

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 392 585**

51 Int. Cl.:

**A61L 27/36** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06742358 .2**

96 Fecha de presentación: **17.05.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1881854**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **30.01.2008**

54 Título: **Injerto de tejido cardíaco bioartificial y procedimiento para fabricarlo**

30 Prioridad:

**18.05.2005 DE 102005023599**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:

**12.12.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:

**12.12.2012**

73 Titular/es:

**CORLIFE GBR (100.0%)  
FEODOR-LYNEN-STRASSE 21  
30625 HANNOVER, DE**

72 Inventor/es:

**HAVERICH, AXEL;  
LICHTENBERG, ARTUR;  
CEBOTARI, SERGHEI y  
TUDORACHE, IGOR**

74 Agente/Representante:

**ZUAZO ARALUZE, Alexander**

**ES 2 392 585 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

Injerto de tejido cardíaco bioartificial y procedimiento para fabricarlo.

5 La invención se refiere a un injerto de tejido cardíaco bioartificial y a un procedimiento para fabricarlo.

10 Bajo injerto bioartificial entendemos aquí un tejido corporal de origen alogénico o exogénico previsto para un trasplante en sustitución de un órgano natural, parte de un órgano o tejido en personas, que se ha transformado en adecuado mediante eliminación en particular de las células que se encuentran sobre el mismo, pero también de otros componentes, como proteínas, componentes de la sangre y otros componentes inmunógenos para un implante en otro cuerpo y así es un producto inicialmente biológico, pero manipulado y por ello bioartificial. El producto bioartificial puede estar desposeído exclusivamente de su especificidad individual, es decir, sobre todo estar acelularizado o puede ya estar adaptado individualmente para el receptor previsto, por ejemplo mediante colonización in vitro con células adecuadas para el receptor o propias del receptor, o también mediante aplicación de un recubrimiento o tratamiento especial, destinado a facilitar el alojamiento en el receptor.

15 En el presente caso el producto bioartificial es un injerto de tejido cardíaco bioartificial.

20 Por el estado de la técnica se conocen numerosos procedimientos para la acelularización (también denominada descelularización) de tejidos biológicos. Estos procedimientos sirven en general para la finalidad de hacer más adecuados los injertos biológicos para el receptor. En el trasplante de órganos y tejidos que proceden de donantes de órganos (injertos alogénicos, homoinjertos) o de origen animal (xenoinjertos), se producen reacciones de inmunorrechazo, que en el peor de los casos pueden originar la pérdida del órgano o tejido. Por lo tanto el receptor del trasplante debe ingerir durante toda su vida inmunosupresores, que evitan una tal reacción de rechazo.

25 Para excluir básicamente el rechazo de los injertos, se intenta desde hace mucho tiempo preparar el material alogénico o también xenogénico proporcionado para el receptor, eliminando primeramente todos los componentes inmunógenos, inclusive las células ajenas al receptor existentes en los tejidos. Puesto que ello incluye todas las células vivas, deben poderse evitar a la vez muy eficazmente contaminaciones debidas a bacterias y virus, siendo sólo así posible el empleo de injertos de origen animal. Tras la eliminación de estas células y demás componentes, se conserva por lo general sólo la matriz extracelular del tejido u órgano, compuesta por los componentes principales colágeno, fibrina y/o elastina y que puede contener otras sustancias estructuradoras como hialuronina y proteoglicano. La matriz extracelular se denomina también tejido intersticial o tejido conjuntivo intersticial.

30 En ensayos anteriores se conservaron transitoriamente los tejidos acelularizados antes del trasplante, por ejemplo criconservados o fijados con glutaraldehído. No obstante, esto dio lugar a calcificaciones y otros inconvenientes graves en la incorporación y reconstrucción natural del tejido en el receptor.

