

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 404 033**

51 Int. Cl.:

A61F 2/00 (2006.01)
A61F 2/02 (2006.01)
A61F 2/24 (2006.01)
A61F 13/00 (2006.01)
A01N 1/02 (2006.01)
A61L 27/24 (2006.01)
A61L 27/36 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.05.1998 E 04076470 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.01.2013 EP 1452150**

54 Título: **Limpieza química de material biológico**

30 Prioridad:

08.05.1997 US 853372

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

23.05.2013

73 Titular/es:

**ORGANOGENESIS INC. (100.0%)
150 DAN ROAD
CANTON, MA 02021, US**

72 Inventor/es:

**ABRAHAM, GINGER A;
CARR, ROBERT M. JR.;
KEMP, PAUL D.;
MERCER, RYAN y
BAKER, LINDA**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 404 033 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

Limpieza química de material biológico

5 Antecedentes de la invención

1. Campo de la invención:

10 Esta invención pertenece al campo de la ingeniería de tejidos. La invención apunta a tejidos colagenosos que fueron tratados para eliminar los componentes no colagenosos como células, residuos celulares y otros componentes de la matriz extracelular, como proteoglicanos y glucosaminoglicanos, que normalmente se encuentran en los tejidos nativos. El tratamiento del tejido con álcali, quelantes, ácidos y sales elimina los componentes que no son colagenosos de la matriz de tejido colagenoso mientras controla la cantidad de distensión y disolución para que la matriz de colágeno resultante conserve su organización estructural, integridad y propiedades de biorremodelación. 15 El proceso evita la necesidad de utilizar detergentes y enzimas que afectan negativamente la compatibilidad de la célula, la fuerza y la capacidad de biorremodelación de la matriz de colágeno. La matriz de tejido colagenoso se utiliza para implantación, reparación o uso en un huésped mamífero.

20 2. Breve descripción de los antecedentes de la invención:

El campo de la ingeniería de tejidos combina los métodos de la ingeniería con los principios de las ciencias de la vida para entender las relaciones estructurales y funcionales en los tejidos de mamíferos normales y patológicos. El objetivo de la ingeniería de tejidos es el desarrollo y la aplicación final de sustitutos biológicos para restaurar, mantener o mejorar las funciones del tejido. (Skalak, R. y Fox, C.F., "Tissue Engineering", Alan R. Liss Inc. N.Y. (1988)). 25

El colágeno es la principal proteína estructural del cuerpo y constituye aproximadamente un tercio de la proteína corporal total. Constituye la mayor parte de la materia orgánica de la piel, los tendones, los huesos y los dientes y se encuentra como inclusiones fibrosas en la mayoría de las otras estructuras del cuerpo. Algunas de las propiedades del colágeno son su alta resistencia a la tracción; su capacidad de intercambio iónico, debida en parte a la unión de electrolitos, metabolitos y fármacos; su baja antigenicidad, debida al enmascaramiento de posibles determinantes antigénicos por la estructura helicoidal y su baja extensibilidad, semipermeabilidad y solubilidad. Además, el colágeno es una sustancia natural para la adhesión celular. Estas propiedades y otras hacen del colágeno un material adecuado para la ingeniería de tejidos y la fabricación de sustitutos biológicos implantables y prótesis biorremodelables. 30 35

Como el colágeno es un componente importante de esos sustitutos biológicos, es necesario un método para obtener cantidades suficientes de colágeno que sea de calidad uniforme. En la actualidad existe la necesidad de un mejor método para la eliminación de componentes no colagenosos como células, residuos celulares y otros componentes de la matriz extracelular, como proteoglicanos y glucosaminoglicanos, que normalmente se encuentran en tejidos nativos, para obtener una matriz de colágeno nativo sustancialmente puro. Se cree que algunas de estas estructuras no colagenosas que están presentes en los tejidos nativos son antigénicas y provocarán una respuesta inflamatoria crónica cuando se las implante en un huésped. Sin embargo, se dispone en el área de diversos métodos para la limpieza de dicho tejido colagenoso que han dado lugar a composiciones colagenosas con diferentes características. 40 45 El método utilizado debe ser uno que mantenga las propiedades biológicas y físicas del colágeno y los tejidos colagenosos, adecuadas para usar en la ingeniería de tejidos.

