Catorce días después de la implantación. (A-D), identificación de MSS, 0,3 % de masa, 1 % de masa y armazones INTEGRA en el ratón. (E), tamaños relativos de armazones después de la implantación.

40 FIGS. 9A-9D. Catorce días después de la implantación. (A), invasión celular significativa en el armazón de MSS. (B), 1 % de colágeno con invasión mínima (excepto a lo largo de las fisuras). (C), 0,3 % de armazón de colágeno con escasa invasión. (D), INTEGRA 14 días también con menos invasión que parece robusta.

45 FIG. 10. La cifra de células por unidad de área del armazón muestra que significativamente más células invadieron el armazón de MSS 7 y 14 días (aproximadamente 7 células y 10 células por área, respectivamente) con respecto a 1 % de hidrogel (aproximadamente 3 y 5 células por unidad de área) y 0,3 % de hidrogel (aproximadamente 3 y 7 células por unidad área).

50 FIGS. 11A-11D. Veintiocho días después de la implantación. (A-C), identificación de MSS, 0,3 % de masa, 1 % de masa y armazones INTEGRA en ratón. (D), tamaños relativos de armazones después de la implantación. Obsérvese que 0,3 % de hidrogel está significativamente encogido.

55 FIGS. 12A-12D. Veintiocho días después de la implantación. (A), excelente invasión celular en el armazón de MSS. (B), 1 % de colágeno mantiene la invasión mínima (excepto a lo largo de fisuras). (C), 0,3 % de armazón de colágeno muestra invasión uniforme moderada. (D), INTEGRA también muestra invasión razonable.

FIG. 13. Microscopía electrónica de barrido de microesferas.

**Descripción detallada de la divulgación**

60 En el presente documento se desvelan materiales de armazón de tejido con capacidad mejorada para facilitar la invasión y vascularización celular para cicatrización y regeneración de tejido. Los inventores han encontrado que los materiales que tienen componentes con diferentes densidades promueven la invasión de células, que incluyen células deseables tales como fibroblastos y células precursoras endoteliales, en el material.

65 Los términos "armazón de tejido", "material de armazón de tejido", "sustituto dérmico", "material de sustituto dérmico" y "material" se usan indistintamente en el presente documento para referirse a una estructura de soporte

de crecimiento celular fabricada de polímero biocompatible. Estos materiales son capaces de regenerar tejidos dañados proporcionando un molde biocompatible que promueve la invasión celular y la regeneración de tejido.

5 Los materiales de armazón de tejido desvelados en el presente documento están compuestos por un soporte de hidrogel, que se llena de microesferas. Las microesferas tienen una densidad (siendo la densidad medida como el peso en volumen o p/v) que se diferencia de la densidad del hidrogel en el que se incorporan las microesferas. En una realización preferida, las microesferas tienen una mayor densidad que el hidrogel. Sin embargo, las microesferas pueden tener una menor densidad que el hidrogel.

10 En toda la presente solicitud, los términos "alrededor de" y "aproximadamente" indican que un valor incluye la variación de error inherente para el dispositivo, siendo el método empleado para determinar el valor, o la variación que existe entre los sujetos del estudio. En una realización no limitante, se define que los términos están dentro de 10 %, preferentemente dentro de 5 %, más preferentemente dentro de 1 %, y lo más preferentemente dentro de 0,5 %.

### 15 **Polímeros**

The microesferas, hidrogeles y composiciones desveladas en el presente documento contienen colágeno. Son particularmente preferidos para su uso en los sujetos humanos los colágenos humanos y bovinos, tales como colágeno humano o bovino de tipo I.

### 20 **Microesferas**

25 Las "microesferas" son pequeñas partículas, hechas de un polímero. El término "microesferas", como se usa en el presente documento, engloba pequeñas partículas que pueden ser esféricas o no esféricas; por consiguiente, cualquier referencia a "microesferas" en la presente solicitud se puede usar indistintamente con el término "microestructuras", ya que las microesferas desveladas en el presente documento incluyen tanto pequeñas partículas esféricas como no esféricas. Aunque las microesferas pueden englobar cualquier diámetro de 1  $\mu\text{m}$ -1 mm, las microesferas como se desvela en el presente documento tienen un diámetro de entre 50-150  $\mu\text{m}$  de diámetro.

### 30 **Hidrogeles**

35 El término "hidrogel" se refiere a una amplia clase de materiales poliméricos que son ampliamente hinchados en agua, pero que no se disuelven en agua. En general, los hidrogeles se forman polimerizando un monómero hidrófilo en una disolución acuosa en condiciones donde el polímero se reticula de manera que se forme una red de polímero tridimensional que es suficiente para gelificar la disolución. Los hidrogeles se describen con más detalle en Hoffman, D. S., "Polymers in Medicine and Surgery", Plenum Press, New York, pp 33-44 (1974).

### 40 **Métodos de fabricación de materiales de armazón de tejido**

45 En el presente documento también se desvelan métodos de fabricación de un material de armazón de tejido. Los métodos implican las etapas de: (a) proporcionar una primera composición con microesferas, y una segunda composición con un material de polímero, teniendo la primera composición una densidad diferente de la segunda composición; (b) mezclar la primera y la segunda composiciones; y (c) causar la reticulación del material de polímero en dicha mezcla, para formar un hidrogel con microesferas incorporadas.

50 El colágeno se puede obtener de diversas fuentes, tales como tejido humano o bovino. El colágeno puede ser autólogo al sujeto para el que se va a administrar el armazón de tejido, y se puede extraer, por ejemplo, de la piel del sujeto. Una vez se consigue una muestra biológica adecuada (tal como piel, placenta, tendón o células cultivadas), el colágeno se puede extraer de la muestra por técnicas conocidas para formar una disolución madre. Véase, por ejemplo, Epstein, J. Biol. Chem. 249:3225-3231 (1974). Las disoluciones madre de colágeno pueden incluir colágeno en una disolución adecuada, que contiene, por ejemplo, 0,1 % de ácido acético, o sales de Earle o Hank, L-glutamina, HEPES y bicarbonato sódico. Un ejemplo de un medio adecuado es un medio basado en medio 199 (M199). Dicho medio está comercialmente disponible, por ejemplo, de Sigma-Aldrich, Life Technologies, y otros vendedores de medios de cultivo celular. El colágeno se mantiene, en general, en una concentración de disolución madre superior a la concentración final, tal como concentraciones de 0,2 %-1,6 % de colágeno, preferentemente 0,3-0,5 % de colágeno para el hidrogel, y 0,6-2,0 % de colágeno para las microesferas. El colágeno adecuado para su uso en los métodos desvelados también está comercialmente disponible.

60 En algunas realizaciones, el colágeno se neutraliza antes de uso. El colágeno se puede neutralizar mezclando una disolución madre de colágeno con hidróxido sódico para alcanzar un pH de 7,2-7,6, preferentemente pH 7,4. Esta mezcla se puede recubrir con aceite, tal como aceite mineral, preferentemente al menos 5 volúmenes de aceite por volumen de colágeno con NaOH, y conservar con refrigeración hasta uso.