35 Por ello se pasó pronto a preparar a continuación las estructuras acelularizadas para el receptor, debiendo sustituirse las células eliminadas por otras, preferiblemente por células propias del receptor multiplicadas in vitro de un tipo adecuado para el correspondiente injerto bioartificial. El problema más grande reside en repoblar el injerto de manera similar a la natural, ya que en la naturaleza pueden participar estructuras locales complejas y múltiples tipos de células. No obstante, se observó que los injertos previamente colonizados se transforman en el cuerpo del receptor del injerto, por lo que puede ser suficiente una colonización inicial mono o multicapa de determinadas células, tal como se describe por ejemplo en los documentos US 6 652 583 (Hopkins), US 5 843 182 (Goldstein) y US 5 899 936 (Goldstein). No obstante, también un injerto repoblado puede dar lugar a problemas cuando se realiza por ejemplo un recubrimiento demasiado fuerte del injerto con células del propio cuerpo, tal que se influye demasiado fuertemente sobre las propiedades geométricas y mecánicas (hiperplasia).

40 La base para la estructuración de injertos de tejido bioartificiales sigue siendo una acelularización muy efectiva de material natural biológico. La acelularización puede prever una eliminación mecánica y/o química de las células. Cuando se trata de un tratamiento mecánico, no puede cuidarse bien en general la matriz extracelular, con lo que las etapas del tratamiento mecánico deben limitarse a la eliminación de células o membranas que se adhieren en el exterior. Los procedimientos químicos de acelularización predominan por lo tanto con diferencia. Como medios químicos para soltar, es decir, digerir o lisar las células se utilizan entre otros soluciones alcalinas, enzimas, glicerina, detergentes no iónicos e iónicos, individualmente y en las combinaciones más diversas.

45 Mediante la utilización de determinados medios en una secuencia determinada, se esperan efectos muy determinados.

50 Así prescribe por ejemplo el documento US 6 448 076 (Dennis y colab.) para la acelularización especialmente de nervios, introducir el preparado de nervios primeramente en glicerina, para abrir las membranas de las células y a continuación desnaturalizar y eliminar proteínas intracelulares mediante introducción en al menos una solución detergente.

Por el documento US 5 215 541 A (Nashef) se conoce un procedimiento para el tratamiento de tejido biológico, en el que el tejido se trata con deoxicolato sódico y a continuación puede implantarse.

5 Por el documento DE 102 58 121 B se conoce un procedimiento para fabricar bioprótesis, en el que se realiza un tratamiento con detergente con ácido desoxicólico y con etapas de lavado que siguen a continuación en una solución fisiológica de sal común.

10 Por la patente US 6 376 244 se conoce la generación de una matriz renal descelularizada introduciendo primeramente el preparado renal en agua destilada, para destruir las membranas celulares y extrayendo a continuación material celular con solución detergente alcalina.

15 Según el documento US 6 734 018, para fabricar un injerto de tejido blando se prevé un tratamiento del tejido con una solución de extracción, una solución de tratamiento y una solución de lavado, siendo la solución de extracción una solución alcalina con un detergente no iónico y al menos una endonucleasa y conteniendo la solución de tratamiento un detergente aniónico. El tratamiento con detergente aniónico no sirve allí para la acelularización, sino a la vez para el tratamiento del tejido, precisamente para influir sobre la repoblación. Allí se expone que un tratamiento con un agente tensoactivo aniónico fuerte puede dar lugar a interacciones con las proteínas de matriz y a la fijación del agente tensoactivo (o detergente) en el tejido acelularizado, con lo que el detergente aniónico puede retenerse en la matriz y puede conservarse hasta después del trasplante en el tejido. Esto por un lado no se desea, debido a los efectos tóxicos que ello implica, pero en determinada medida también se desea, para modular así la velocidad de repoblación, que se ralentiza debido a la presencia del detergente.

20 En el documento US 6 734 018 se profundiza ya también más extensamente en el significado e importancia de la secuencia de etapas. Así se expone que el tratamiento con SDS antes de un tratamiento con solución salina conduce a otros resultados diferentes a los del tratamiento con SDS después de un tratamiento con solución salina.

