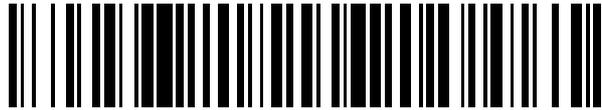


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 816 552**

51 Int. Cl.:

A61L 27/36

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.02.2017 PCT/EP2017/053820**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.08.2017 WO17140914**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.02.2017 E 17706450 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.05.2020 EP 3416696**

54 Título: **Procedimiento de preparación de un material de aloinjerto, producto obtenido, y usos del mismo**

30 Prioridad:

18.02.2016 FR 1651306

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

05.04.2021

73 Titular/es:

**TBF GENIE TISSULAIRE (TBF) (100.0%)
6 rue d'Italie
69780 Mions, FR**

72 Inventor/es:

**BARNOUIN, LAURENCE y
GUNZEL SAINT UPERY, ELISE**

74 Agente/Representante:

ESPIELL VOLART, Eduardo María

ES 2 816 552 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 de preparación de un material de aloinjerto, producto obtenido, y usos del mismo

- 5 La presente invención se refiere, de manera general, a la producción de membranas procedentes de placenta de mamíferos, y más particularmente a un procedimiento de preparación de un material de aloinjerto que forma una membrana viroinactivada, liofilizada y estéril procedente de tejido placentario de mamífero y constituida por al menos una capa membranosa, siendo este material de aloinjerto adaptado para servir como injerto en cirugía.
- 10 La membrana corioamniótica, que separa el feto del endometrio de la madre en los mamíferos, incluye la membrana amniótica, o amnios, y la membrana coriónica, o corion. Estas dos membranas están conectadas por una membrana tisular esponjosa, también llamada capa esponjosa, constituida entre otros por colágeno y proteoglicanos, constando la membrana tisular esponjosa de puentes proteicos, fijados por ambos lados al amnios, por una parte, y al corion, por otra parte.
- 15 La membrana amniótica es la capa más interna de la membrana corioamniótica. Tiene como función proteger el feto y mantener el líquido amniótico a su alrededor. Esta membrana amniótica es un tejido muy fino, transparente que consta de varias capas, a saber, una capa epitelial, una membrana basal, una capa compacta y una capa fibroblástica.
- 20 La membrana coriónica es la capa más externa de la membrana corioamniótica, aquella que se encuentra inmediatamente en contacto con la pared del útero materno (la decidua). Esta membrana coriónica es un tejido grueso y fibroso, que consta también de varias capas, a saber, una capa reticular, una membrana basal y una capa trofoblástica.
- 25 La membrana amniótica, obtenida a partir de la placenta después del parto, es un tejido que se ha usado durante más de cien años en el tratamiento de quemaduras y heridas. En efecto, desde 1910, Davies usaba membranas fetales tanto en quemaduras como en tejidos ulcerados. Trelford y Trelford-Sauder informan que en 1935 los autores publicaron aplicaciones clínicas de la membrana amniótica en vaginoplastia, reconstrucción conjuntival, tratamiento de quemaduras o heridas, y tratamientos relativos a la adherencia intraabdominal. Fue en 1940 cuando De Roethth usó por vez primera una membrana fetal en oftalmología reconstructiva para tratar alteraciones conjuntivales de pacientes.
- 30 Trelford *et al.* también informan que en 1952 Douglas usó el amnios para tratar heridas extensas. Por primera vez, se indicó que la capa estromal de la membrana amniótica, que comprende la capa compacta y la capa fibroblástica, permitía una mayor adherencia del injerto, y por tanto de su eficacia. En 1972, los trabajos de Trelford *et al.* confirmaron este hecho. Gindraux *et al.* informan que a partir de 1972, y especialmente desde su redescubrimiento en 1995, otros autores han confirmado todas las aplicaciones clínicas presentadas anteriormente, y también han señalado nuevas indicaciones tales como el tracto genitourinario, el estómago, la laringe, la cavidad oral, la cabeza y el cuello, ya sea en ensayos clínicos o informes de casos.
- 35 No vascularizada y no inervada, la membrana amniótica es rica en colágeno y en diversos factores de crecimiento, y presenta propiedades que participan en el proceso de cicatrización.
- 40 Con los recientes avances en ingeniería tisular, ha surgido la necesidad de usar matrices que sirvan de soporte destinado a la adherencia y a la proliferación de células y tejidos, siendo aquellas que sirven de andamio para esta proliferación derivadas de tejidos de mamíferos. La membrana amniótica y la membrana coriónica se consideran como una importante fuente de matriz de soporte en este campo.
- 45 En el contexto de la actividad de injerto tisular, la membrana amniótica puede servir como tejido de injerto que se puede suturar o pegar con un pegamento biológico. El injerto así implantado sirve como matriz de soporte que es colonizada por las células del paciente durante la cicatrización. Los usos más comunes de la membrana amniótica como injerto en cirugía son, por ejemplo, la cirugía oftálmica, y específicamente las reparaciones de la córnea, la cirugía gástrica para las reparaciones de úlceras, la cirugía reconstructiva de la oreja, específicamente las reconstrucciones del tímpano, la cirugía para la reparación de lesiones cutáneas, específicamente en reparación de afecciones ulcerosas, la cirugía de reparación nerviosa, ligamentosa y tendinosa.
- 50 Un historial detallado así como un procedimiento de recogida, conservación por congelación, y uso de una membrana amniótica como injerto en cirugía oftalmológica se describen en la patente US 6.152.142. En este documento, la técnica descrita comprende una etapa de retirada del corion antes del colocamiento del amnios en una solución de conservación antes de su congelación.
- 55 El uso de la membrana corioamniótica completa también se conoce como injerto tisular, sin que se hayan separado el amnios y el corion. Los usos más comunes de la membrana completa corioamniótica como injerto en cirugía son, por ejemplo, en la cirugía ligamentosa, la cirugía que implica fascia y los tratamientos de lesiones y úlceras cutáneas.
- 60

También se conocen aplicaciones en inyección intraarticular de membrana corioamniótica triturada que presentaría propiedades vinculadas a la limitación de la artrosis.

5 Las membranas amnióticas crioconservadas también han demostrado sus propiedades antiinflamatoria, antifibrótica y antiangiogénica, al igual que su capacidad para favorecer la epitelización. Las membranas amnióticas tratadas para ser descelularizadas a fin de que solo queden las matrices extracelulares, son, por tanto, tejidos reconocidos por sus intereses fisiológicos en el contexto de los injertos tisulares.

Sin embargo, existen problemas de seguridad sanitaria así como de conservación tisular para estos productos en un uso como injerto.

10 Las membranas amnióticas, coriónicas, tisulares esponjosas o las membranas corioamnióticas, al ser de tejidos biológicos, el riesgo de transmisión de una infección de un donante a un receptor, o de contaminación durante la recogida del tejido durante el parto, durante tratamientos preparatorios del tejido, o durante el transporte de este tejido es importante.

15 Se conocen, por ejemplo, de la patente US 8.709.494 injertos obtenidos por procedimientos de preparación separados de membrana amniótica y de membrana coriónica, a partir de una membrana corioamniótica completa, antes de reensamblar las mismas por laminación antes de la deshidratación. Se observará más particularmente que el procedimiento descrito en este documento comprende una etapa de separación de las membranas amniótica y coriónica para limpiarlas, siendo la membrana retenida para tratamiento, después de la limpieza, calentada en una bolsa para deshidratarla, a una temperatura comprendida entre 35 °C y 50 °C. Para recoger injertos exentos de cualquier contaminación patógena, los injertos se someten a ensayo y se recolectan y tratan en un medio estéril; el procedimiento descrito no comprende ninguna etapa de desinfección. Esta selección conduce a una tasa de rechazo de injertos muy alta.

20 De hecho, un procedimiento eficaz tanto de desinfección como de conservación de estos tejidos es vital para la seguridad de los pacientes.

25 El método de tratamiento por crioconservación, aunque eficaz, presenta el inconveniente de requerir la instalación de congeladores para uso clínico que son costosos y voluminosos. Este método también implica la limitación de asegurar la conservación de la cadena de frío entre el lugar de preparación de las membranas amnióticas y el lugar de uso, a saber, la sala de operaciones quirúrgicas o a la cabecera del paciente. Además, el uso de crioconservantes según esta técnica implica la necesidad de tener que retirarlos de los tejidos antes de su uso. En efecto, estos crioconservantes son conocidos bien por su toxicidad, por ejemplo DMSO, bien por las modificaciones estructurales que inducen en los tejidos, como, por ejemplo, glicerol.

30 Se han desarrollado métodos alternativos a fin de evitar esta limitación técnica, por ejemplo, tratamientos que constan de una etapa de interacción de los injertos con antibióticos y/o antimicóticos. Por ejemplo, Nakamura propuso en 2004, en *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, enero de 2004, Vol. 45, N.º 1, un método de desinfección, esterilización y liofilización de la membrana amniótica destinado a la reconstrucción de una superficie ocular. La etapa de desinfección de la membrana amniótica se realiza mediante incubación en solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contiene antibióticos y antimicóticos. La descelularización de la membrana amniótica se lleva a cabo mediante incubación en ácido etilendiaminetetraacético (EDTA). A continuación, la membrana amniótica descelularizada se liofiliza al vacío, el producto así obtenido se envasa y se puede conservar a temperatura ambiente. Una última etapa de irradiación gamma a 25 kGy asegura la esterilización del producto final resultante.