En el área de tratamiento de un tejido colagenoso para producir esencialmente una matriz de colágeno, se han utilizado habitualmente detergentes y tensioactivos en la extracción de las células y los lípidos del tejido. Los detergentes como dodecil sulfato de sodio (SDS) son moléculas anfipáticas en las cuales la región hidrófoba se une a la proteína y se cree que aumenta la carga negativa de ésta. Cuando se implanta, el incremento de la carga produce distensión del tejido debida a una mayor unión de agua por la región hidrófila de la molécula y disminución de la estabilidad térmica del colágeno por interrupción de la unión del hidrógeno. La distensión abre la estructura de la molécula de colágeno haciéndola susceptible a enzimas celulares como la colagenasa y desestabiliza la matriz de colágeno para dar lugar a un constructo debilitado. (Courtman, et al., Journal of Biomedical Materials Research, 28:655-666, 1994). Se cree además que los residuos de SDS permanecen unidos al colágeno y evitan que las células migren al implante. (Wilson, GJ et al., Ann Thorac Surg, 60:S353-8., 1995; Bodnar E, et al. "Damage of aortic valve tissue caused by the surfactant sodium dodecyl sulfate," Thorac Cardiovasc Surg, 34:82-85, 1986.) Debido a que los detergentes utilizados en un método de limpieza química se pueden unir indeseablemente al colágeno y alterar sus capacidades de biorremodelación en el tejido tratado, los inventores desarrollaron un método que elimina la necesidad de detergentes. 50 55 60

La limpieza química del tejido con enzimas como tripsina, pepsina y colagenasa es conocida en el área, pero su uso causará la modificación química de las moléculas de colágeno nativo y afectará negativamente la integridad

estructural del constructo. Se conoce en el área el tratamiento enzimático de tejido colagenoso para la eliminación o modificación de proteínas asociadas a la matriz extracelular. Las proteasas como pepsina, tripsina, dispasa o termolisina se utilizan en la eliminación de telopéptidos de colágeno para producir colágeno ateloapéptido. Los telopéptidos de colágeno son la porción no-triple helicoidal de la molécula de colágeno y algunos investigadores han pensado que es débilmente antigénica mientras otros piensan que es responsable de las propiedades mecánicas fuertes del colágeno. La digestión limitada del tejido colagenoso eliminará los telopéptidos sin disociación de la matriz de colágeno del tejido, mientras que la digestión prolongada disociará las fibrillas de colágeno en monómeros de colágeno ateloapéptido. También se lo conoce en el área para modificar y eliminar los ácidos nucleicos de la matriz mediante enzimas que digieren el ARN y ADN endógenos a través del uso de ARNasa y ADNasa, respectivamente. Como el tratamiento con enzimas puede afectar la integridad estructural del colágeno, el presente método de la invención evita su uso.

Los métodos para obtener tejido colagenoso y estructuras tisulares de tejidos de mamíferos explantados, y los procesos para construir prótesis a partir de tejido, han sido investigados ampliamente para la reparación quirúrgica o para el reemplazo de órganos y tejidos. El tejido se trata por lo general para eliminar los componentes celulares y no colagenosos potencialmente citotóxicos, para dejar una matriz de tejido natural. También se ha investigado el procesamiento posterior, como la reticulación, la desinfección o el moldeado. Los métodos anteriores para el tratamiento de tejido colagenoso para eliminar los componentes del tejido de la matriz de tejido organizada empleaban detergentes, enzimas o promovían la distensión descontrolada de la matriz. WO 95/28183 para Jaffe, et al. da a conocer métodos para disminuir o evitar la mineralización postimplantación de válvula cardíaca bioprotésica. Los métodos dados a conocer proporcionan material biológico tornado acelular por autólisis controlada. La autólisis se realiza de manera controlada utilizando al menos una solución amortiguadora a un pH preseleccionado para permitir que las enzimas autolíticas presentes en el tejido degraden los componentes estructurales celulares. La patente de los Estados Unidos N° 5,007,934 para Stone y, similarmente, la patente de los Estados Unidos N° 5,263,984 para Li, et al. ambas dan a conocer un método de múltiples pasos para la limpieza química de tejido ligamentoso. El método utiliza un detergente para eliminar los lípidos asociados a membranas celulares o tejido colagenoso. La patente de los Estados Unidos N° 5,523,291 para Janzen, et al. da a conocer una composición conminuta inyectable para implante, para aumentar el tejido blando derivado del *ligamentum nuchae*. El ligamento se trata con una serie de inmersiones en una solución fuertemente alcalina de hidróxido de sodio seguida de solución de ácido clorhídrico y después bicarbonato de sodio. La patente de los Estados Unidos N° 5,028,695 para Eckmayer, et al. da a conocer un proceso para la fabricación de membranas de colágeno en las cuales el tejido colagenoso se trata repetidamente con un álcali fuerte y posteriormente con un ácido fuerte varias veces, después se trata además con tratamiento salino inorgánico para contraer las membranas y luego con solvente para secarlas.