25 La invención tiene como tarea básica lograr un procedimiento cuidadoso y eficiente para generar una matriz de tejido cardíaco acelularizada estable, funcionalmente intacta y que tras el trasplante se conserva lo mejor posible. Al respecto debe intentarse que sea posible un trasplante con y sin repoblación con células propias del paciente.

30 Para solucionar esta tarea prevé la invención, en un procedimiento para generar un injerto de tejido cardíaco bioartificial, en el que las células biológicas que se adhieren en y/o sobre una matriz extracelular se eliminan in vitro de un preparado de tejido cardíaco, en particular una válvula del corazón o un vaso del corazón, que el procedimiento presente las siguientes etapas en la citada secuencia:

- 35
- a) aportación del preparado de tejido cardíaco de origen natural;
  - b) eliminación de las células que se encuentran en el tejido de la matriz extracelular con ayuda de una solución acelularizadora a partir de una solución acuosa de al menos un detergente aniónico fuerte que contiene al menos deoxicolato sódico;
  - 40 c) tratamiento osmótico del tejido con agua destilada o desionizada;
  - d) tratamiento del tejido con solución salina fisiológica.

45 Se comprobó que mantener precisamente esta secuencia de pasos, cuya importancia se indicará a continuación, aporta resultados especialmente buenos, en particular en la acelularización de tejidos cardíacos. Mediante el procedimiento se obtienen injertos bioartificiales acelularizados, que poseen buenas propiedades mecánicas y fisiológicas. Los tejidos prometen, en base a los ensayos realizados hasta ahora, incluso sin una colonización previa in vitro, una buena aceptación en el cuerpo y permiten esperar, debido a sus propiedades biomecánicas, una buena inalterabilidad. Para la aplicación precisamente en válvulas del corazón es especialmente importante que la membrana basal permanezca intacta durante el procedimiento. En general corresponde la morfología en una elevada medida a la morfología natural del preparado de tejido que sirve de base y puede lograrse una elevada ausencia de células.

50 La primera etapa de un procedimiento de acelularización incluye siempre la aportación de un tejido natural, que puede ser de origen alogénico o xenogénico. Caso necesario se prepara la pieza de tejido natural adecuándola al máximo para el trasplante al receptor potencial. No obstante existen también preparados tales que son siempre adecuados para un grupo de receptores de injertos, por ejemplo válvulas del corazón en una determinada gama de tamaños del anillo. El apéndice vascular alrededor del anillo de la válvula puede estar configurado o cortado a medida con diferente longitud. La etapa a) del procedimiento incluye por lo tanto la elección y corte a medida del preparado natural, dado el caso también tras un almacenamiento intermedio y la introducción en una apartamenta adecuada para el procedimiento o un recipiente adecuado, por ejemplo un cuenco o botella.

55 Preferiblemente el preparado de tejido cardíaco es una válvula pulmonar (valva truncti pulmonalis), una válvula de la aorta (valva aortae), una válvula tricuspidal (valva atrioventricularis dextra), una válvula mitral (valva atrioventricularis sinistra), un tramo de vaso sin válvula con o sin ramificación o una pieza de tejido del pericardio para un parche de tejido cardíaco.

65

La solución de acelularización utilizada en la siguiente etapa del procedimiento (etapa b) contiene en el marco de la invención detergentes aniónicos fuertes y entre ellos en cualquier caso deoxicolato sódico, ya que la utilización de este detergente se ha comprobado que es especialmente efectiva para la acelularización en esta etapa del procedimiento y en relación con las demás etapas.

5

Además de deoxicolato sódico debería incluirse al menos otro detergente aniónico del grupo compuesto por sales de alcoholes alifáticos superiores, preferiblemente sus sulfatos y fosfatos, alcanos sulfonados y alquilarenos, en cada caso con 7 a 22 átomos de carbono en cadena preferiblemente no ramificada, ya que sorprendentemente se descubrió que estas mezclas pueden eliminarse del tejido por lavado más fácilmente que los citados medios individualmente.