45 En la solicitud de patente CN 104 083 803 se describe un procedimiento de tratamiento del amnios, que comprende específicamente una primera etapa de desinfección que se lleva a cabo tratando la membrana con un agente que es una solución de hidróxido de sodio (0,1 a 0,5 M), peróxido de hidrógeno (1 a 3 g/l), peróxido de acetato (0,1 a 0,5 g/l) o etanol (60 % a 90 %); seguido de una segunda etapa en una solución tampón que comprende una mezcla de antibióticos. A continuación, el amnios se seca al vacío antes de ser envasado.

50 El uso de antibióticos para la preparación de injertos destinados a ser implantados presenta muchos inconvenientes, específicamente el riesgo de inducir resistencias o de usar antibióticos cuyo espectro no es acorde con los microorganismos presentes en los injertos tratados.

También se describen métodos de tratamiento sin antibióticos en tejidos blandos o tejidos más resistentes tales como el hueso.

55 En la solicitud de patente US 2013/0247517 se describe un procedimiento de tratamiento de un amnios destinado a servir como soporte de cicatrización antiadhesión en el tratamiento de heridas. El procedimiento descrito es relativo a un tratamiento químico con glutaraldehído al 1 %. Se considera una descontaminación del material al remojar el amnios en una solución de etanol o de peróxido de hidrógeno, o las dos, sin más aclaración ni control de la descontaminación.

60

En la literatura de patentes también se ha descrito otros productos y procedimientos de tratamiento de tejidos blandos. La patente US 6.024.735 describe, por ejemplo, composiciones y un método para la limpieza de tejidos blandos unidos al hueso y obtenidos a partir de cadáveres. Las composiciones en cuestión constan de un detergente que presenta funciones a base de éter de laurilo y otro detergente que presenta funciones a base de oxiethylato de alquilfenol, y se comercializan con el nombre de Allowash™.

En la patente US 6.482.584 se describe un procedimiento de limpieza por perfusión cíclica de un implante poroso, para la inactivación de patógenos y el producto limpiado y esterilizado resultante, por ejemplo ligamentos unidos al hueso y destinados a formar aloinjertos. El procedimiento de tratamiento usa, entre otros, peróxido de hidrógeno en forma de solución acuosa, y requiere la alternancia de presiones positivas y negativas en el seno de la cámara de lavado en donde se coloca el implante.

En la solicitud de patente FR 2 949 042 a nombre del solicitante se describe un procedimiento de tratamiento de tejido de tipo cartilaginoso destinado a servir como soporte en bioingeniería o a servir como injerto. Este procedimiento comprende específicamente una etapa de lavado con etanol (70 a 100 %), una etapa de extracción de GAG, una etapa de desinfección (incluyendo específicamente un alcohol o peróxido de hidrógeno (5 a 30 %), una etapa de liofilización, y una etapa de esterilización por irradiación gamma.

En el documento DePaula C.A. *et al.* "Effects of Hydrogen Peroxyde Cleaning Procedures on Bone Graft Osteoinductivity and Mechanical Properties", Cell Tissue Bank, 2005; 6(4):287-98, se describen los efectos de la limpieza de tejidos óseos con peróxido de hidrógeno sobre las propiedades de osteoinducción y mecánicas de dichos tejidos. El procedimiento comprende una primera etapa de tratamiento químico con peróxido de hidrógeno al 3 % y una segunda etapa con alcohol desnaturalizado al 70 %.

Las condiciones de tratamiento aplicadas sin antibióticos anteriormente citadas son adaptadas a tejidos bastante resistentes tales como hueso e incluso ligamento, pero aplicadas a una capa membranosa procedente de la placenta durante tiempos y a concentraciones descritas como que presentan una eficacia suficiente para garantizar la descontaminación, se correría el riesgo de provocar su destrucción pura y simple, o al menos la pérdida de todas las funcionalidades biológicas y fisiológicas de interés, incluyendo, entre otros, las diferentes subcapas, los factores de crecimiento, los componentes de la matriz extracelular, tales como la elastina y la laminina.

De hecho, se conoce de Mbithi J. N. *et al.*, Appl. Environ. Microbiol. 1990, vol 12, n.º 1, 147-179 que los virus no envueltos como el virus VHA no son destruidos por las soluciones de peróxido de hidrógeno al 3 o al 6 %.

Asimismo, las reducciones en poliovirus reportadas en el estudio de Reckitt y Colmann, 1997: 1-12, se limitan a una reducción de 3 log a pesar de un tratamiento con concentraciones de H₂O₂ de 7,5 % durante una duración de 6 horas.

Además, la estructura en capas y subcapas de las membranas amnióticas, coriónicas, tisulares esponjosas o las membranas corioamnióticas es perjudicial para la eficacia de los tratamientos excepto para destruir dicha estructura en detrimento de la eficacia de dichas membranas.

Por tanto, un objetivo de la presente invención es proponer un procedimiento de preparación de un material de aloinjerto que forme una membrana viroinactivada, liofilizada y estéril procedente de placenta de mamífero y constituida por al menos una capa membranosa, siendo el material de aloinjerto apto para servir como injerto en cirugía, y según el cual las condiciones de tratamiento no inducen pérdidas o destrucción de al menos una capa membranosa o de las subcapas que la constituyen, o en cualquier caso, las minimizan.

El procedimiento según la invención comprende al menos dos etapas de viroinactivación y al menos una etapa de liofilización según el cual la primera etapa de viroinactivación se lleva a cabo tratando dicha al menos una capa membranosa con un primer agente de viroinactivación seleccionado entre la familia de los alcoholes; y se lleva a cabo una segunda etapa de viroinactivación después de dicha primera etapa de viroinactivación, tratando dicha al menos una capa membranosa con un segundo agente de viroinactivación seleccionado entre la familia de los peróxidos.

Otro objetivo de la presente invención es también proponer un procedimiento de preparación de un material inyectable procedente de la membrana tisular esponjosa viroinactivada, liofilizada y estéril procedente de placenta de mamífero.

El producto obtenido según el procedimiento también está descelularizado, esterilizado y envasado conservando sus propiedades de interés quirúrgico para cumplir su función como injerto o material inyectable. Las ventajas técnicas de este procedimiento con respecto a los procedimientos existentes son:

- asegurar un tratamiento químico viroinactivante y desinfectante del tejido en profundidad para garantizar la seguridad del injerto o del material inyectable. Este tratamiento permite así no tener que separar la membrana amniótica de la membrana coriónica, conservando

de hecho la estructura corioamniótica y los puentes proteicos, por ejemplo, colágeno, vinculando estas dos membranas;

- 5 • proporcionar un tratamiento químico desinfectante del tejido de modo que no se requiera el requisito de asepsia de los tejidos o el uso empírico de antibióticos como en el caso de un procedimiento por crioconservación, presentando este tratamiento químico también la ventaja técnica de poder usar tejidos placentarios obtenidos por parto vaginal, aunque supuestamente ha podido experimentar contaminación microbiana por esta vía,
- 10 • proporcionar un método simple de liofilización de modo que la membrana amniótica, o coriónica, o corioamniótica después del tratamiento según el procedimiento se presenta como perfectamente plana, a saber, sin enrollamiento de la membrana sobre sí misma, y sin presentar un aspecto deformado. En efecto, los procedimientos de preparación conocidos de la técnica anterior que implementan un tratamiento químico seguido de una etapa de liofilización tienden a deformar la membrana en sus bordes durante esta etapa.

Definiciones usadas en la presente solicitud.

15 En la presente solicitud se pueden usar determinadas expresiones o palabras para indicar elementos técnicos, hechos, propiedades o características. Su significado se da a continuación:

- 20 - por "capa membranosa", se entiende una de las láminas tisulares constitutivas de la placenta. En la presente invención se trata bien de la membrana amniótica, bien de la membrana coriónica, bien de la membrana tisular esponjosa, bien de la membrana corioamniótica, pudiendo cada una de estas láminas incluir, o no, las subestructuras fisiológicas constitutivas del amnios y del corion.
- 25 - por "membrana amniótica" o "amnios", se entiende la envoltura tisular que se desarrolla alrededor del embrión, después del feto, en el mamífero durante el embarazo. Tiene como función proteger el organismo en desarrollo manteniendo el líquido amniótico a su alrededor. Se incorpora a la segunda membrana que es el corion. La membrana amniótica incluye las siguientes subcapas fisiológicas: la capa celular epitelial, la membrana basal, la capa compacta, la capa fibroblástica, la capa esponjosa.
- 30 - por "membrana coriónica" o "corion", se entiende la envoltura tisular situada entre el amnios y la pared uterina que se desarrolla alrededor del embrión, después del feto, en el mamífero durante el embarazo. La membrana coriónica incluye las siguientes subcapas fisiológicas: la capa reticular, la membrana basal, la capa celular trofoblástica.
- 35 - por "membrana corioamniótica", se entiende el conjunto amnios y corion, que no han sido separados de forma natural o artificial, estando estos últimos unidos por puentes proteicos.
- por "membrana tisular esponjosa" o "capa esponjosa", se entiende una capa situada entre el amnios y el corion.
- 40 - por "viroinactivación", se entiende una técnica que permite reducir de forma significativa o total, y definitivamente, la capacidad de acción de los virus. Estos, definidos como inactivados, pierden sus capacidades patogénicas y de replicación por una disminución de su población de 4 log durante las titulaciones residuales que siguen una o dos etapas químicas independientes, ya sea en virus envueltos o no envueltos, ADN o ARN.
- 45 - por "liofilización", se entiende una técnica destinada a secar un producto previamente congelado por sublimación. Más precisamente, el líquido a retirar del producto se transforma al principio en hielo mediante congelación; luego, mediante una desecación primaria, al vacío, se sublima el hielo; finalmente, por una desecación secundaria, las moléculas de agua en la superficie del producto se extraen por desorción.
- 50 - por "no dañar la integridad estructural, funcional y biológica de la capa membranosa", se entiende que el producto obtenido según el procedimiento presenta una conservación suficiente de las moléculas biológicas asegurando la estructura mecánica del tejido, tales como el colágeno de diversos tipos, los proteoglicanos, la elastina y la laminina, así como moléculas biológicamente activas, como, por ejemplo, las hormonas, enzimas, factores de crecimiento, a fin de asegurar un uso posterior del producto. Así, según estos parámetros, el producto obtenido según el procedimiento presenta propiedades biológicas similares o casi similares al tejido inicial antes del tratamiento. En la presente invención, estas moléculas son, por ejemplo, la laminina y la elastina; así como factores de crecimiento de tipo EGF (*Epidermal Growth Factor*, factor de crecimiento epidérmico), TGF (*Transforming Growth Factor*, factor de crecimiento transformante) y KGF (*Keratinocyte Growth Factor*, factor de crecimiento de queratinocitos),
- 55 - por "alcoholes", se entiende cualquier compuesto orgánico en donde uno de los carbonos está vinculado a un grupo hidroxilo (-OH).
- 60

- por "peróxidos", se entiende cualquier compuesto químico que contiene un grupo funcional de fórmula general R-O-O-R' (dos átomos de oxígeno vecinos vinculados entre sí) donde R y R' son átomos de hidrógeno o radicales alquilo cualesquiera.