65 Para la fabricación de las microesferas, se mezcla una composición de polímero (colágeno) con recubrimiento de

aceite a alta velocidad para formar una emulsión de aceite en agua. La emulsión se somete entonces a lavados repetidos con concentraciones crecientes de etanol, por ejemplo, un primer lavado con 50 % de etanol, un segundo lavado con 80 % de etanol y un tercer a quinto lavado con 100 % de etanol. El primer lavado comprende mezclar (tal como agitando a 800-1500 rpm durante 20-40 minutos) con al menos 5 volúmenes de etanol por volumen de disolución de colágeno, centrifugar la mezcla a 2500-3500 rpm durante 5-10 minutos y retirar el aceite y las capas de alcohol. Los posteriores lavados incluyen mezclar con al menos 5 volúmenes de etanol por volumen de disolución de colágeno, centrifugar la mezcla a 2500-3500 rpm durante 5-10 minutos y retirar la capa de alcohol. Después de los lavados con alcohol, el colágeno se lava entonces tres a cinco veces con al menos 5 volúmenes de solución salina fría, tal como solución salina tamponada con fosfato (Phosphate Buffered Saline, PBS). Después de retirar el lavado de solución salina final, la composición de microesferas de colágeno formada por los lavados está lista para su uso.

Para preparar los armazones de "masa" de hidrogel de colágeno, se mezcla una disolución madre de colágeno con hidróxido sódico para alcanzar un pH de 7,2-7,6, preferentemente pH 7,4. Esta composición de colágeno está entonces lista para su uso.

Para preparar los materiales de almacén de tejido, la primera composición, que contiene microesferas, se añade a un molde o plataforma de moldeo. La segunda composición que formará el hidrogel, que contiene un material de polímero, se añade a la primera composición. Se mezclan las composiciones, tal como agitando o pipeteando, para lograr la mezcla uniforme. Entonces se reticula la mezcla por métodos convencionales adecuados para la reticulación de polímeros, tales como por métodos térmicos (incubación a 35-45 °C, preferentemente 37 °C, durante 20-40 minutos) o químicos. Después de la reticulación, se puede usar inmediatamente el material de almacén de tejido o conservar para uso futuro.

#### **Armazones de tejido y apósitos**

También se desvelan materiales de almacén de tejido producidos por los métodos proporcionados en el presente documento. Las microesferas y el hidrogel que fabrican el almacén de tejido contienen cada uno colágeno. En una realización, las microesferas y el hidrogel del material de almacén de tejido desvelado contienen cada uno colágeno humano o bovino, como polímero. El colágeno puede ser colágeno neutralizado. El material de almacén de tejido puede estar en una forma fluida adecuada para inyección a un sujeto, o en una forma de hoja.

Las microesferas tienen una densidad diferente, normalmente mayor que, de la del hidrogel. La diferencia entre las densidades debe ser al menos 25 %. En algunas realizaciones, la diferencia es al menos 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 150 %, 200 %, o más, cuando se comparan la densidad de las microesferas con respecto a la densidad del colágeno. En una realización, las microesferas llenan al menos aproximadamente 50 %, 60 % o 70 % del volumen del material de almacén de tejido.

Se desvelan además apósitos para heridas y productos médicos dentro de los que se integra el material de almacén de tejido desvelado. El material de almacén de tejido se puede incorporar en el apósito, o se deposita sobre una cara del apósito. El apósito puede incluir además uno o más de silicona, gasa, u otra cubierta, y/o un antibiótico, antiinflamatorio o agente reductor del dolor u otra pomada para facilitar la curación o reducir el dolor.

El producto de almacén de tejido puede ser además adecuadamente envasado, tal como en un envase estéril, para su uso en la cicatrización o regeneración de tejido.

Como se usa en el presente documento, los términos "sujeto" y "paciente" se usan indistintamente y se refieren a un animal, que incluye mamíferos tales como no primates (por ejemplo, vacas, cerdos, caballos, gatos, perros, ratas etc.) y primates (por ejemplo, mono y humano).

La presente divulgación se ilustra además por los siguientes ejemplos no limitantes.

#### **Ejemplos**

##### **Ejemplo 1.** Producción de armazones de microesferas/hidrogel.

Se extrajo colágeno de tipo I de muestras de cola de rata usando técnicas convencionales. Se retiró piel de las colas de rata usando disección cortante y se desechó. Entonces, a partir del extremo distal de la cola, se extrajeron los tendones rompiendo una articulación dentro de las vértebras y tirando hacia arriba de las vértebras distales hasta que las vértebras distales con el tendón unido se separaron de la cola proximal restante. Entonces se diseccionaron de forma cortante las vertebras del tendón y se desecharon. A continuación, el tendón se dispuso en 70 % de etanol. Esto se repitió hasta que se rompieron todas las articulaciones dentro de la cola y se extrajeron los tendones. Se recogieron los tendones extraídos, se pesaron y se dispusieron en un recipiente estéril de 1 l. A partir de aquí, se añadió 0,1 % de ácido acético a los tendones para alcanzar una concentración final de 75 ml de ácido acético/ g de tendón para llegar a una disolución madre de colágeno de 15 mg/ml (1,5 % p/v) de colágeno de tipo I. La disolución madre de colágeno se conservó entonces a 4 °C y se agitó durante aproximadamente 1 minuto al día durante al menos 72 horas.

Después de 72 h, se dividió la disolución madre de colágeno en alícuotas en tubos cónicos de 50 ml, se centrifugó a 4 °C y 8800 rpm durante 90 minutos, y se retiró y desechó cualquier sedimento. Entonces se dispusieron 15 mg/ml finales (1,5 % p/v) de disolución madre de colágeno en un liofilizador común y se liofilizaron durante al menos 72 horas. Después de la liofilización, se almacenó la disolución madre de colágeno a -4 °C hasta uso. Después del uso, este colágeno resuspendido se resuspendió en 0,1 % de ácido acético hasta una concentración de 10 mg/ml (1 % p/v). Este colágeno resuspendido se agitó diariamente (durante aproximadamente 1 min) durante 3 días antes de uso. Se usaron disoluciones madre de 1,5 % (p/v) de colágeno y 0,384 % (p/v) de colágeno para crear microesferas y 0,3 % de hidrogeles, respectivamente.

Para neutralizar el colágeno para fabricar 1 % de microesferas, se mezclaron 2 ml de 1,5 % de colágeno con 656 µl de 1X medio M199 (Gibco/Life Technologies, Inc.), 300 µl de 10X medio M199 y 44 µl de NaOH (o más NaOH según se necesitara para ajustar el pH a 7,4), sobre hielo. Esta mezcla se recubrió con al menos 5 veces el volumen (por ejemplo, 15 ml) de aceite mineral, y se conservó a 4 °C hasta uso.

Para producir microesferas, se mezcló el colágeno neutralizado con recubrimiento de aceite mezclando con vórtex a alta velocidad durante aproximadamente 5 minutos para crear una emulsión de agua en aceite. Entonces se vertió la emulsión en un matraz, se combinó con al menos 5 volúmenes de 50 % de etanol por volumen de disolución de colágeno menos aceite y se agitó con una barra de agitación a 1100 rpm durante 30 minutos. Entonces se vertió la mezcla con agitación en un tubo de 50 ml y se centrifugó a 3200 rpm a 4 °C durante 7 minutos para formar aceite y capas de etanol con una fina capa de colágeno entre las capas de aceite y de alcohol. Se retiraron las capas de aceite y de alcohol, se lavó la capa de colágeno con 5 volúmenes de 80 % de etanol, se agitó con vórtex y se centrifugó como antes, se retiró la capa de alcohol, se lavó con 5 volúmenes de 100 % de etanol, se agitó con vórtex y se centrifugó, y se retiró la capa de alcohol. Entonces se lavó el colágeno durante tres rondas con 5 volúmenes de PBS frío, se agitó con vórtex y se centrifugó, y se retiró el PBS. Durante este proceso, se forman microesferas de colágeno.