10

Actualmente se prefiere especialmente que la solución acelularizadora contenga, además de deoxicolato sódico, dodecilsulfato sódico (SDS), preferiblemente ambos componentes en una concentración de entre 0,05 y 3% en peso, sin alcanzar juntos más del 5% en peso y en una forma de ejecución especialmente preferente en concentraciones entre 0,3 y 1% en peso, de manera especialmente preferente cada uno 0,5% en peso.

15

En una tal solución preferente de por ejemplo 0,5% en peso de SDS y 0,5 % en peso de deoxicolato sódico en agua, se trata el tejido natural tal como se conoce básicamente por otros procedimientos de acelularización. Preferiblemente puede tratarse el tejido natural durante unas 24 horas, pero en función del tejido también más o menos tiempo, a la temperatura ambiente o a la temperatura ambiente ligeramente reducida, aproximadamente a 15 a 30°C, agitando o girando, en un recipiente con o sin dispositivo de sujeción para el tejido. El tejido debe entonces estar cubierto completamente por la solución acelularizadora. El tiempo de acelularización puede adaptarlo el especialista con ayuda de ensayos previos al tejido a tratar en cada caso, pudiendo cambiarse también varias veces la solución acelularizadora, si ello parece ventajoso para la correspondiente tarea de acelularización.

20

25

Para ésta, al igual que para las otras etapas del procedimiento, pueden utilizarse esencialmente todas las formas de proceder usuales según el estado de la técnica, es decir, introducción en las respectivas soluciones en cuencos o recipientes, tratamiento en biorreactores especiales, en parte también bajo presión pulsátil, lavado con una solución conducida en un circuito mientras dura el tratamiento, etc. Las soluciones pueden sustituirse según necesidades una o varias veces. Evidentemente se trabaja bajo condiciones estériles.

30

En la siguiente etapa del procedimiento (etapa c) se realiza un tratamiento osmótico del tejido durante en general menos de 20 horas con agua destilada o desionizada. Esta etapa se ha comprobado sorprendentemente que es ventajosa en el contexto del procedimiento completo, aun cuando por lo demás un hinchamiento de la matriz, tal como el que sucede forzosamente en agua destilada o desionizada, no se considera ventajoso. El tratamiento con agua destilada se conoce básicamente dentro de procedimientos de acelularización, pero además para el lisado de las células, es decir, de las membranas de las células, que aquí ya han sido eliminadas en gran parte en la etapa precedente. En la invención se realiza por lo tanto en esta etapa un tratamiento de la matriz extracelular, que para ello evidentemente, en relación con las demás etapas, se transforma a un estado positivo.

35

40

En la última etapa (etapa d) del procedimiento, se trata el tejido con solución salina fisiológica, preferiblemente circulando continuamente o sustituyendo al menos tres veces la solución de lavado. Bajo solución salina fisiológica se entiende aquí una solución esencialmente isotónica, tratándose en particular de una solución salina tamponada. Preferiblemente se utiliza PBS o solución fisiológica de sal común.

45

El lavado preferiblemente con PBS se realiza en general introduciendo el preparado en esta solución y agitando o girando a 15 hasta 30°C o bien temperatura ambiente a lo largo de preferiblemente 72 a 96 horas. Entonces debería cambiarse la solución al menos 3 veces, pero preferiblemente unas 6 a 8 veces, por ejemplo 7 veces. Puede realizarse también alternativamente un lavado continuo con PBS en circulación.

50

El lavado ha de realizarse hasta que en la solución de lavado no se mida en el detergente concentración residual alguna, o bien ninguna concentración tóxica de células.

A la solución salina de la etapa d) pueden haberse añadido también en tales procedimientos los aditivos usuales, como antibióticos y/o antimicóticos.

55

A continuación del procedimiento puede utilizarse el injerto bioartificial de tejido cardíaco. Hasta su utilización puede almacenarse en frío durante algún tiempo, debiendo encontrarse en solución isotónica. El injerto puede también crioconservarse, cuando no es posible una utilización inmediata.