5 El tejido fisiológico destinado a ser tratado según el procedimiento descrito en la presente invención es una membrana amniótica, una membrana coriónica, una membrana tisular esponjosa o una membrana corioamniótica todavía asociada con la placenta. Esta se obtiene tras el parto de un donante debidamente informado y que presta su consentimiento de acuerdo con los requisitos de las directivas europeas y la Ley de Bioética. Este parto puede haber tenido lugar por cesárea o por vía vaginal. Por requisito sanitario relativo a la donación de tejidos y células de origen humano, una calificación socioclínica del donante y biológica previa al donante es sistemática. Esta calificación implica una búsqueda de virus VIH, hepatitis B, C, VLCTH y de la bacteria treponema pálida responsable de la sífilis. El tejido placentario se coloca ventajosamente en una caja estéril, se congela y se transporta a una temperatura de -20 °C, luego se almacena a -80 °C. El tejido placentario también se puede transportar a +4 °C durante la extracción para su preparación. Si los datos clínicos del donante cumplen con los requisitos relativos a la donación tisular, y el análisis de sangre de búsqueda de bacterias y virus es negativo, el tejido elegible puede someterse al procedimiento de preparación posiblemente después de la descongelación.

10 El tejido fisiológico de interés se separa de la placenta, se llevan a cabo una limpieza y control de calidad. El tejido fisiológico puede ser una membrana amniótica separada naturalmente de la membrana coriónica durante el parto o separada artificialmente por intervención mecánica humana; o una membrana coriónica separada naturalmente de la membrana amniótica durante el parto o separada artificialmente por intervención mecánica humana; o incluso una membrana corioamniótica entera, sin que se haya efectuado la separación entre la membrana amniótica y la membrana coriónica. La membrana tisular esponjosa, presente de forma natural entre la membrana amniótica y la membrana coriónica puede retirarse o no retirarse.

15 Si el tejido placentario no fue congelado inicialmente, el corte y la separación de las diferentes membranas de la placenta se pueden realizar después del transporte a + 4 °C, las membranas obtenidas pueden ser conservadas a -80 °C.

20 La placenta no separada de sus tejidos fisiológicos puede congelarse para su conservación a una temperatura de -80 °C durante una duración de hasta 2 años si el tejido fisiológico no tiene que ser tratado inmediatamente.

25 El procedimiento según la invención se caracteriza por una sucesión de etapas no intercambiables y aplicadas al tejido fisiológico que es una capa membranosa que puede cortarse previamente o no si procede.

30 Según otro modo de realización, la membrana tisular esponjosa se extrae mediante presión de la membrana amniótica para conservar únicamente la capa de interés. Alternativamente, esta membrana tisular esponjosa también se puede recoger y conservar en un vial al vacío.

35 A fin de garantizar la inocuidad del producto terminado como material de aloinjerto, se lleva a cabo una primera fase de tratamiento químico. En efecto, el producto terminado debe estar exento de agentes microbiológicos tales como bacterias, virus, parásitos.

40 La capa membranosa en estado congelado se puede lavar ventajosamente en agua purificada o permanece en un baño de agua purificada. Esta etapa asegura tanto la descongelación del tejido, si es necesario, hasta la temperatura ambiente, como la lisis de las células presentes en el tejido por efecto de la presión osmótica.

45 La primera etapa del tratamiento químico viroinactivante es la aplicación a la capa membranosa de un lavado, o la permanencia de esta última en un baño, compuesto por un primer agente viroinactivante que es el etanol. Un lavado de la capa membranosa con agua purificada o una permanencia en un baño de agua purificada puede llevarse a cabo ventajosamente después de esta etapa.

50 Según un modo de realización, el primer agente de viroinactivación es etanol con un contenido de alcohol comprendido entre 50 % y 80 %, y preferentemente a 70 % v/v.

55 Según otro modo de realización, la primera etapa de viroinactivación se lleva a cabo tratando la capa membranosa con etanol al 70 % v/v durante aproximadamente 60 minutos.

La segunda etapa del tratamiento químico viroinactivante es la aplicación a la capa membranosa de un lavado, o la permanencia de esta última en un baño, compuesto por un segundo agente de viroinactivación que es el peróxido de hidrógeno.

60 Como se ha expuesto anteriormente, se sabe que el tratamiento con soluciones de peróxido de hidrógeno es eficaz en virus no envueltos solo a concentraciones superiores al 10 %.

Asimismo ha sido demostrado por el solicitante que el tratamiento de las membranas con soluciones de peróxido de hidrógeno a concentraciones superiores al 10 % durante las duraciones necesarias para la inactivación de virus no envueltos destruye dichas membranas.

- El segundo agente de viroinactivación es peróxido de hidrógeno en una forma seleccionada entre una solución acuosa y un gas.
- Según un modo de realización, el segundo agente de viroinactivación es peróxido de hidrógeno en forma de solución acuosa en una concentración comprendida entre 3 % y 30 % p/v.
- 5 Sorprendentemente, se ha demostrado que dividir la segunda etapa de viroinactivación de dicha al menos una capa membranosa en dos subetapas de tratamiento con peróxido de hidrógeno a diferentes concentraciones y durante diferentes duraciones permitió obtener una eficacia inesperada específicamente en virus no envueltos.
- El procedimiento se caracteriza porque la segunda etapa de viroinactivación de dicha al menos una capa membranosa consta de dos subetapas de tratamiento con el segundo agente de viroinactivación seleccionado entre la familia de los peróxidos.
- 10 Procedimiento de preparación de un material de aloinjerto que forma una membrana viroinactivada, liofilizada y estéril procedente de placenta de mamífero y constituida por al menos una capa membranosa, comprendiendo dicho procedimiento al menos dos etapas de viroinactivación y al menos una etapa de liofilización y según el cual:
- la primera etapa de viroinactivación se lleva a cabo tratando dicha al menos una capa membranosa con un primer agente de viroinactivación seleccionado entre la familia de los alcoholes;
 - una segunda etapa de viroinactivación se lleva a cabo después de dicha primera etapa de viroinactivación, tratando dicha al menos una capa membranosa con un segundo agente de viroinactivación seleccionado entre la familia de los peróxidos, caracterizado por que la segunda etapa de viroinactivación de dicha al menos una capa membranosa consta de dos subetapas de tratamiento con el segundo agente de viroinactivación seleccionado entre la familia de los peróxidos.
- 20
- 25 La segunda etapa de viroinactivación de dicha al menos una capa membranosa consta de dos subetapas de tratamiento con peróxido de hidrógeno:
- llevándose a cabo una primera subetapa de tratamiento con una solución de peróxido de hidrógeno a una concentración superior al 10 % p/v durante menos de 20 minutos; y
 - llevándose a cabo una segunda subetapa de tratamiento con una solución de peróxido de hidrógeno a una concentración inferior al 5 % p/v durante una duración superior a 50 minutos.
- 30
- Según otro modo de realización, la segunda etapa de viroinactivación de dicha al menos una capa membranosa consta de dos subetapas de tratamiento con peróxido de hidrógeno:
- llevándose a cabo una primera subetapa de tratamiento con una solución de peróxido de hidrógeno al 30 % p/v durante aproximadamente 15 minutos; y
 - llevándose a cabo una segunda subetapa de tratamiento con una solución de peróxido de hidrógeno al 3 % p/v durante aproximadamente 60 minutos.
- 35
- Al final de esta segunda etapa de viroinactivación, se procede ventajosamente a una etapa de neutralización, mediante aplicación a la capa membranosa de un lavado, o la permanencia de esta última en un baño, compuesto por al menos un tampón básico.
- 40 Según un modo preferido de realización, se llevan a cabo dos baños en un tampón básico que contiene hidróxido de sodio diluido y cuyo pH se ajusta a 8,5.
- La siguiente etapa de tratamiento químico de la capa membranosa es ventajosamente la aplicación a la capa membranosa de un lavado, o la permanencia de esta última en un baño, compuesto por al menos una solución tampón que asegura un reequilibrio fisiológico de la capa membranosa.
- 45 Según un modo preferido de realización, se llevan a cabo dos baños en solución de PBS.
- Según un modo preferido de realización, las etapas de descongelación, viroinactivación, lavado, ajuste del pH y tamponamiento se llevan a cabo a temperatura ambiente.
- Tras esta primera fase de tratamiento químico, la capa membranosa se somete a una segunda fase de tratamiento que es una liofilización. Esta segunda fase permite tanto asegurar la calidad de conservación al vacío del producto obtenido según el procedimiento, como asegurar una etapa adicional de desinfección y descelularización de la capa membranosa tras el tratamiento químico.
- Según un modo preferido de realización, el procedimiento de liofilización de la capa membranosa se realiza entre dos soportes sustancialmente planos.
- 50 Según un modo más preferido de realización, el procedimiento de liofilización de la capa membranosa se realiza intercalando la capa membranosa entre dos soportes sustancialmente planos, permeables al gas, incluido el vapor de agua, y cuya superficie apoyada en la capa membranosa es sustancialmente hidrófoba al evitar la adherencia conocida de productos de celulosa con residuos celulares de la capa epitelial del amnios.
- 55

Según un modo aún más preferido de realización, el procedimiento de liofilización de la capa membranosa se realiza intercalando la capa membranosa entre dos soportes sustancialmente planos de papel de celulosa o derivado de celulosa.