Para preparar la "masa" de colágeno para hidrogeles, se mezclaron 391 µl de 0,384 % de colágeno con 50,8 µl de 1X medio M199, 50 µl de 10X medio M199 y 8,6 µl de NaOH (o más NaOH según se necesitara para ajustar el pH hasta 7,4), sobre hielo. Esta mezcla se puede usar entonces para fabricar armazones, del siguiente modo.

Para fabricar los armazones, se usaron moldes con un diámetro de 7 mm y una profundidad de 2,5 mm para crear un armazón de aproximadamente 96 mm<sup>3</sup>. Para fabricar los armazones de microesferas, se pipetearon las microesferas producidas por los métodos anteriores en cada pocillo para llenar cada pocillo aproximadamente hasta la mitad. Se añadió una gota de masa de colágeno a cada pocillo, y se mezcló con las microesferas agitando, para formar un hidrogel incorporado con microesferas. Entonces se curaron los armazones a 37 °C durante 30 minutos. Se recubrió solución salina tamponada con fosfato (PBS) sobre los armazones curados para prevenir el secado adicional. Para fabricar los armazones de "masa", se añadió masa de colágeno a los moldes, sin microesferas, hasta aproximadamente el mismo nivel que los armazones con microesferas. Se curaron los armazones como antes y se recubrieron con PBS.

Según la conjetura de Kepler de esferas muy compactas, aproximadamente el 74 % del volumen del armazón debe estar comprendido por microesferas de mayor densidad, ocupando el volumen restante el hidrogel de colágeno a granel.

**Ejemplo 2.** Armazones que contienen microesferas que promueven la infiltración celular.

Se produjeron armazones un día antes de la implantación. Los armazones se implantaron por vía subcutánea en los dorsos de ratones C57bl/6 no mutantes de 8 semanas. Se implantaron 3 ratones con 4 armazones en total del siguiente modo: Dos 1 % de microesferas en 0,3 % de armazones a granel; un 1 % de armazones a granel como control; un 0,3 % de armazones a granel como control. Todos los ratones se sacrificaron y se recogieron para análisis histológico después de 7 o 14 días. Se realizó tinción con hematoxilina y eosina (H&E) en muestras de tejido incorporado en medio de compuesto a temperatura de corte óptima (Optimal Cutting Temperature, OCT), para identificar la infiltración celular en armazones.

Después de 7 días de implantación, los armazones de microesferas (MSS) muestran invasión celular sustancial y uniforme que engloba toda la profundidad del armazón (FIG. 1C). Comparativamente, las células invadieron esporádicamente y solo parcialmente el 0,3 % de los armazones de control (FIG. 1B), y dejaron de invadir el 1 % de los armazones de control, en lugar de proliferar a lo largo de la periferia de los armazones (FIG. 1A).

Después de 14 días de implantación, los MSS revelaron una robusta invasión celular que englobaba la profundidad del armazón (FIG. 2C). Comparativamente, las células invadieron esporádicamente 0,3 % (p/v) de los armazones de colágeno (FIG. 2B) y dejaron de invadir 1 % (p/v) de los armazones de colágeno por completo, en lugar de seguir confinados en la periferia (FIG. 2A).

**Ejemplo 3.** Diferentes densidades de microesferas con respecto a la densidad de hidrogel promueven la infiltración

celular.

Se prepararon armazones de microesferas con diferentes densidades (p/v) de colágeno en la microesfera (MS) e hidrogel (H) del siguiente modo: (A) 1 % de MS de colágeno en 0,3 % de H; (B) 0,6 % de MS/ 0,3 % de H; (C) 0,4 % de MS/0,2 % de H; (D) 0,4 % de MS/0,6 % de H. Véase la Tabla 1. Los armazones que comprenden 1 % p/v de microesferas de colágeno incorporadas en 0,3 % p/v de hidrogel de colágeno son parte de la invención reivindicada. Las otras microesferas son para referencia.

**Tabla 1. Densidades de armazones de microesferas**

Densidad de colágeno de las microesferas (p/v)	Densidad de colágeno a granel (p/v)
1 %	0,3 %
0,6 %	0,3 %
0,4 %	0,2 %
0,4 %	0,6 %

Se implantaron MSS por vía subcutánea en los dorsos de ratones adultos y se recogieron para inmunohistoquímica 7 y 14 días después de implantación. El análisis inmunohistoquímico identificó la infiltración celular en todas las MSS (FIGS. 3A-3D), con la mayor infiltración observada en 1 % de MS/ 0,3 % de H, y 0,6 % de MS 0,3 % de H (FIGS. 3C-3D). Además, se observó expresión de CD31 en todas las MSS después de 7 y 14 días de implantación (FIGS 4A-4B), indicativo de invasión de precursores endoteliales y la formación de neovasculatura.

**Ejemplo 4.** MSS promueve la infiltración celular durante la implantación de 28 días.

Dieciocho ratones recibieron cuatro implantes subcutáneos (A-D) por ratón del siguiente modo: (A) MSS (1 % de microesferas de colágeno en 0,3 % de masa de colágeno), (B) 1 % de control de hidrogel de colágeno en masa, (C) 0,3 % de control de hidrogel de colágeno y (D) sección de 7 mm de diámetro de INTEGRA Dermal Regeneration Template (Integra LifeSciences, Plainsboro, NJ). Los ratones se sacrificaron 7, 14 y 28 días después de la implantación (6 ratones por momento de tiempo).

7 días después de implantación (FIGS. 5A-5D), MSS, 1 % de control de colágeno, y los armazones de INTEGRA retuvieron el tamaño y la morfología similares con respecto a la preimplantación, mientras que 0,3 % de control de colágeno se redujo notablemente en tamaño (FIG. 5D). La tinción H&E de MSS 1 semana después de la implantación revela la invasión de células hasta el centro del almacén (FIG. 6A). Por comparación, no existe invasión del 1 % de armazones de colágeno (FIG. 6B), excepto a lo largo de las grietas donde el material se ha dividido. También hubo una invasión mínima en el 0,3 % de almacén de colágeno encogido (FIG. 6C). La tinción fluorescente del molde MSS con anticuerpos CD31 (para identificar células progenitoras endoteliales) y DAPI (para identificar células infiltrantes) muestra que múltiples tipos de células, que incluyen células progenitoras endoteliales, ya están infiltrando el almacén de MSS a los 7 días (FIG. 7). No se observaron células CD31+ dentro de 1 % y 0,3 % de los controles de hidrogel (datos no mostrados).