60

El procedimiento se describirá a continuación en base a ejemplos de ensayos, dándose en la tabla 1 un compendio de las propiedades biomecánicas. Las propiedades biomecánicas se diferencian claramente de aquéllas que pueden lograrse con procedimientos diferentes en la secuencia de etapas o en las composiciones de las soluciones.

65

El injerto bioartificial de tejido cardíaco puede implantarse tal como se obtiene según el procedimiento correspondiente a la invención. Según el estado actual del conocimiento científico se supone que la acelularización, por sí sola o al menos

esencialmente con un detergente aniónico, podría descelularizar cuidadosamente una matriz de tejido cardíaco, encontrándose las proteínas de la matriz en un estado de carga que parece ser óptimo para una repoblación en el cuerpo del receptor o in vitro, sin que existiese aún concentraciones tóxicas de células en medio tensoactivo de acelularización. También son adecuadas las propiedades biomecánicas para posibilitar un implante inmediato del injerto del tejido cardíaco aún no colonizado.

El preparado de tejido cardíaco acelularizado puede no obstante también repoblarse antes del trasplante in vitro con células biológicas que pueden vivir, preferiblemente con células del endotelio. Las células utilizadas para una repoblación in vitro son preferiblemente células autólogas del receptor potencial del injerto, que se le han extraído durante la preparación del trasplante y que se han multiplicado in vitro. Los procedimientos necesarios para ello son conocidos por el estado de la técnica.

Ejemplo:

Una válvula pulmonar (valva trunci pulmonalis) con conducto del vaso sanguíneo se extrajo de un corazón porcino y se lavó para eliminar restos de sangre con solución PBS. Para la acelularización se realizó una incubación de 24 horas en una solución de 0,5% de colato sódico/0,5% de SDS a 20 °C agitando. A continuación se incubó el tejido durante 24 horas con agua destilada a 20 °C agitando. Finalmente se lavó el tejido durante 96 horas a 20 °C agitando en una solución de PBS. En este proceso se cambió la solución de PBS cada 12 horas.

#### Pruebas biomecánicas

Las pruebas de paredes de válvula pulmonar porcina (5 muestras por cada grupo de investigación) se cortaron a medida a una longitud y anchura de 15 mm por 10 mm y se mantuvieron así en pinzas construidas especialmente para ello, tal que la longitud de referencia no cargada de la muestra para ensayos, colgante bajo su propio peso, era de 10 mm. La superficie de la sección a lo largo de la longitud de referencia así definida se determinó con un micrómetro de láser sin contacto (LDM-303H-SP, Takikawa Engineering Co., Tokio, Japón). Las muestras se cortaron a medida para una prueba en las direcciones longitudinal y transversal con respecto a la dirección del vaso (Arteria Pulmonaris) y se mantuvieron húmedas durante la prueba con solución de PBS.

Las muestras para ensayos se sometieron una carga previa de 0,01 newton y se alargaron progresivamente hasta el fallo macroscópico. Esta etapa se realizó en una aparatada de prueba de material (modelo 1445, Zwick GmbH, Ulm, Alemania) a una velocidad de 0,1 mm de alargamiento por segundo. Se tomaron para cada muestra sometida a prueba las curvas fuerza-alargamiento y tensión-alargamiento relativo y se determinaron la tensión límite, la rigidez estructural, el alargamiento relativo límite de la muestra para ensayos (alargamiento relativo de rotura) y el módulo de elasticidad (módulo de Young). La rigidez estructural y el módulo de elasticidad se determinaron en la zona lineal de las curvas fuerza-alargamiento y tensión-alargamiento relativo respectivamente. La tensión límite y la fuerza de rotura se tomaron en el punto en el que pudo observarse una caída significativa de la tensión de tracción o de la fuerza (tabla 1).

Definición de los parámetros de medida indicados en la tabla 1:

#### Fuerza de rotura $F_R$ [N]:

Se denomina fuerza de rotura la fuerza medida en el instante de la rotura. La fuerza de rotura se tomó en el punto en el que pudo observarse una caída significativa de la fuerza.