Por tanto, la capa membranosa viroinactivada se somete a una liofilización en las siguientes condiciones:

- 5 • una congelación en dos etapas:
 - llevándose a cabo la primera etapa de congelación a una temperatura de aclimatación elegida para no dañar la integridad estructural, funcional y biológica de la capa membranosa,
 - 10 - llevándose a cabo la segunda etapa de congelación a la temperatura final de congelación que es inferior a la temperatura de aclimatación;
- una liofilización en dos etapas principales, denominadas primaria y secundaria:
 - llevándose a cabo la etapa de liofilización primaria aplicando un vacío a aproximadamente 200 microbars y un perfil de temperatura ascendente;
 - 15 - llevándose a cabo la etapa secundaria de liofilización aplicando un vacío a aproximadamente 50 microbars y un perfil de temperatura descendente.

En un modo de realización, la temperatura de aclimatación está comprendida entre -5 y -20 °C y la temperatura final de congelación final está comprendida entre -40 y -60 °C.

20 El perfil de temperatura ascendente es ventajosamente un perfil según el cual la temperatura de liofilización se fija inicialmente a una temperatura inicial baja y luego se aumenta a una temperatura final de liofilización primaria, en una o más etapas de temperatura ascendentes intermedias. El perfil de temperatura descendente es ventajosamente un perfil según el cual la temperatura de liofilización se ajusta inicialmente a una temperatura superior a la temperatura final de la etapa de liofilización primaria, luego se baja a una temperatura final de liofilización secundaria superior a la temperatura inicial de etapa de liofilización primaria.

25 Estas condiciones de liofilización permiten obtener un producto, que es una capa membranosa viroinactivada y liofilizada, que se caracteriza específicamente porque presenta un contenido de agua residual a temperatura ambiente inferior al 5 %.

30 El producto obtenido, que es una capa membranosa viroinactivada y liofilizada, se presenta como perfectamente plana. Ventajosamente, se puede cortar según parámetros definidos de antemano para que se corresponda con las necesidades del médico que realiza el injerto del producto obtenido en un paciente.

35 El producto obtenido, que es una capa membranosa viroinactivada y liofilizada, presenta como perfectamente plana y puede ser envasado de esta forma en un envase estéril en condiciones estériles.

Según otro modo de realización, el producto obtenido es una membrana tisular esponjosa viroinactivada y liofilizada.

La capa membranosa viroinactivada y liofilizada, y que está empaquetada, se somete a una última etapa de esterilización que es irradiación gamma.

40 Según un modo preferido de realización, esta etapa de esterilización se lleva a cabo exponiendo la capa membranosa a radiación gamma a 25-32 kGrays.

45 El producto obtenido según el procedimiento es, por tanto, un material de aloinjerto viroinactivado, liofilizado y estéril, constituido por al menos una capa membranosa seleccionada entre la membrana amniótica, la membrana coriónica y la membrana corioamniótica en donde el amnios y el corion están unidos entre sí por puentes proteicos.

El producto obtenido según el procedimiento también puede ser un material inyectable viroinactivado, liofilizado y estéril, constituido por al menos una capa membranosa que es la membrana tisular esponjosa.

50 El producto obtenido según el procedimiento se puede usar como material de aloinjerto seleccionado entre el grupo que consiste en el injerto de ligamento, el injerto de fascia lata, el injerto de tendón, el injerto de duramadre, el injerto de membrana submucosa, el injerto de vaina nerviosa, el injerto ligamentoso, el injerto de cartilago, el injerto de manguito rotador, el injerto de tejido conjuntival, los agentes de tratamiento de heridas y/o úlceras, y los agentes de mejora de suturas.

55 Algunos posibles usos del producto obtenido por el procedimiento son, entre otros y específicamente, la reparación de úlceras de la córnea, la reparación de tendones y/o ligamentos, el reemplazo ligamentoso, la reparación nerviosa por acoplamiento, la reparación cartilaginosa, el reemplazo de la duramadre, el reemplazo de la membrana submucosa, el fortalecimiento del manguito rotador, el tratamiento de úlceras conjuntivales y/o corneales, el tratamiento de úlceras y/o heridas cutáneas, y la mejora de las cicatrizaciones y suturas.

Algunos posibles usos del producto también obtenido según el procedimiento a partir de la membrana tisular esponjosa son, por ejemplo, el tratamiento de inyección intraarticular del estado preartrósico o artrósico y la reparación ligamentosa, meniscal o cartilaginosa.

Otro uso posible del producto según la invención es, por ejemplo, una matriz de soporte de ingeniería tisular para cultivar células mesenquimales o fibroblastos.

La invención se comprenderá y completará mejor haciendo referencia de manera útil a las figuras, que se incluyen únicamente a modo de ilustración, y cuyo resumen se da a continuación:

Breve descripción de las figuras

Figura 1: Representación sintética de las etapas del procedimiento de preparación del material de aloinjerto.

Figura 2a: Fotografía de microscopía óptica de una sección de una membrana corioamniótica no tratada, teñida con hematoxilina-eosina. El aumento empleado es de x40. (1) designa la membrana amniótica. (2) designa la membrana tisular esponjosa. (3) designa el corion.

Figura 2b: Fotografía de microscopía óptica de una sección de una membrana corioamniótica tratada según el procedimiento, teñida con hematoxilina-eosina. El aumento empleado es de x40. (1) designa la membrana amniótica. (2) designa la membrana tisular esponjosa. (3) designa el corion.

Se hará referencia a las figuras así identificadas como necesarias en la descripción detallada a continuación de un ejemplo de un modo de realización de la invención.

Ejemplo 1: Ejemplo de un modo de realización de la invención donde se trata una capa membranosa según el procedimiento a fin de convertirse en un material de aloinjerto.

Se hará referencia a la Figura 1 para visualizar las etapas importantes del procedimiento.

Un donante debidamente informado y que consiente los requisitos de la Declaración de Helsinki dona el tejido placentario procedente de un parto. Este parto puede haber tenido lugar por cesárea o por vía vaginal. Por requisito sanitario relativo a la donación de tejidos y células de origen humano, una calificación previa del donante es sistemática. Esta calificación implica una búsqueda de virus VIH, hepatitis B, C, VLCTH y de la bacteria treponema pálida responsable de la sífilis.

El tejido placentario se recupera lo antes posible en la sala de partos después del parto, ya sea por vía vaginal o por cesárea. Ventajosamente, se puede colocar en una caja estéril y luego congelar a una temperatura de -20 °C.

Este tejido placentario aislado puede conservarse en seco a una temperatura de -80 °C hasta una duración de dos años o tratarse directamente según el procedimiento.

En el laboratorio, en una sala estéril, se aplica el siguiente procedimiento:

La capa membranosa de interés, que puede ser por ejemplo el amnios, el corion o la membrana corioamniótica, se aísla de la placenta y se limpia. En la Figura 2a se presenta una fotografía de microscopía óptica de una membrana corioamniótica aún no tratada y teñida con hematoxilina-eosina, se indican las diferentes capas de componentes, a saber: (1) designa la membrana amniótica. (2) designa la membrana tisular esponjosa. (3) designa el corion.

Alternativamente, después de la extracción, el tejido placentario se puede colocar a aproximadamente + 4 °C. En una sala estéril, la capa membranosa de interés se aísla y se limpia. Esta capa membranosa se puede conservar en seco a una temperatura de -80 °C hasta una duración de dos años.

La capa membranosa se somete a una sucesión de baños que garantizan un tratamiento químico de la misma. Este tratamiento tiene como objetivo una desinfección de la capa membranosa de interés, y más particularmente su viroinactivación. Se aplica una agitación suave a aproximadamente 30 rpm del medio líquido durante cada baño a fin de asegurar una penetración homogénea de los disolventes en los tejidos, evitando romper los puentes proteicos entre el corion y el amnios si la capa membranosa sobre la cual se aplica el procedimiento es la membrana corioamniótica.

En un primer momento, la capa membranosa se deposita en un baño de agua purificada a temperatura ambiente durante aproximadamente 3 horas. Esta etapa asegura tanto la descongelación del tejido fisiológico como una primera etapa de lisis celular por presión osmótica.

Después, la capa membranosa se transfiere a un baño descontaminante compuesto por etanol al 70 % v/v a temperatura ambiente durante aproximadamente 1 hora.

Un lavado se lleva a cabo en agua purificada durante aproximadamente 15 minutos a temperatura ambiente para retirar el etanol.

A fin de asegurar la segunda etapa de tratamiento descontaminante, la capa membranosa se transfiere a un baño compuesto por peróxido de hidrógeno al 30 % p/v a temperatura ambiente durante aproximadamente 15 minutos.