Después de 14 días (FIGS. 8A-8E), las MSS, 1 % de control de colágeno, y los armazones INTEGRA están todavía próximos al tamaño de preimplantación, mientras que 0,3 % de control de colágeno se reduce espectacularmente en tamaño (FIG. 8E). El almacén de MSS muestra invasión celular significativa (FIG. 9A), el 1 % de muestra de colágeno invasión mínima excepto a lo largo de las fisuras (FIG. 9B), y el 0,3 % de almacén de colágeno muestra escasa invasión (FIG. 9C). El almacén INTEGRA mostró invasión menos robusta que en el almacén de MSS (FIG. 9D); la estructura densa del almacén INTEGRA condujo al cizallamiento del almacén durante el seccionamiento para la tinción H&E.

Una comparación de la cifra de células por unidad de área del almacén (FIG. 10) muestra que significativamente más células invadieron el almacén de MSS a los 7 y 14 días (aproximadamente 7 células y 10 células por área, respectivamente) con respecto al 1 % de hidrogel (aproximadamente 3 y 5 células por unidad área) y 0,3 % de hidrogel (aproximadamente 3 y 7 células por unidad de área).

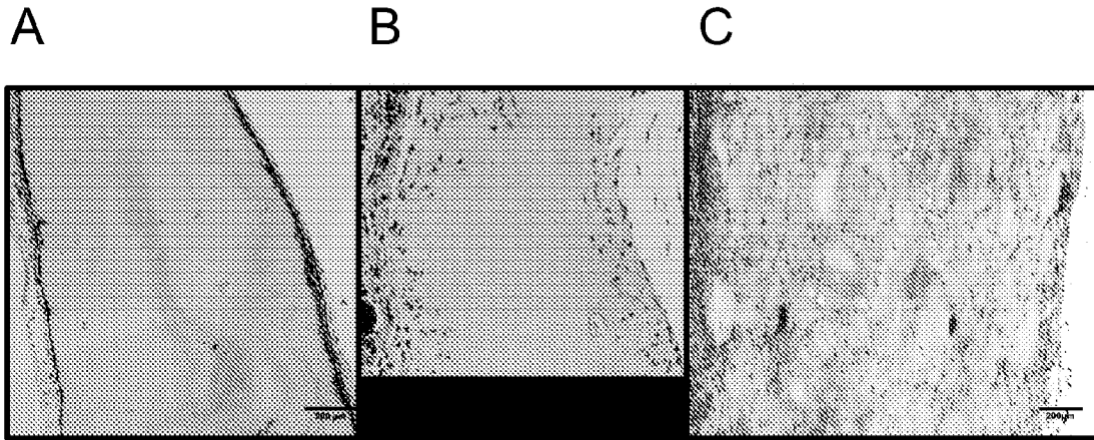
A los 28 días después de la implantación (FIGS. 11A-11D), las MSS, 1 % de control de colágeno, y los armazones INTEGRA son ligeramente más pequeños que el tamaño de preimplantación, mientras que 0,3 % de control de colágeno es más pequeño que a los 7 o 14 días (FIG. 11D). El almacén de MSS a los 28 días muestra buena invasión celular (FIG. 12A), el 1 % de colágeno no muestra esencialmente invasión (FIG. 12B), y el 0,3 % de almacén de colágeno muestra invasión a pesar de su pequeño tamaño (FIG. 12C). El almacén INTEGRA también mostró cierta invasión (FIG. 12D).

**Ejemplo 5.** Microscopía electrónica de barrido de microesferas.

Se prepararon microesferas como en el Ejemplo 1 y se prepararon para microscopía electrónica de barrido (Scanning Electron Microscopy, SEM). Como se observa en la FIG. 13, las microesferas pueden variar de tamaño (entre 50-300  $\mu\text{m}$ ) y de forma (algunas son altamente esféricas, mientras que otras son de morfología irregular).

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un material de armazón de tejido que comprende 1 % p/v de microesferas de colágeno incorporadas en 0,3 % p/v de hidrogel de colágeno.
2. El material de armazón de tejido de la reivindicación 1, en donde dichas microesferas tienen entre 50-150 µm de diámetro.
- 10 3. El material de armazón de tejido de la reivindicación 1 o 2, en donde dichas microesferas comprenden al menos aproximadamente 70 % del volumen del material de armazón de tejido.
4. El material de armazón de tejido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dichas microesferas no comprenden factores bioactivos adicionales.
- 15 5. El material de armazón de tejido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en una forma fluida o en forma de una hoja.
- 20 6. El material de armazón de tejido de cualquiera de las reivindicaciones 1-5 para su uso en un método de cicatrización o regeneración de tejido en un sujeto.
7. Un método de fabricación de un material de armazón de tejido, que comprende las etapas de:
- 25 a. proporcionar una primera composición de 1 % p/v de microesferas de polímero de colágeno, y una segunda composición de 0,3 % p/v de material de polímero de colágeno, teniendo la primera composición una densidad diferente de la segunda composición;
- b. mezclar la primera y la segunda composiciones; y
- c. provocar la reticulación del material de polímero en dicha mezcla, para formar un hidrogel con microesferas incorporadas.
- 30 8. El método de cualquiera de la reivindicación 7, en donde dicha reticulación se lleva a cabo por un método térmico.
9. Un material de armazón de tejido producido por el método de la reivindicación 7 u 8.
- 35 10. Un apósito que comprende el material de armazón de tejido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o 9.