EP0564786 se refiere a un método para procesar y conservar tejido a base de colágeno para trasplante y el correspondiente material de colágeno.

US5523291 da a conocer una matriz colagenosa para el aumento de tejido blando compuesta por elastina y colágeno donde la cantidad de elastina es entre 10 y 90% en peso.

US3329572 da a conocer un proceso para tratar tejidos de animales y el producto correspondiente, para obtener colágeno que carezca de toda proteína y sales minerales que puedan estar presentes.

US5028695 da a conocer un proceso para la fabricación de membranas de colágeno para hemostasia, vendaje de las heridas y para implantes. La matriz de colágeno obtenida por dicho proceso tiene un peso seco de 25% en peso.

US5460962 da a conocer la preparación y esterilización de colágeno o tejido colagenoso que se va a utilizar para reparación mediante implantación.

US3551560 da a conocer un proceso de reconstrucción de tendones, cartílagos, vainas nerviosas y los productos correspondientes.

Resumen de la invención

La presente invención supera las dificultades en la obtención de matrices de tejido biorremodelables que son fundamentalmente colágeno. La invención proporciona matrices de tejido que se pueden utilizar como un dispositivo protésico o material para usar en la reparación, el aumento o la sustitución de órganos y tejidos, dañados y enfermos, según se da a conocer en las reivindicaciones.

El método de limpieza química de esta invención torna el material biológico, como tejidos nativos y estructuras tisulares, sustancialmente acelular y sustancialmente exento de componentes no colagenosos manteniendo la integridad estructural de la matriz de tejido colagenoso. Como no se utilizan detergentes en el proceso de limpieza química, los residuos de detergentes que normalmente permanecen unidos a la matriz de tejido no están presentes. Como no se utilizan enzimas, los telopéptidos de colágeno permanecen en las moléculas de colágeno. El método

comprende poner en contacto un tejido nativo normalmente celular con un quelante a un pH básico, poner en contacto el tejido con una solución de sal a un pH ácido, poner en contacto el tejido con una solución de sal a pH fisiológico, y, finalmente enjuagar la matriz del tejido limpiada químicamente resultante.

5 Esta invención apunta a una matriz de tejido limpiada químicamente derivada de tejidos nativos, normalmente celulares. La matriz de tejido limpia es esencialmente colágeno que se tornó sustancialmente exento de glucoproteínas, glucosaminoglucanos, proteoglucanos, lípidos, proteínas no colagenosas y ácidos nucleicos como ADN y ARN. Es importante que la capacidad de biorremodelación de la matriz de tejido se conserve, puesto que carece de residuos de detergentes unidos que afectarían negativamente la capacidad de biorremodelación del colágeno. Además el colágeno es colágeno telopeptídico puesto que las regiones telopéptidicas de las moléculas de colágeno permanecen intactas, porque no ha sufrido tratamiento ni modificación con enzimas durante el proceso de limpieza.

15 El material colagenoso habitualmente mantiene la forma general del tejido del que deriva, pero se puede extender en capas y unir las entre sí para formar láminas multicapa, tubos o prótesis de forma compleja. Las capas de colágeno unidas de la invención son estructuralmente estables, plegables, semipermeables y suturables. Cuando el material de la matriz se implanta en un huésped mamífero, sufre biodegradación acompañada del adecuado reemplazo de células vivas o la formación de tejido nuevo, de modo que el material original implantado sea remodelado en última instancia y reemplazado por el tejido y las células derivados del huésped.

20 Por lo tanto, es un objetivo de esta invención proporcionar un material de matriz de tejido biorremodelable que permitirá y facilitará el crecimiento hacia adentro del tejido y/o la regeneración del órgano en el sitio de implantación. Las prótesis fabricadas con este material, cuando se injertan en un huésped o paciente receptor, sufren biorremodelación concomitante controlada y el reemplazo adecuado de células vivas para que la prótesis original implantada sea remodelada por las células vivas del paciente para formar un órgano o tejido regenerado.

25 Aún otro objetivo es proporcionar un material de matriz de tejido nuevo que se pueda implantar utilizando técnicas quirúrgicas convencionales.

30 Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona un método para el procesamiento de tejidos colagenosos nativos para trasplante. El método de procesamiento está diseñado para generar un material de tejido biológico colagenoso injertable implantable, una matriz extracelular compuesta por colágeno, que sirve como un andamio que puede ser bioremodelado por un huésped in vivo o por células vivas en cultivo in vitro.