Después la capa membranosa se transfiere a un baño descontaminante compuesto por peróxido de hidrógeno al 3 % p/v a temperatura ambiente durante aproximadamente 1 hora.

La acción química aplicada a la capa membranosa puede entonces neutralizarse en al menos un baño que consta, por ejemplo, de hidróxido de sodio diluido alrededor de un pH de 8,5. El al menos un baño de neutralización se lleva a cabo a temperatura ambiente durante aproximadamente 15 minutos. Se han encontrado resultados interesantes en esta etapa de neutralización usando dos baños de hidróxido de sodio diluido a pH 8,5.

A fin de asegurar un reequilibrio del pH y para eliminar lo mejor posible los residuos orgánicos que se desprenden del tejido de interés, la capa membranosa se transfiere al menos a un baño de tampón fisiológico, seleccionado de manera apropiada, a fin de asegurar su reequilibrio fisiológico. El al menos un baño se lleva a cabo a temperatura ambiente durante aproximadamente 15 minutos. Se han encontrado resultados interesantes en esta etapa usando dos baños sucesivos en solución de PBS.

Por último, la capa membranosa se puede transferir a un último baño con agua purificada, a temperatura ambiente, durante al menos 15 minutos y hasta aproximadamente 1 hora.

En esta etapa del procedimiento, se puede considerar que la capa membranosa obtenida según este tratamiento químico puede definirse como una membrana en gran parte desinfectada, específicamente viroinactivada y descelularizada.

Tras esta parte relativa a los tratamientos químicos, la capa membranosa se somete a un tratamiento de liofilización.

Sobre una placa de acero inoxidable, la capa membranosa se coloca ventajosamente entre dos capas de filtros de soporte, preferentemente de celulosa o derivado de celulosa como, por ejemplo, metilcelulosa en malla para facilitar los intercambios de vapor de agua.

Si la capa membranosa se define como que es amnios, que es un tejido particularmente fino, a fin de evitar cualquier riesgo de que la capa de la membrana se pliegue durante la etapa de liofilización, se coloca una rejilla sobre ella, que está intercalada entre los dos filtros de soportes, de modo que aproximadamente 1 mm separa la rejilla del filtro de soporte superior.

El conjunto descrito anteriormente se transfiere a un liofilizador donde se llevan a cabo una etapa de congelación seguida de una etapa de liofilización según las siguientes modalidades:

- Congelación:

- La primera etapa de congelación se lleva a cabo a una temperatura de aclimatación seleccionada para no dañar la integridad estructural, funcional y biológica de la capa membranosa;

- la segunda etapa de congelación se lleva a cabo a la temperatura final de congelación que es inferior a la temperatura de aclimatación;

- Liofilización:

- Una etapa de liofilización primaria se lleva a cabo aplicando un vacío a aproximadamente 200 microbars y aplicando un perfil de temperatura ascendente;

- Una etapa secundaria de liofilización se lleva a cabo aplicando un vacío a aproximadamente 50 microbars y aplicando un perfil de temperatura descendente.

Después de esta etapa de liofilización, la capa membranosa según este tratamiento puede definirse como una membrana desinfectada, específicamente viroinactivada, descelularizada y liofilizada. La capa membranosa no presenta ni bordes vueltos, ni un aspecto deformado o gofrado, y se presenta como perfectamente plana. En la Figura 2b se presenta una fotografía por microscopía óptica de una sección de membrana corioamniótica tratada según el procedimiento, se indican las diferentes capas de componentes, a saber: (1) designa la membrana amniótica. (2) designa la membrana tisular esponjosa. (3) designa el corion.

La capa membranosa obtenida se puede cortar ventajosamente en esta etapa del procedimiento. Los profesionales de la salud, para los cuales está destinado el producto final, pueden proporcionar los parámetros de corte exactos de acuerdo con sus necesidades de ejercicio.

La membrana viroinactivada y liofilizada obtenida se envasa plana en condiciones estériles.

La extracción de las membranas, que es la membrana tisular esponjosa, se puede envasar en un vial al vacío.

Fuera de la sala estéril, se lleva a cabo una última etapa de esterilización de la capa membranosa viroinactivada y liofilizada exponiendo la misma a radiación gamma a 25-32 kGrays.

El producto así obtenido se puede distribuir para ser usado como material de aloinjerto, por ejemplo, el injerto de ligamento, el injerto de fascia lata, el injerto de tendón, el injerto de duramadre, el injerto de membrana submucosa, el injerto de vaina nerviosa, el injerto de cartilago, el injerto de manguito rotador, el injerto de tejido conjuntival, los agentes de tratamiento de heridas y/o úlceras, y los agentes de mejora de cicatrización y suturas.

Algunos posibles usos del producto obtenido según el procedimiento son, por tanto, entre otros y específicamente, como se ha indicado anteriormente, la reparación de úlceras de la córnea, la reparación de tendón y/o ligamento, el reemplazo ligamentoso, la reparación nerviosa por acoplamiento, el reemplazo de la duramadre, el reemplazo de la membrana submucosa, el

fortalecimiento del manguito de los rotadores, el tratamiento de úlceras conjuntivales y/o corneales, el tratamiento de úlceras y/o heridas cutáneas, y la mejora de las suturas.

Ejemplo 1 a: Ejemplo de un modo de realización de la invención donde se trata una capa membranosa según el procedimiento a fin de convertirse en un material de aloinjerto.

- 5 Se hará referencia a la Figura 1 para visualizar las etapas importantes del procedimiento.
Un donante debidamente informado y que consiente los requisitos de la Declaración de Helsinki dona el tejido placentario procedente de un parto que tiene lugar por vía vaginal. La prueba de detección del donante para los virus VIH, hepatitis B, C, VLCTH y de la bacteria treponema pálida responsable de la sífilis es negativa.
- 10 El tejido placentario se recupera lo antes posible en la sala de partos después de un parto. Se coloca en una caja estéril y luego se congela a una temperatura de -20 °C y se transporta al laboratorio. En el laboratorio, en una sala estéril, se aplica el siguiente procedimiento:
La capa membranosa de interés, que es la membrana corioamniótica, se aísla de la placenta y se limpia.
- 15 La capa membranosa se somete a una sucesión de baños que garantizan un tratamiento químico de la misma. Se aplica una agitación suave a 30 rpm del medio líquido durante cada baño a fin de asegurar una penetración uniforme de los disolventes en los tejidos, evitando romper los puentes proteicos entre el corion y el amnios de la membrana corioamniótica.
En un primer momento, la capa membranosa se deposita en un baño de agua purificada a temperatura ambiente durante 3 horas. Esta etapa asegura tanto la descongelación del tejido fisiológico como una primera etapa de lisis celular por presión osmótica.
Después, la capa membranosa se transfiere a un baño descontaminante compuesto por etanol al 70 % v/v a temperatura ambiente durante 1 hora.
Un lavado se lleva a cabo en agua purificada durante 15 minutos a temperatura ambiente para retirar el etanol.
- 25 A fin de asegurar la segunda etapa de tratamiento descontaminante, la capa membranosa se transfiere a un baño compuesto por peróxido de hidrógeno al 30 % p/v a temperatura ambiente durante 15 minutos.
Después la capa membranosa se transfiere a un baño descontaminante compuesto por peróxido de hidrógeno al 3 % p/v a temperatura ambiente durante 1 hora.
La acción química aplicada a la capa membranosa se neutraliza en dos baños sucesivos de hidróxido de sodio diluido a un pH de 8,5. Cada uno de los baños de neutralización se lleva a cabo a temperatura ambiente durante 15 minutos.
A fin de asegurar un reequilibrio del pH y para eliminar lo mejor posible los residuos orgánicos que se desprenden del tejido de interés, la capa membranosa se transfiere a dos baños sucesivos en solución de PBS a fin de asegurar su reequilibrio fisiológico. Cada uno de los baños se lleva a cabo a temperatura ambiente durante 15 minutos.
Por último, la capa membranosa se transfiere a un último baño con agua purificada, a temperatura ambiente, durante 15 minutos.
- 40 Tras esta parte relativa a los tratamientos químicos, la capa membranosa se somete a un tratamiento de liofilización.
Sobre una placa de acero inoxidable, la capa membranosa se coloca entre dos capas de filtros de soporte de metilcelulosa en malla para facilitar los intercambios de vapor de agua.
El conjunto descrito anteriormente se transfiere a un liofilizador donde se llevan a cabo una etapa de congelación seguida de una etapa de liofilización según las siguientes modalidades:
- 45 Congelación:
La primera etapa de congelación se lleva a cabo a una temperatura de -10 °C durante 5 minutos, después a -15 °C durante 90 minutos;
la segunda etapa de congelación se lleva a cabo a una temperatura de -50 °C durante 125 minutos;
- 50 Liofilización:
Una etapa de liofilización primaria se lleva a cabo aplicando un vacío a 200 microbars y aplicando una temperatura de + 10 °C durante 8 horas, seguido de una temperatura de + 25 °C durante 150 minutos;
Una etapa secundaria de liofilización se lleva a cabo aplicando un vacío a 50 microbars y aplicando una temperatura de +35 °C durante 5 horas, seguido de una temperatura de + 25 °C durante 1 hora.
- 55 Después de esta etapa de liofilización, la capa membranosa no presenta ni bordes vueltos, ni un aspecto deformado o gofrado, y se presenta como perfectamente plana.
La capa membranosa obtenida se corta en esta etapa del procedimiento en rectángulos de 20 por 10 cm (o 20 por 20 cm) haciéndola apta para ser usada como material de aloinjerto en la reparación del ligamento.
- 60 La membrana viroinactivada y liofilizada obtenida se envasa plana en condiciones estériles.