**FIGURA 1**

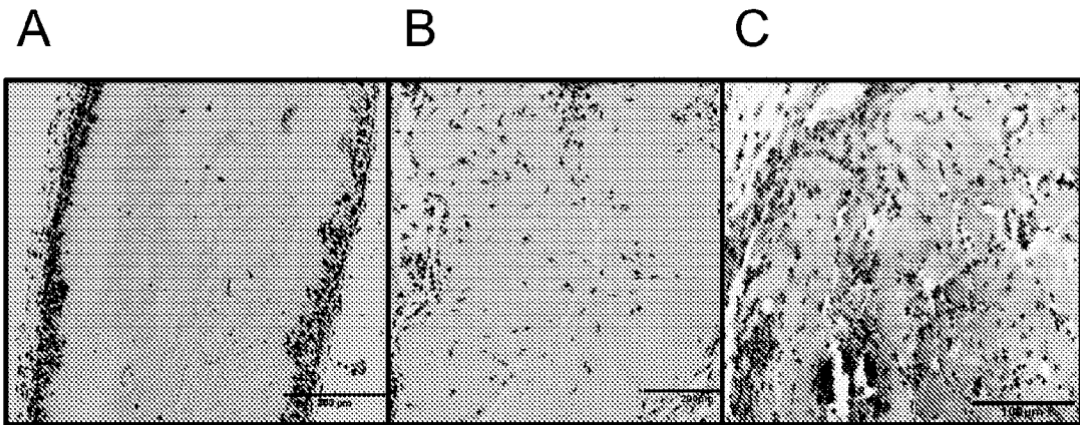


FIGURA 2

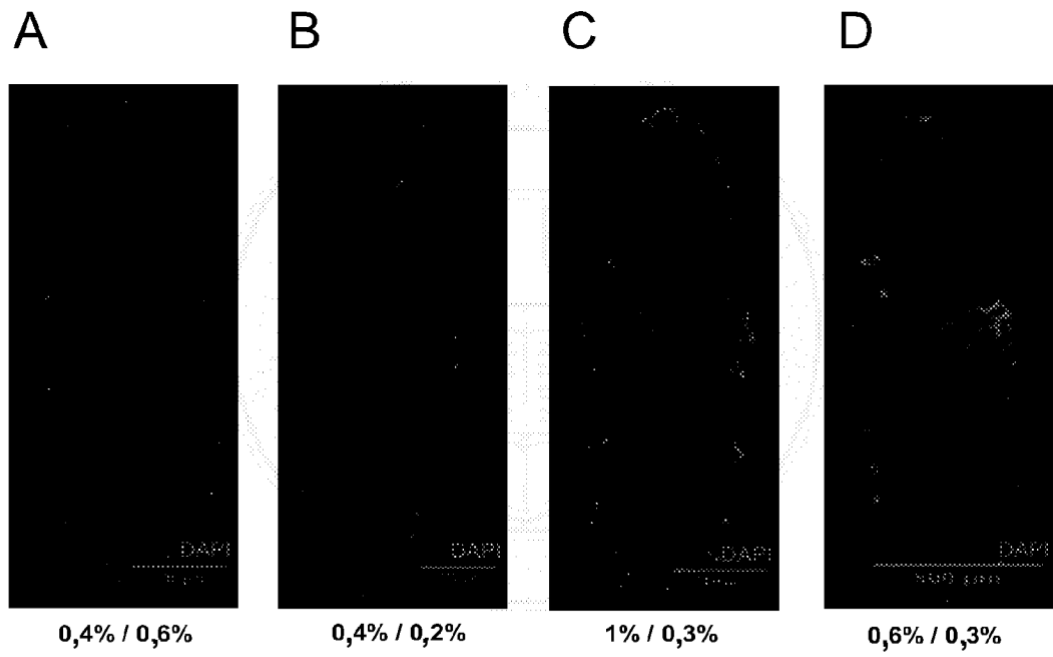


FIGURA 3

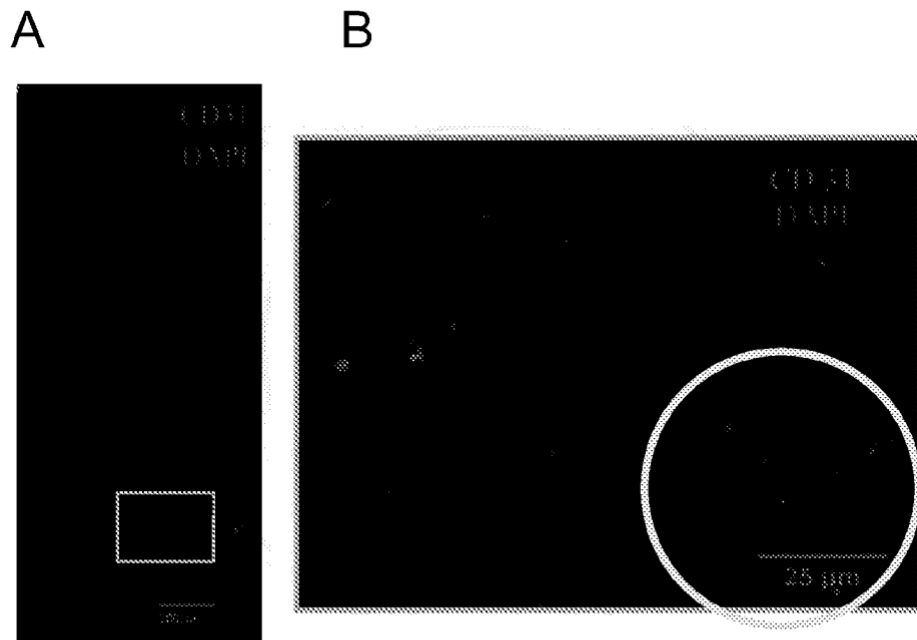


FIGURA 4

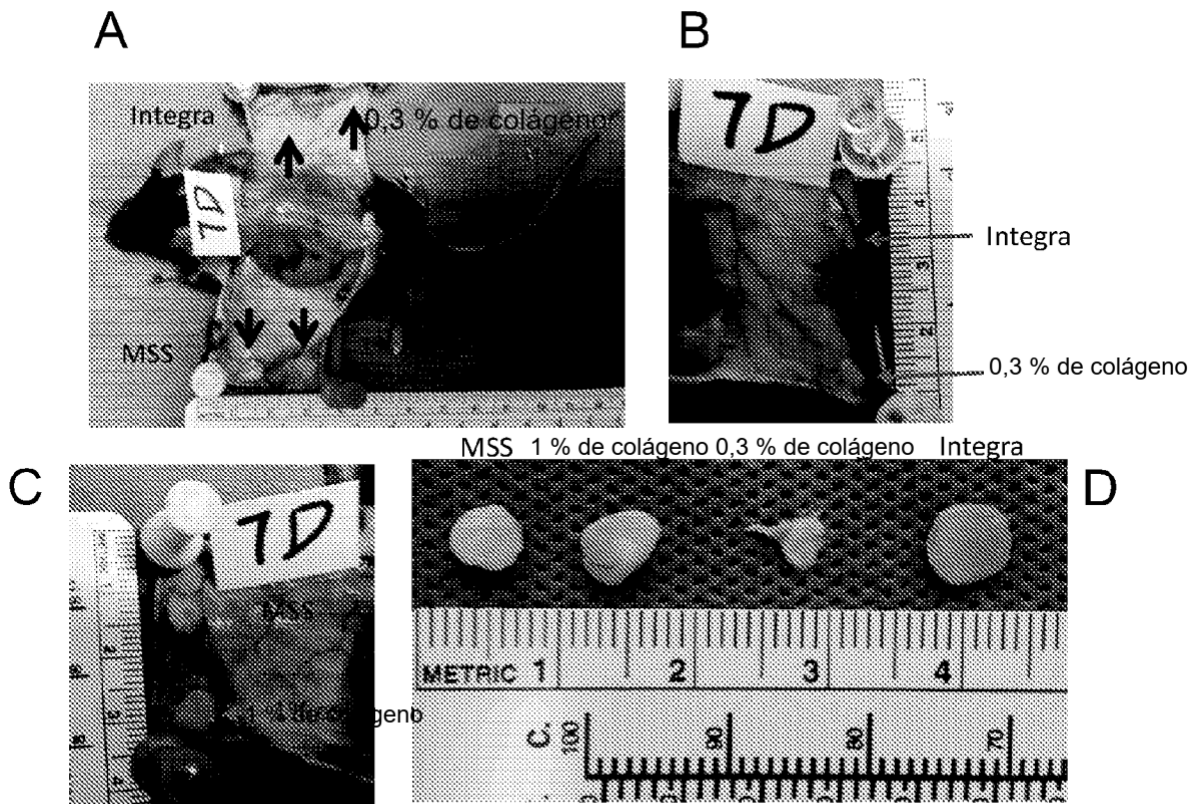
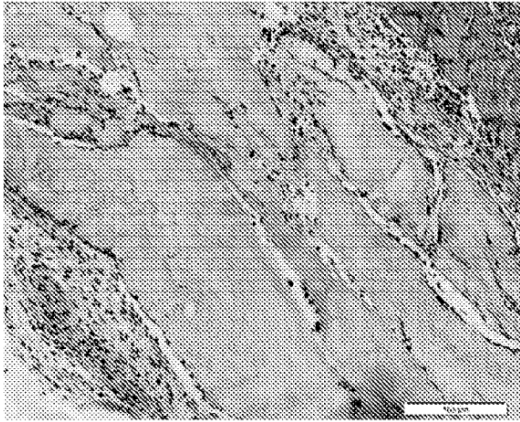
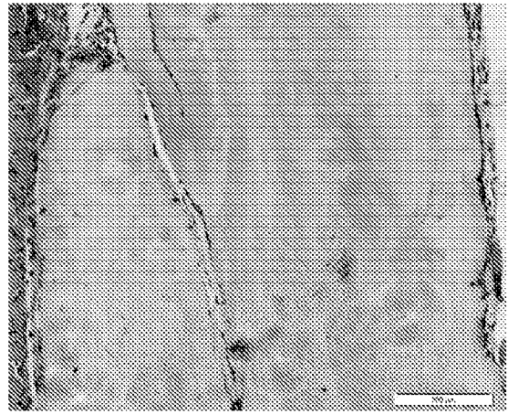