#### Resistencia a la rotura $\delta_R$ [N/mm<sup>2</sup>]:

La resistencia a la rotura es el cociente entre la fuerza  $F_R$  medida en el instante de la rotura y la sección inicial  $A_0$  [N/mm<sup>2</sup>] [corresponde a MPa]

$$\delta_R = F_R/A_0 \text{ [N/mm}^2\text{] [corresponde a MPa]}$$

#### Módulo de elasticidad E [N/mm<sup>2</sup>]:

El módulo de elasticidad (módulo E) es una medida de la resistencia de un material. El mismo indica en qué medida se alarga un material bajo una determinada carga.

El módulo E se define como la pendiente en el gráfico de la curva tensión-alargamiento relativo dentro de la zona de elasticidad. Cuando la evolución de la curva tensión-alargamiento relativo es lineal (zona de proporcionalidad) rige:

$$E = \delta/\varepsilon \text{ [N/mm}^2\text{] [corresponde a MPa]}$$

Significando  $\delta$  la tensión (de tracción) y  $\varepsilon$  el alargamiento.

Tabla 1

Resultados de la prueba biomecánica											
	Grupo comparativo, n=5		Grupo tripsion n=5		Grupo NaD, n=5		Grupo NaD+SDS, n=5		Grupo SDS, n=5		
	long	trans	long	trans	long	trans	long	trans	long	trans	
Superficie (mm <sup>2</sup> )	29,2±5,7	29,6±6,3	27,6±5,4	28,1±5,9	31,4±5,4	26,6±5,8	31,8±6,6	29,9±1,6	26,3±4,0	26,8±4,88	
fuerza límite (N)	9,5±4,3	13,9±1,5	5,0±2,37*	11,8±3,2	9,8±1,3	16,2±5,6	6,6±2,1	11,4±3,9	7,9±5,6	15,5±5,8	
rigidez (N/mm)	3,0±2,6	4,3±1,6	2,3±1,5	4,2±1,5	3,0±0,79	7,0±3,0	2,7±0,7	3,9±1,25	2,6±1,4	5,3±1,5	
alargamiento de rotura (mm/mm)	0,8±0,48	1,6±0,63	0,4±0,2*	0,5±0,2T	0,5±0,1	1,0±0,3	0,6±0,2	1,2±0,08	0,7±0,5	0,7±0,4*	
carga límite (MPa)	0,32±0,15	0,50±0,18	0,18±0,06*	0,43±0,16	0,32±0,05	0,61±0,2	0,22±0,11	0,39±0,14	0,29±0,11	0,57±0,13	
módulo de Young (MPa)	1,04±0,94	0,86±0,57	0,69±0,5	1,69±1,04	0,99±0,25	1,75±1,35	0,90±0,38	1,18±0,55	0,97±0,52	2,06±0,84*	

datos indicados como valor medio ± lavado estándar

\*p < 0,05, Tp < 0,01, \$p < 0,001 frente a grupo comparativo

Los resultados de la prueba se muestran en base a las figuras. Se muestra en:

- 5 figura 1a) válvula tratada con solución de tripsina respecto (0,05% tripsina/0,02% EDTA);
- figura 1b) válvula tratada con solución de deoxicolato sódico/(al 1%)
- figura 1c) válvula tratada con deoxicolato sódico y SDS (respectivas soluciones al 0,5%);
- figura 1d) válvula tratada con solución de SDS (al 1%);
- figura 2) curvas tensión-alargamiento relativo (arriba) y fuerza-alargamiento (abajo).

10 Las figuras 1a) a 1d) muestran tomas del microscopio electrónico de barrido de diversas zonas de válvula pulmonar porcina tratadas con diversas soluciones de acelularización (siendo por lo demás igual el procedimiento). Se muestra en cada caso una superficie intraluminal con sección transversal de pared (en cada dibujo arriba) y cúspide (en cada dibujo abajo).