Fuera de la sala estéril, se lleva a cabo una última etapa de esterilización de la capa membranosa viroinactivada y liofilizada exponiendo la misma a radiación gamma a 25-32 kGrays.

El producto así obtenido se distribuye para ser usado como material de aloinjerto para un uso en la reparación del ligamento.

5 **Ejemplo 2: Demostración de la eficacia de la viroinactivación de la capa membranosa según el procedimiento.**

Las medidas de la carga viral se llevaron a cabo en membranas corioamnióticas, mediante inyección de virus entre el amnios y el corion para comprobar la viroinactivación de los tejidos según el procedimiento.

10 Se extraen alícuotas de las membranas así tratadas para colocarlas en solución y centrifugarlas. La fracción soluble sirve para sembrar células en medio de cultivo celular. Cada tipo de virus estudiado se siembra en el tipo adecuado de células a fin de permitir la expresión de su virulencia.

15 Los virus que han sido objeto de medición son el virus parvovirus porcino (en adelante, PVP), el virus de la pseudorrabia (en lo sucesivo denominado, VPR) implicado en la enfermedad de Aujeszky y el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (en lo sucesivo denominado VIH-1), el virus de la hepatitis A (en lo sucesivo denominado VHA).

20 Las medidas de carga viral se llevaron a cabo detectando la producción viral en las células infectadas y más particularmente observando un efecto específico citopático. Los virus inyectados en las capas membranosas se sometieron a la etapa de tratamiento químico con etanol al 70 % v/v según el procedimiento, o la etapa de tratamiento químico con peróxido de hidrógeno al 30 % p/v y luego 3 % p/v según el procedimiento.

Cada medición de carga viral se realizó dos veces para cada ensayo, estas se indican en la siguiente tabla mediante las indicaciones Análisis A y Análisis B.

25 Los resultados de la siguiente tabla representan la disminución de la carga viral medida, expresada en log. Esta disminución se mide mediante la comparación de la carga viral en la capa membranosa antes, y después del tratamiento indicado.

Resultados		
Virus	Tratamiento con H ₂ O ₂	Tratamiento con etanol
PVP	Análisis A = 4,53	Análisis A = 1,43
	Análisis B = 3,94	Análisis B = 2,03
VPR	Análisis A > 2,89	Análisis A > 5,18
	Análisis B > 3,13	Análisis B > 4,83
VHA	Análisis A > 3,66	Análisis A = 1,37
	Análisis B > 4,02	Análisis B = 1,37
VIH-1	No aplicable	Análisis A > 4,52
		Análisis B > 4,50

Se puede observar la eficacia de los tratamientos químicos según el procedimiento, aplicados a las capas membranosas y destinados a la viroinactivación.

30 El tratamiento químico con peróxido de hidrógeno es eficaz contra PVP, VPR y VHA. Con respecto al VIH-1, las condiciones de realización de las mediciones no pudieron dar resultados interpretables.

El tratamiento químico con etanol es eficaz contra VPR y VIH-1 y, en menor medida, eficaz contra los virus desnudos (no envueltos) como PVP y VHA.

35 Como se ha demostrado, solo la combinación de los dos tratamientos químicos permite asegurar la viroinactivación de las capas membranosas, tanto de los virus envueltos como de los virus desnudos. Esta viroinactivación se define por una disminución en la población viral de al menos 4 log.

Ejemplo 2 a: Demostración de la eficacia de la viroinactivación de la capa membranosa según el procedimiento.

40 Las medidas complementarias de la carga viral se llevaron a cabo en membranas corioamnióticas, mediante inyección de virus entre el amnios y el corion para comprobar la viroinactivación de los tejidos según el procedimiento.

Se extraen alícuotas de las membranas así tratadas para colocarlas en solución y centrifugarlas. La fracción soluble sirve para sembrar células en medio de cultivo celular. Cada tipo de virus estudiado se siembra en el tipo adecuado de células a fin de permitir la expresión de su virulencia.

Las medidas de carga viral se llevaron a cabo detectando la producción viral en las células infectadas y más particularmente observando un efecto específico citopático. Los virus que han sido objeto de medición son el virus de la pseudorrabia (en lo sucesivo denominado VPR) implicado en la enfermedad de Aujeszky, y el virus de la hepatitis A (en lo sucesivo denominado VHA).

- 5 Los virus inyectados en las capas membranosas se sometieron a la etapa de tratamiento químico con peróxido de hidrógeno al 30 % p/v y luego al 3 % p/v según el procedimiento. Los resultados de la siguiente tabla representan la disminución de la carga viral medida, expresada en log. Esta disminución se mide mediante la comparación de la carga viral en la capa membranosas antes, y después del tratamiento indicado.

Resultados	
Virus	Tratamiento con H ₂ O ₂
VPR	Análisis A > 4,47 Análisis B > 4,47
VHA	Análisis A > 4,47 Análisis B > 4,53

10

Se puede observar la eficacia de los tratamientos químicos según el procedimiento, aplicados a las capas membranosas y destinados a la viroinactivación.

El tratamiento químico con peróxido de hidrógeno es eficaz contra VPR y VHA.

- 15 Como se ha demostrado, el tratamiento con peróxido de hidrógeno según el procedimiento permite asegurar una viroinactivación de las capas membranosas hacia el virus VPR y el virus VHA. Esta viroinactivación se define por una disminución en la población viral de al menos 4 log.

Ejemplo 2 b: Demostración de la eficacia de la viroinactivación de la capa membranosas según el procedimiento.

- 20 Las medidas de carga viral se llevaron a cabo en membranas amnióticas cuya unión a sus membranas tisulares esponjosas ha sido preservada, mediante inyección de virus entre la membrana amniótica y la membrana tisular esponjosa para comprobar la viroinactivación de los tejidos según el procedimiento.

- 25 Se extraen alícuotas de las membranas así tratadas para colocarlas en solución y centrifugarlas. La fracción soluble sirve para sembrar células en medio de cultivo celular. Cada tipo de virus estudiado se siembra en el tipo adecuado de células a fin de permitir la expresión de su virulencia.

Los virus que han sido objeto de medición son el virus del parvovirus porcino (en lo sucesivo denominado PVP) y el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (en lo sucesivo denominado VIH-1).

- 30 Las medidas de carga viral se llevaron a cabo detectando la producción viral en las células infectadas y más particularmente observando un efecto específico citopático. Los virus inyectados en las capas membranosas se sometieron a la etapa de tratamiento químico con peróxido de hidrógeno al 30 % p/v y luego al 3 % p/v según el procedimiento.

Cada medición de carga viral se realizó dos veces para cada ensayo, estas se indican en la siguiente tabla mediante las indicaciones Análisis A y Análisis B.

- 35 Los resultados de la siguiente tabla representan la disminución de la carga viral medida, expresada en log. Esta disminución se mide mediante la comparación de la carga viral en la capa membranosas antes, y después del tratamiento indicado.

Resultados	
Virus	Tratamiento con H ₂ O ₂
VIH-1	Análisis A > 6,02 Análisis B > 5,90
PVP	Análisis A = 6,47 Análisis B = 5,66

- 40 Se puede observar la eficacia de la etapa de tratamiento químico con peróxido de hidrógeno al 30 % p/v y luego al 3 % p/v según el procedimiento, aplicada a las capas membranosas, y destinada a la viroinactivación.

El tratamiento químico con peróxido de hidrógeno, aplicado a una membrana amniótica cuya unión con sus membranas tisulares esponjosas se ha preservado, es eficaz contra PVP y VIH-1.

Como se ha demostrado, el tratamiento con peróxido de hidrógeno según el procedimiento permite asegurar una viroinactivación de las capas membranosas hacia el virus VIH-1 y el virus PVP. Esta viroinactivación se define por una disminución en la población viral de al menos 4 log.

Ejemplo 3: Demostración de la eficacia de la conservación de factores de crecimiento de capas membranosas producidas según el procedimiento.

Las medidas de los factores de crecimiento mediante inmunoensayo ELISA se llevaron a cabo en capas membranosas antes de la aplicación del procedimiento y después de la aplicación del procedimiento.

En las capas membranosas, a saber, membranas amnióticas, se evalúa la cantidad de factor de crecimiento, que es TGF (*Transforming Growth Factor*, factor de crecimiento transformante) de tipo beta 1.

Antes de la aplicación del procedimiento, se mide una cantidad de TGF beta 1 de 10 a 20 ng/g de producto ensayado.

Después de la aplicación del procedimiento, esta cantidad se mide entre 1,7 y 13,6 ng/g.

En las capas membranosas, a saber, membranas amnióticas y membranas coriónicas, se evalúa la cantidad de factor de crecimiento, que es EGF (*Epidermal Growth Factor*, factor de crecimiento epidérmico).

Antes de la aplicación del procedimiento, se mide una cantidad de EGF de aproximadamente 0,4 a 1,6 ng/g de producto ensayado.

Después de la aplicación del procedimiento, esta cantidad se mide entre 0,01 y 0,2 ng/g.

Las tasas de conservación de los factores de crecimiento medidas son muy variables, pero siempre demuestran su presencia. En efecto, entran en juego muchos criterios que explican estas fluctuaciones, por ejemplo: dependiendo de si la membrana amniótica está ubicada al nivel de la placenta o más distante, según variaciones individuales, o según la ubicación de la extracción ya que está principalmente en el nivel de la capa esponjosa a medida que se concentran estos factores.

Ejemplo 3 a: Demostración de la eficacia de la conservación de factores de crecimiento de capas membranosas producidas según el procedimiento.

Las medidas complementarias de los factores de crecimiento mediante inmunoensayo ELISA se llevaron a cabo en capas membranosas antes de la aplicación del procedimiento y después de la aplicación del procedimiento.