FIGURA 5

A



B



C

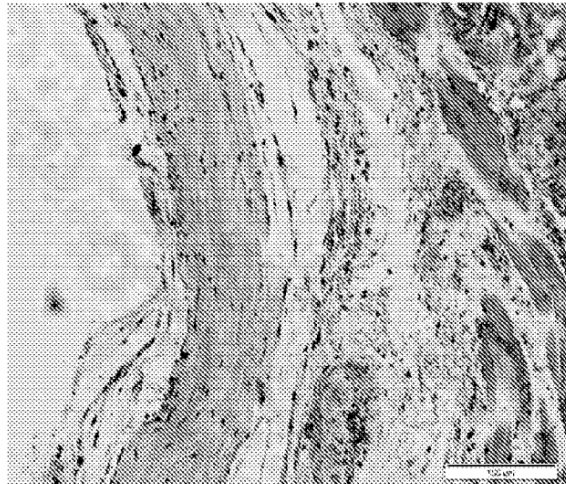


FIGURA 6

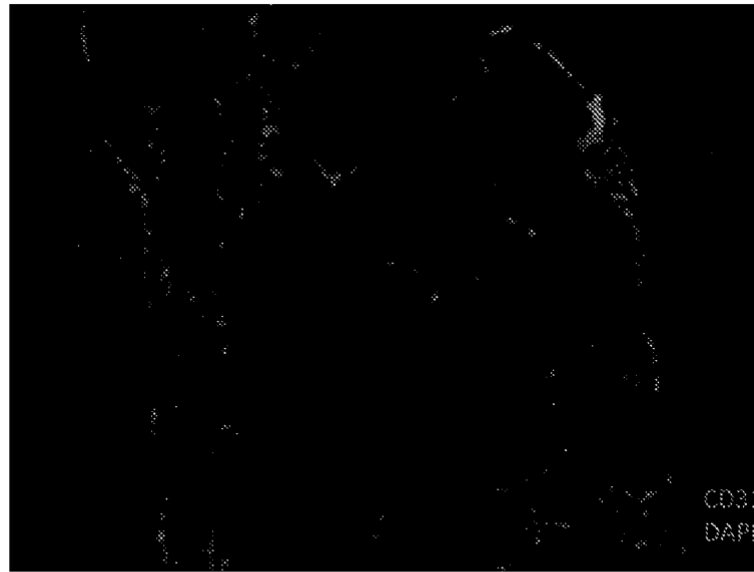


FIGURA 7

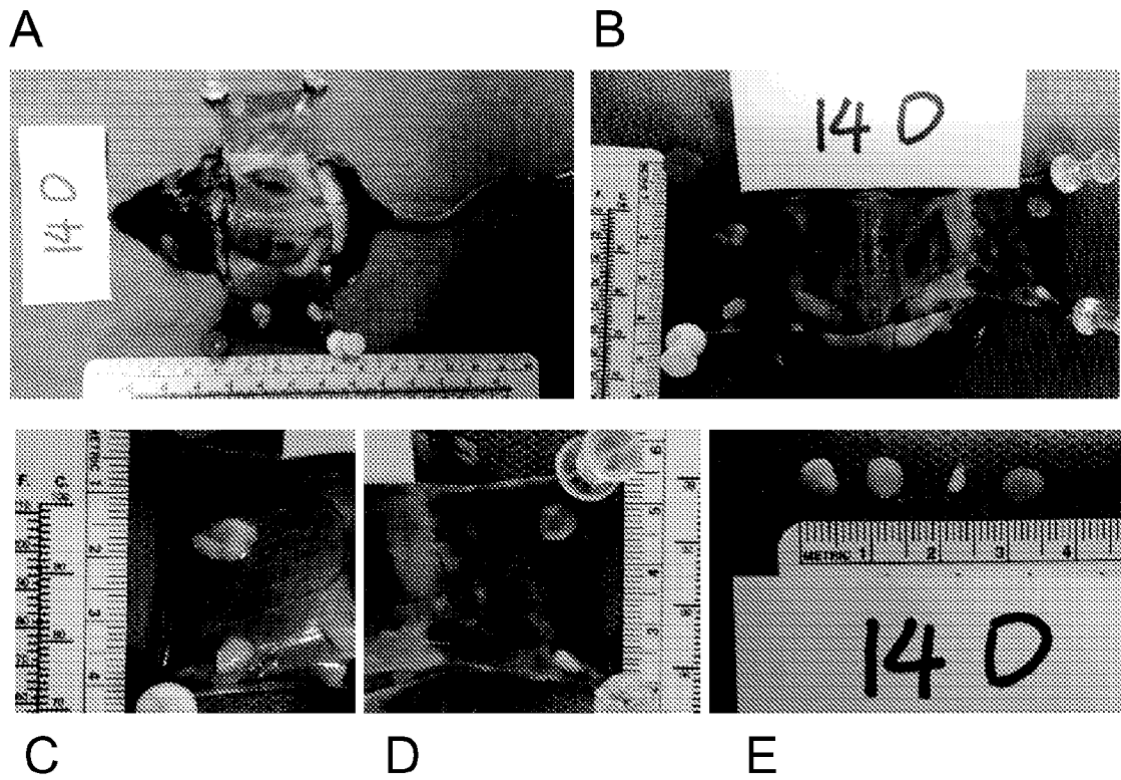
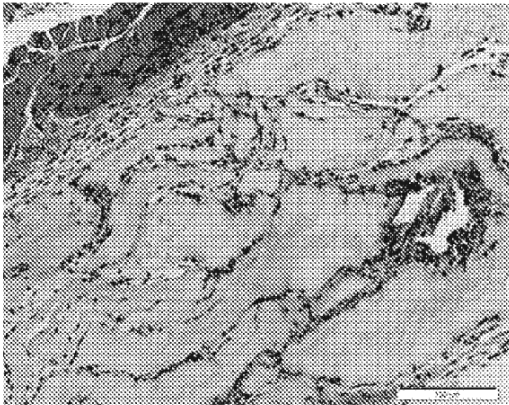
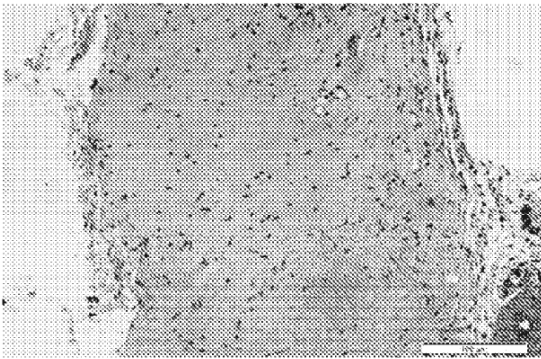
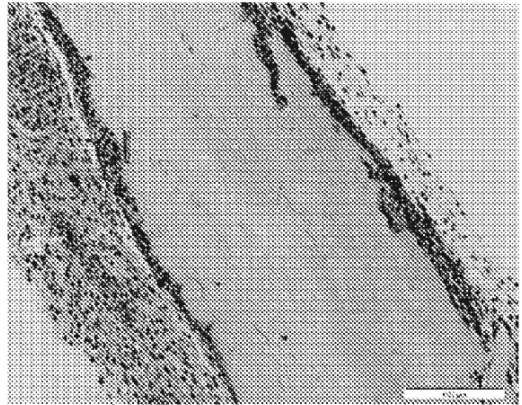