15 Tal como puede observarse, el tratamiento con tripsina daña fuertemente la membrana basal. Con el procedimiento correspondiente a la invención y deoxicolato sódico en la solución acelularizadora se dan resultados visiblemente buenos.

20 Las propiedades biomecánicas correspondientes a estos ensayos se cuantifican en la tabla 1. En la fig. 2 se muestran curvas típicas tensión-alargamiento y curvas fuerza-alargamiento relativo. Los triángulos de pendiente rayados caracterizan las zonas en las que se calculan el módulo de elasticidad y la rigidez estructural. El punto de la curva señalado con líneas discontinuas caracteriza la tensión límite, el alargamiento relativo límite y la fuerza de rotura.

25 Se comprueba que la rigidez en las direcciones longitudinal y transversal no ha cambiado respecto a tejidos comparativos nativos en más de aproximadamente  $\pm 15\%$ . También el módulo de Young ha aumentado respecto a tejidos comparativos nativos sólo moderadamente. Por lo tanto las propiedades biomecánicas del producto del procedimiento pueden en conjunto considerarse como buenas.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Procedimiento para generar un injerto de tejido cardíaco bioartificial, en el que las células biológicas que se adhieren en y/o sobre una matriz extracelular se eliminan in vitro mediante un preparado de tejido cardíaco, en particular una válvula del corazón o un vaso del corazón, presentando el procedimiento las siguientes etapas en la citada secuencia:
- 10 a) aportación del preparado de tejido cardíaco de origen natural;  
 b) eliminación de las células que se encuentran en el tejido de la matriz extracelular con ayuda de una solución acelularizadora a partir de una solución acuosa de al menos un detergente aniónico fuerte que contiene al menos deoxicolato sódico;  
 c) tratamiento osmótico del tejido con agua destilada o desionizada;  
 d) tratamiento del tejido con solución salina fisiológica.
- 15 2. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado porque** el preparado de tejido cardíaco aportado es una válvula pulmonar (valva trunci pulmonalis), una válvula de la aorta (valva aortae), una válvula tricúspida (valva atrioventricularis dextra), una válvula mitral (valva atrioventricularis sinistra), un tramo de vaso sin válvula con o sin ramificación o una pieza de tejido del pericardio para un parche de tejido cardíaco de origen en cada caso alógeno o xenogénico.
- 20 3. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, **caracterizado porque** la solución acelularizadora contiene, además de deoxicolato sódico, al menos otro detergente aniónico del grupo compuesto por sales de alcoholes alifáticos superiores, preferiblemente sus sulfatos y fosfatos, alcanos sulfonados y alquilarenos **sulfonados**, en cada caso con 7 a 22 átomos de carbono en cadena preferiblemente no ramificada.
- 25 4. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado porque** la solución acelularizadora contiene, además de deoxicolato sódico, dodecilsulfato sódico (SDS), preferiblemente ambos componentes en una concentración de entre 0,05 y 3% en peso, sin alcanzar juntos más del 5% en peso y más preferiblemente entre 0,3 y 1% en peso, de manera especialmente preferente cada uno 0,5% en peso.
- 30 5. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado porque** el procedimiento se realiza a temperaturas de entre 15 y 30 °C.
- 35 6. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado porque** para las etapas del tratamiento a) a d) el tejido se coloca en un recipiente con o sin dispositivo de sujeción para el preparado de tejido en la correspondiente solución de tratamiento y se cubre por completo con la misma, agitándose o girándose el recipiente preferiblemente mientras dura el tratamiento o partes de la duración del tratamiento.
- 40 7. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado porque** la solución salina de la etapa d) es una función salina tamponada, preferiblemente PBS o solución fisiológica de sal común.
- 45 8. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizado porque** la solución salina se renueva en la etapa d) al menos 3 veces, preferiblemente al menos 6 veces o porque se trabaja bajo una circulación continua de la solución de PBS.
- 50 9. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 8, **caracterizado porque** a la solución salina de la etapa d) se le añaden antibióticos y/o antimicóticos.