Las capas membranosas que han sido objeto de mediciones complementarias son las membranas amnióticas y las membranas corioamnióticas.

Los factores de crecimiento medidos son EGF (*Epidermal Growth Factor*, factor de crecimiento epidérmico), TGF (*Transforming Growth Factor*, factor de crecimiento transformante) de tipo beta 1 y FGF (*Fibroblast Growth Factor*, factor de crecimiento de fibroblastos).

Los resultados se presentan en la siguiente tabla en forma de promedios de los resultados obtenidos.

La tasa de conservación de los factores de crecimiento después de la aplicación del procedimiento también se indica en porcentajes.

	Amnios antes del tratamiento en ng/g	Amnios después del tratamiento en ng/g	Tasa de conservación	Membrana corioamniótica antes del tratamiento en ng/g	Membrana corioamniótica después del tratamiento en ng/g	Tasa de conservación
EGF	1,11	0,06	6 %	0,6	0,007	1 %
TGF-β1	30,92	3,41	11 %	13,39	8,64	65 %
FGF	3,21	0,02	1 %	0,71	0,15	23 %

Las tasas de conservación de los factores de crecimiento medidas son muy variables, pero siempre demuestran su presencia en la membrana tratada.

Ejemplo 4: Demostración de la conservación de las proteínas estructurales de las capas membranosas obtenidas según el procedimiento.

Las pruebas de resistencia a la tracción de las membranas amnióticas y corioamnióticas se llevaron a cabo según el método descrito por Tanaka en la referencia "Tensile properties of amniotic membrane" (Tanaka *et al.*, 2010) con un cálculo llevado a cabo con la fórmula matemática:

$$R = F_{\text{máx}} L_{\text{muestra}} / l_{\text{muestra}}$$

en donde,

R es la fuerza de ruptura de la muestra;

$F_{\text{máx}}$ es la fuerza máxima ejercida por el aparato de medición;

L_{muestra} es el área de la muestra;

5 l_{muestra} es el ancho de la muestra

Estos ensayos tienen por objetivo comparar las resistencias a la tracción de las membranas no tratadas en la recogida y de las membranas tratadas químicamente y liofilizadas según el procedimiento, los valores obtenidos se cotejan en la siguiente tabla.

Tratamiento	Muestra	Fuerza de ruptura (kPa)	Promedio	Desviación típica
Recogida (no tratada)	Membrana amniótica 1	9,5	8,2	4,0
		11,4		
		3,8		
	Membrana corioamniótica 1	9,9	9,1	5,1
		13,9		
		3,8		
	Membrana amniótica 2	9,4	7,1	3,2
		4,9		
	Membrana corioamniótica 2	4,8	5,8	1,5
6,9				
Después del tratamiento químico y liofilización	Membrana amniótica 3	5,1	10,3	4,7
		11,4		
		14,4		
	Membrana corioamniótica 4	17,9	17,9	/
	Membrana corioamniótica 5	5,9	5,9	/

10 Estas pruebas de resistencia a la tracción demuestran que las fibras de proteínas de interés de colágeno I, laminina V y elastina se conservan después del tratamiento químico, liofilización y esterilización. En efecto, las diferencias de resistencia entre las membranas no tratadas en la recogida y las membranas tratadas químicamente y liofilizadas según el procedimiento no son significativas.

15 Estas observaciones fueron confirmadas mediante ensayos inmunohistoquímicos llevados a cabo en membranas amnióticas y membranas corioamnióticas, a fin de visualizar y localizar las proteínas de interés que son colágeno I, laminina V y elastina. Estos ensayos se llevaron a cabo sobre membranas no tratadas en la recogida y sobre membranas después de haber sido sometidas a todas las etapas del procedimiento.

Los resultados demostraron que las proteínas de interés se conservaron después del tratamiento.

20 **Ejemplo 4 a: Demostración de la conservación de las proteínas estructurales de las capas membranosas obtenidas según el procedimiento.**

Las pruebas de resistencia complementarias a la tracción de las membranas amnióticas y corioamnióticas se llevaron a cabo según el método descrito por Tanaka. Para este ensayo, los cálculos se llevaron a cabo con la fórmula:

25 " $R = F_{\text{máx}} E_{\text{muestra}} / l_{\text{muestra}}$ (Pa)"

en donde,

R es la fuerza de ruptura de la muestra;

$F_{\text{máx}}$ es la fuerza máxima ejercida por el aparato de medición;

E_{muestra} es el espesor de la muestra;

30 l_{muestra} es el ancho de la muestra.

ES 2 816 552 T3

Tratamiento	Muestra	Fuerza de ruptura (Kpa)	Promedio	Desviación típica
Membrana amniótica antes del tratamiento	Muestra n.º 1	905	631	274
		357		
	Muestra n.º 2	893	679	303
		464		
Membrana corioamniótica antes del tratamiento	Muestra n.º 1	217	261	44
		305		
	Muestra n.º 2	104	128	33
151				

Tratamiento	Muestra	Fuerza de ruptura (Kpa)	Promedio	Desviación típica
Membrana amniótica tratada según el procedimiento	Muestra n.º 3	390	351	55
		312		
	Muestra n.º 4	520	520	0
Membrana corioamniótica tratada según el procedimiento	Muestra n.º 5	381	299	71
		261		
		254		
	Muestra n.º 1	247	269	22
		291		

- 5 Estas pruebas de resistencia a la tracción demuestran que las fibras de proteínas de interés de colágeno I, laminina V y elastina se conservan después del tratamiento químico, liofilización y esterilización. En efecto, las diferencias en las medidas de resistencia entre las membranas no tratadas en la recogida y las membranas tratadas químicamente y liofilizadas según el procedimiento no son significativas. Se conserva la resistencia mecánica de las membranas. La gran variabilidad de los resultados obtenidos se debe a la naturaleza fisiológica de las muestras que dificulta enormemente
- 10 la reproducibilidad de los ensayos.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento de preparación de un material de aloinjerto que forma una membrana viroinactivada, liofilizada y estéril procedente de placenta de mamífero y constituida por al menos una capa membranosa, comprendiendo dicho procedimiento al menos dos etapas de viroinactivación y al menos una etapa de liofilización y según el cual:
- la primera etapa de viroinactivación se lleva a cabo tratando dicha al menos una capa membranosa con un primer agente de viroinactivación seleccionado entre la familia de los alcoholes;
 - 10 • una segunda etapa de viroinactivación se lleva a cabo después de dicha primera etapa de viroinactivación, tratando dicha al menos una capa membranosa con un segundo agente de viroinactivación seleccionado entre la familia de los peróxidos, **caracterizado por que** la segunda etapa de viroinactivación de dicha al menos una capa membranosa consta de dos subetapas de tratamiento con el segundo agente de viroinactivación seleccionado entre la familia de los peróxidos:
 - 15 • llevándose a cabo una primera subetapa de tratamiento con una solución de peróxido de hidrógeno a una concentración superior a 10 % p/v durante menos de 20 minutos; y
 - llevándose a cabo una segunda subetapa de tratamiento con una solución de peróxido de hidrógeno a una concentración inferior a 5 % p/v durante una duración superior a 50 minutos.
 - 20
2. Procedimiento según la reivindicación 1, según el cual la capa membranosa se selecciona entre el amnios, el corion, y la membrana corioamniótica en donde el amnios y el corion están unidos entre sí por puentes proteicos.
- 25 3. Procedimiento según la reivindicación 1, según el cual la capa membranosa es la capa tisular esponjosa.
4. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, según el cual el primer agente de viroinactivación es el etanol.
- 30
5. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, según el cual el segundo agente de viroinactivación es el peróxido de hidrógeno.
6. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, según el cual el segundo agente de viroinactivación es el peróxido de hidrógeno en forma de solución acuosa en una concentración comprendida entre 3 % y 30 % p/v.
- 35
7. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, según el cual la segunda etapa de viroinactivación de dicha al menos una capa membranosa consta de dos subetapas de tratamiento con peróxido de hidrógeno:
- 40 • llevándose a cabo una primera subetapa de tratamiento con una solución de peróxido de hidrógeno al 30 % p/v durante aproximadamente 15 minutos; y
 - llevándose a cabo una segunda subetapa de tratamiento con una solución de peróxido de hidrógeno al 3 % p/v durante aproximadamente 60 minutos.
 - 45
8. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que consta además de una etapa de liofilización de dicha al menos una capa membranosa viroinactivada.
9. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que consta de una etapa de liofilización de dicho al menos una capa membranosa viroinactivada según la cual dicha al menos una capa membranosa viroinactivada se encuentra intercalada entre dos soportes sustancialmente planos.
- 50
10. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que consta de una etapa de liofilización de dicha al menos una capa membranosa viroinactivada, etapa según la cual dicha al menos una capa membranosa viroinactivada se somete a una liofilización en las siguientes condiciones:
- 55 • una congelación en dos etapas:
 - llevándose a cabo la primera etapa de congelación a una temperatura de aclimatación elegida para no dañar la integridad estructural, funcional y biológica de la capa membranosa;
 - 60