FIGURA 8

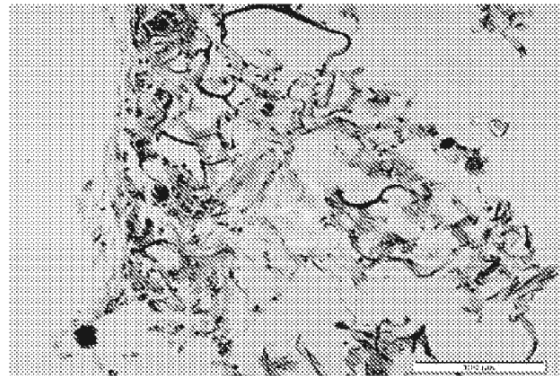
A



B



C



D

**FIGURA 9**

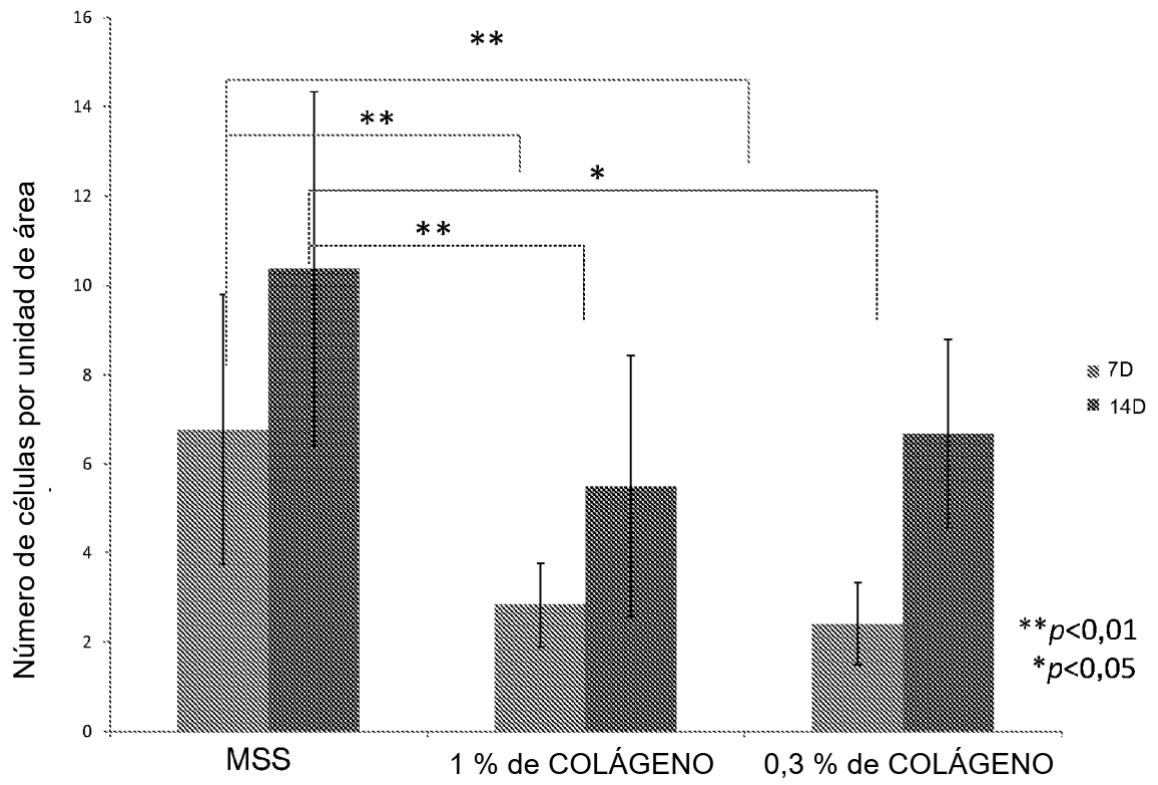


FIGURA 10