Fig. 1

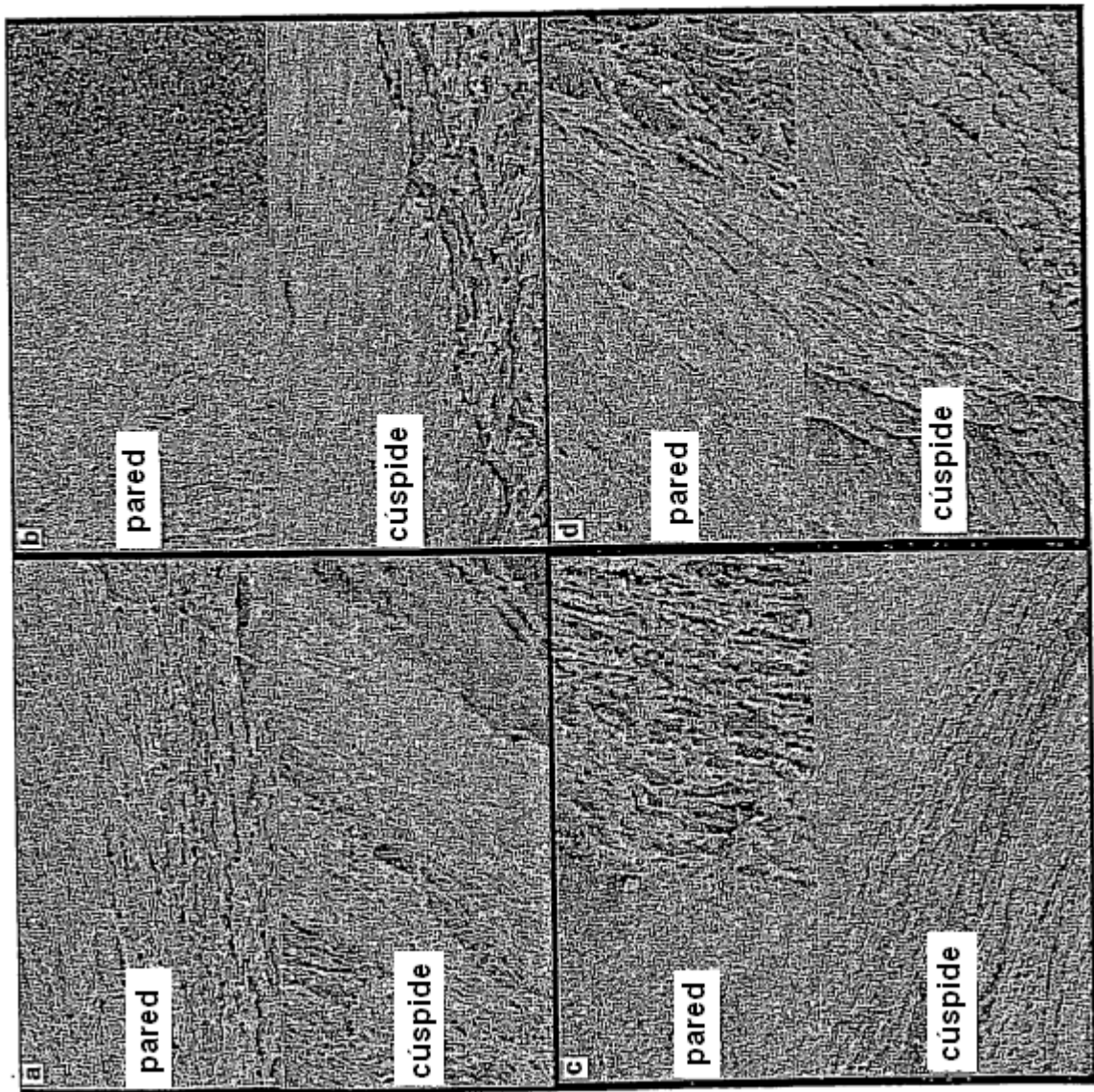


Fig. 2