- llevándose a cabo la segunda etapa de congelación a la temperatura final de congelación que es inferior a la temperatura de aclimatación;
 - una liofilización en dos etapas principales, denominadas primaria y secundaria:
 - llevándose a cabo la etapa de liofilización primaria aplicando un vacío a aproximadamente 200 microbars y un perfil de temperatura ascendente;
 - llevándose a cabo la etapa secundaria de liofilización aplicando un vacío a aproximadamente 50 microbars y un perfil de temperatura descendente.
- 5
- 10 11. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que consta además de una etapa de esterilización de la capa membranosa viroinactivada y liofilizada, por exposición de esta última a la radiación gamma a 25-32 kGrays.
- 15 12. Material de aloinjerto viroinactivado y liofilizado, que se puede obtener según una cualquiera de las reivindicaciones de procedimiento 1 a 11 anteriores, **caracterizado por que** procede de la placenta y está constituido por al menos una capa membranosa seleccionada entre el amnios, el corion, y la membrana corioamniótica en donde el amnios y el corion están unidos entre sí por puentes proteicos.
- 20 13. Material de aloinjerto viroinactivado y liofilizado según la reivindicación 12, presentado en una forma utilizable como injerto seleccionado entre el grupo que consiste en el injerto de ligamento, el injerto de fascia lata, el injerto de tendón, el injerto de duramadre, el injerto de membrana submucosa, el injerto de vaina nerviosa, el injerto de manguito rotador, el injerto de tejido conjuntival, los agentes de tratamiento de heridas y/o úlceras, y los agentes de mejora de suturas.
- 25 14. Material inyectable viroinactivado y liofilizado, que se puede obtener según una cualquiera de las reivindicaciones de procedimiento 3 a 11 anteriores, **caracterizado por que** procede de la placenta y está constituido por al menos una capa membranosa que es la membrana tisular esponjosa.
- 30 15. Material inyectable viroinactivado y liofilizado, que se puede obtener según la reivindicación 14 que se presenta en una forma adecuada para el tratamiento por inyección seleccionado entre el grupo que consiste en el tratamiento por inyección intraarticular del estado preartrósico u osteoartrósico y la reparación ligamentosa, meniscal o cartilaginosa.

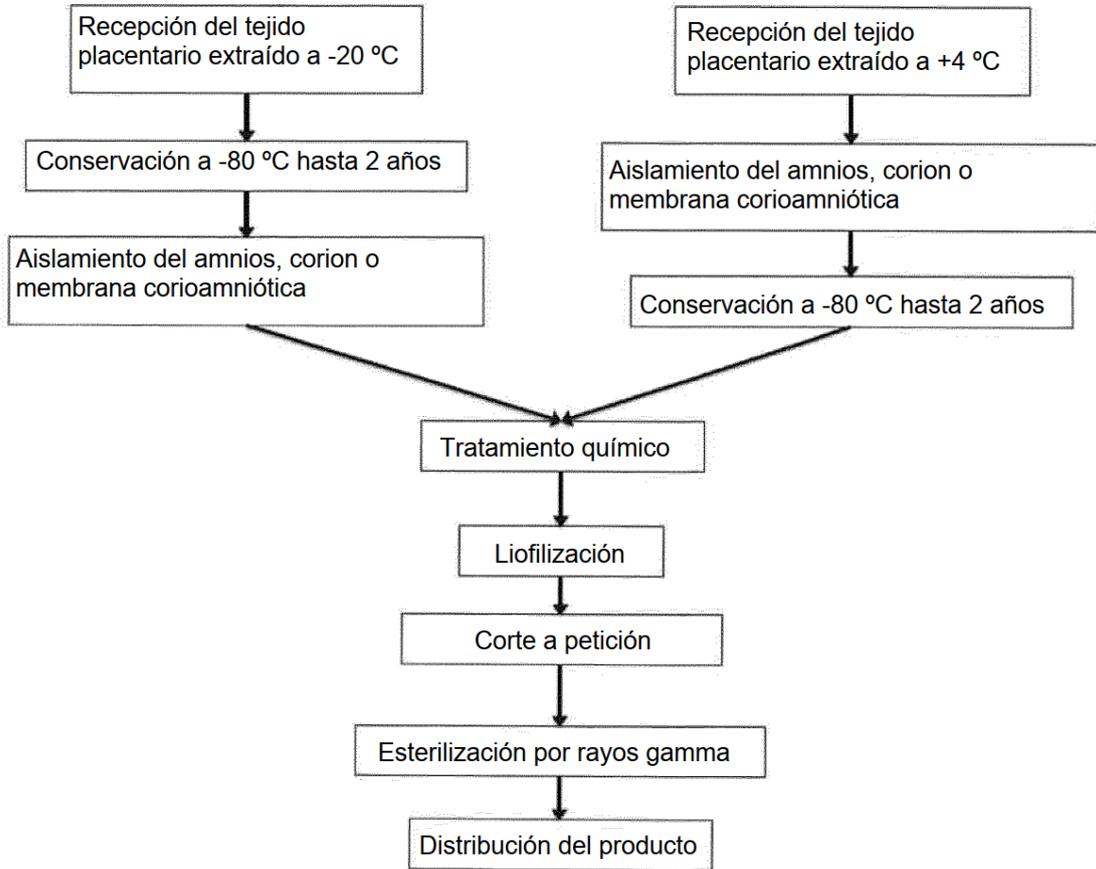


Figura 1

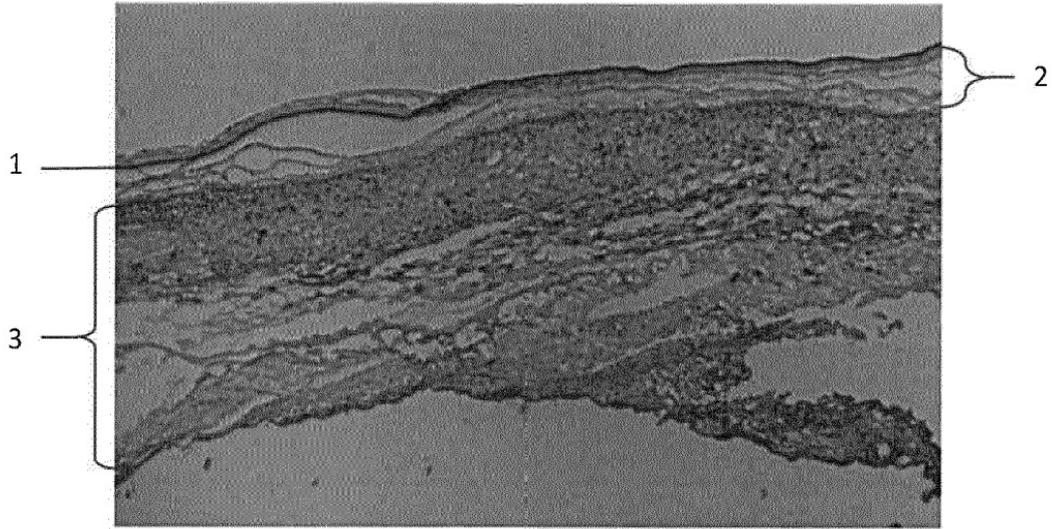


Figura 2a

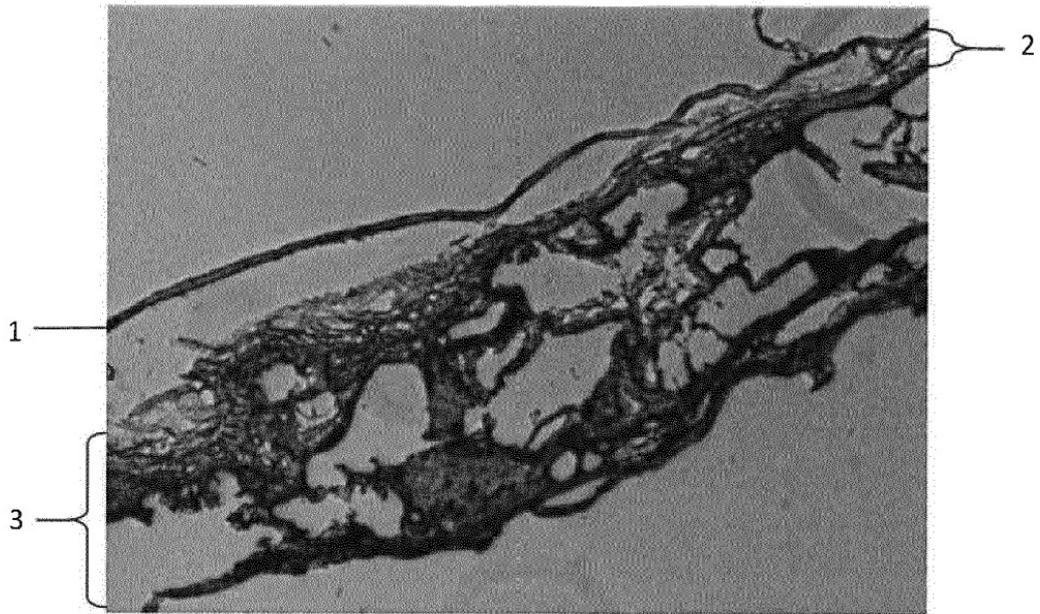


Figura 2b

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Este listado de referencias citadas por el solicitante tiene como único fin la conveniencia del lector. No forma parte del documento de la Patente Europea. Aunque se ha puesto gran cuidado en la compilación de las referencias, no pueden excluirse errores u omisiones y la EPO rechaza cualquier responsabilidad en este sentido.

Documentos de patentes citados en la descripción

- US 6152142 A [0009]
- US 8709494 B [0015]
- CN 104083803 [0020]
- US 20130247517 A [0023]
- US 6024735 A [0024]
- US 6482584 B [0025]
- FR 2949042 [0026]

Bibliografía no especificada en la descripción de la patente

- **NAKAMURA.** *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, Janvier 2004, vol. 45 (1) [0019]
- **T DEPAULA C.A. et al.** Effects of Hydrogen Peroxide Cleaning Procedures on Bone Graft Osteoinductivity and Mechanical Properties. *Cell Tissue Bank*, 2005, vol. 6 (4), 287-98 [0027]
- **MBITHI J. N. et al.** *Appl. Environ. Microbiol.*, 1990, vol. 12 (1), 147-179 [0029]