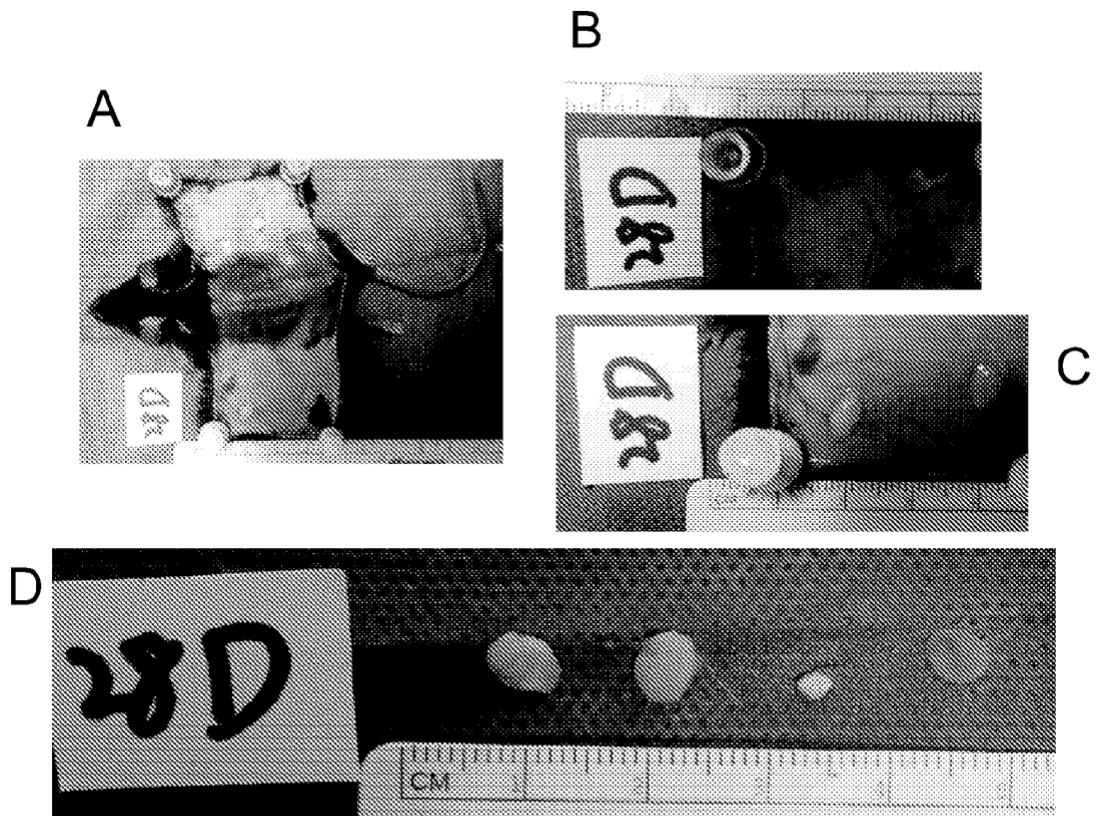


FIGURA 11

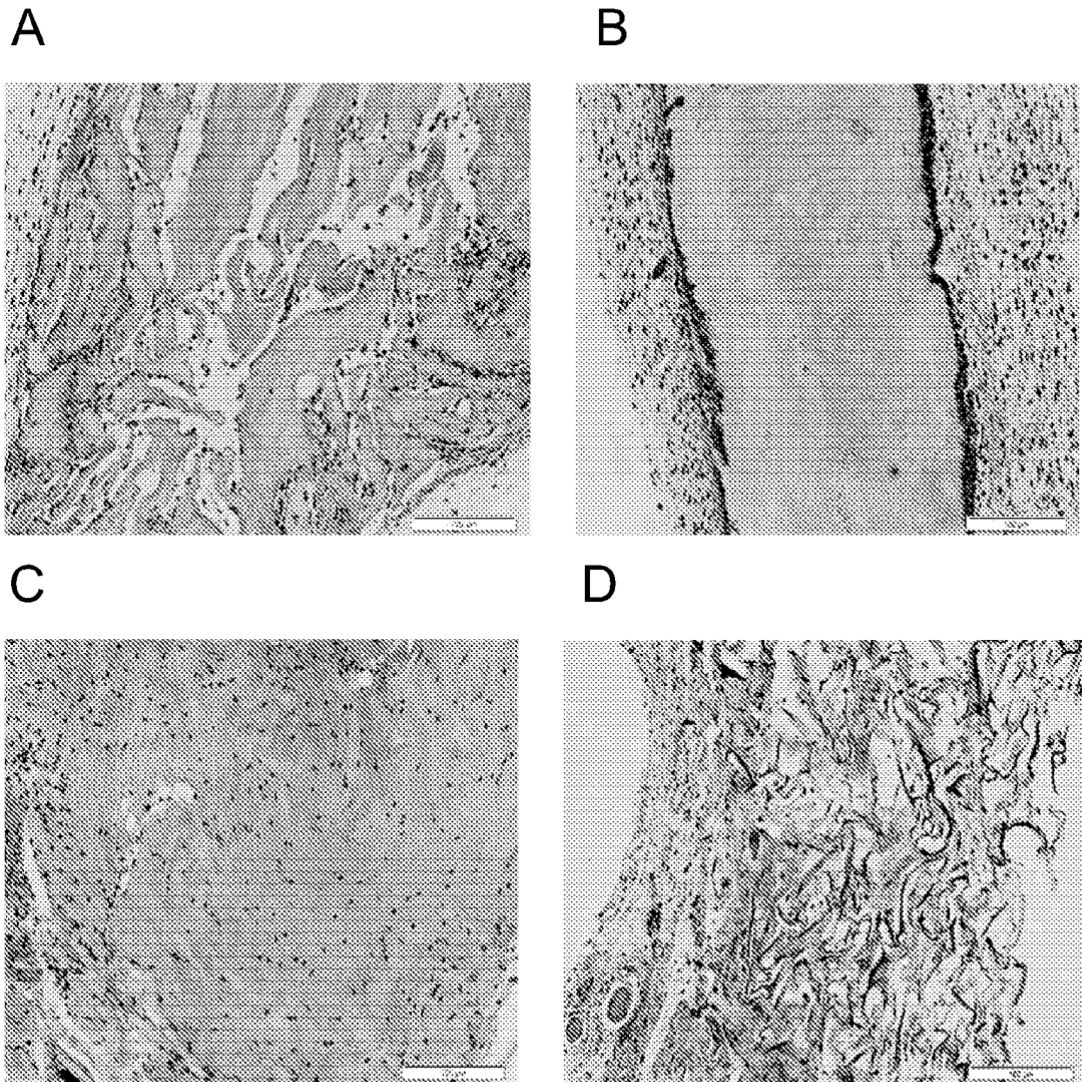


FIGURA 12

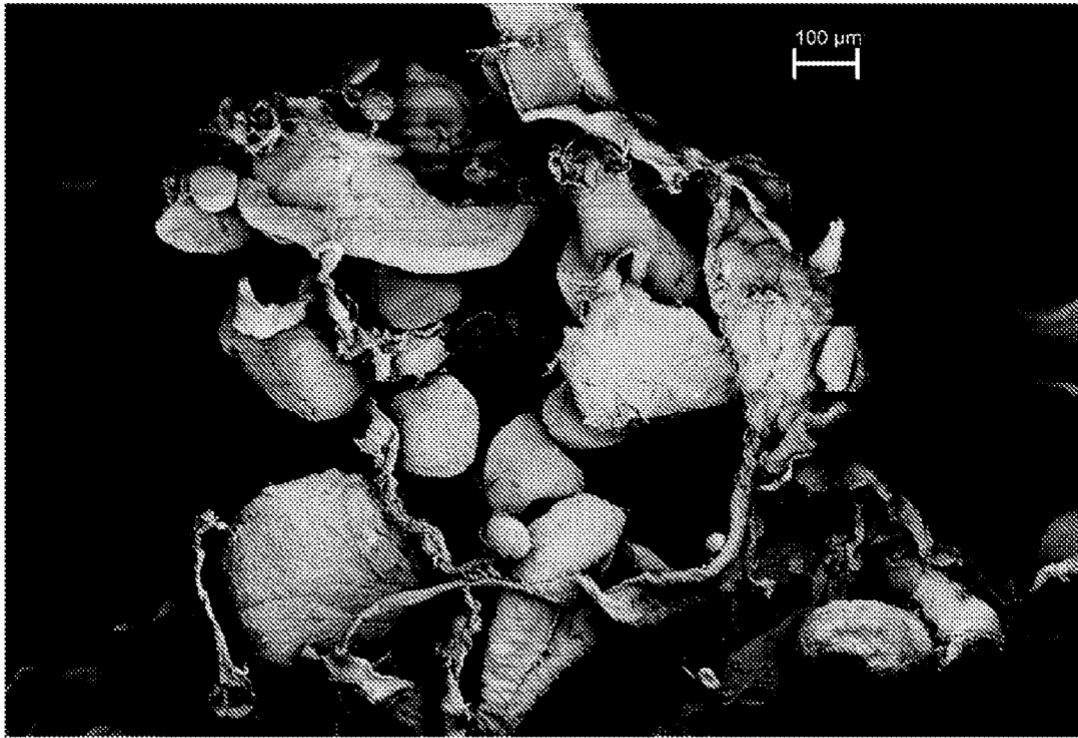


FIGURA 13