35 Esta invención apunta además a una prótesis de ingeniería de tejidos, formada por tejido colagenoso nativo procesado, que, cuando se implanta en un huésped mamífero, puede servir para reparar el funcionamiento, aumentar el volumen o reemplazar una parte del cuerpo o una estructura tisular, y que sufrirá biodegradación controlada que se produce concomitante con la remodelación por las células del huésped. La matriz de tejido se puede utilizar como un material protésico para indicaciones de autoinjerto, aloinjerto y heteroinjerto. La prótesis de esta invención, en sus diversas realizaciones, tiene por lo tanto dos propiedades: en primer lugar, funciona como sustituto de una parte del cuerpo, y en segundo lugar, aún funcionando como sustituto de una parte del cuerpo, funciona como una plantilla de remodelación para el crecimiento hacia adentro de las células del huésped. Aunque las prótesis se ilustrarán mediante la construcción de varios dispositivos y constructos, la invención no es limitada por ellos. Se apreciará que el diseño del dispositivo en su material, forma y espesor se debe elegir según la indicación final para el constructo.

40 El método de limpieza química de esta invención torna el material biológico, como tejidos nativos y estructuras tisulares, sustancialmente acelulares y sustancialmente exentos de componentes no colagenosos, manteniendo la integridad estructural de la matriz de tejido colagenoso. La elastina a veces está presente en el tejido nativo en pequeñas cantidades y no es eliminada por el método de limpieza química. La presencia de elastina puede ser deseable para ciertas aplicaciones. Según se usa en este documento, la expresión "sustancialmente acelular" significa que tiene al menos 95% menos de células nativas y estructuras celulares que el estado natural del material biológico. "Células y estructuras celulares" se refiere a células, vivas o no, restos de células, membranas celulares y estructuras de membrana. El uso de la expresión "sustancialmente exento/as de componentes no colagenosos" significa que las glucoproteínas, los glucosaminoglucanos, los proteoglucanos, los lípidos, las proteínas no colagenosas y los ácidos nucleicos como ADN y ARN constituyen menos del 5% en peso seco de la matriz de tejido resultante. Como no se utilizan detergentes en el proceso de limpieza química, los residuos de detergentes que normalmente permanecen unidos a la matriz de tejido no están presentes. Como no se utilizan enzimas, los telopeptidos de colágeno permanecen en las moléculas de colágeno. Además, el método de limpieza química torna el material biológico estéril y exento de endotoxinas cuando se lo procesa utilizando un equipo y soluciones estériles, y una técnica aséptica.

La expresión "integridad estructural" se refiere a la capacidad de la matriz de tejido colagenoso limpiada químicamente para resistir fuerzas como tensión, compresión y soporte. La integridad estructural del material biológico se conserva porque la distensión se minimiza en los pasos de tratamiento químico aunque ocurre algo de distensión durante el tratamiento. La distensión descontrolada o excesiva abre la estructura de la molécula de colágeno tornándola sensible a las enzimas celulares como la colagenasa y desestabiliza el colágeno para dar lugar a un constructo debilitado. Como la distensión afecta la estructura intramolecular de la molécula de colágeno, afecta la estructura general del material a nivel intermolecular al desorganizar los entrecruzamientos nativos entre las moléculas de colágeno. Juntos, la estructura de la molécula de colágeno y los entrecruzamientos entre las moléculas de colágeno imparten integridad estructural al material.

El material de la matriz de tejido que mantiene mucha de su integridad estructural nativa es útil, por ejemplo, cuando se usa como un dispositivo protésico o como un material para construir dispositivos multicapa o complejos. La integridad del material es importante si va a realizar una función de soporte de carga como el soporte de una pared corporal, un dispositivo vascular o un dispositivo ortopédico. El término "suturable" está relacionado a la integridad estructural lo que significa que las propiedades mecánicas del material incluyen la retención de la sutura que permite que las agujas y los materiales de sutura pasen a través del material de la prótesis, en el momento de suturar la prótesis a secciones del tejido nativo, un proceso conocido como anastomosis. Durante la sutura, estas prótesis no se deben rasgar como resultado de las fuerzas de tracción aplicadas a ellas por la sutura, ni se deben rasgar cuando la sutura se anuda. La suturabilidad del material protésico, es decir, la capacidad de la prótesis para resistir el rasgado mientras es suturada, se relaciona con la resistencia mecánica intrínseca del material de la prótesis, el espesor del injerto, la tensión aplicada a la sutura, y la velocidad a la que se tira del nudo para cerrarlo.

El material biológico según se define en la invención incluye, pero no exclusivamente, tejidos extraídos de mamíferos y sus estructuras, derivados de organismos humanos, bovinos, porcinos, caninos, ovinos, caprinos y equinos. Las estructuras tisulares como dermis, arteria, vena, pericardio, válvula cardíaca, duramadre, ligamento, intestino y fascia son todas estructuras tisulares preferidas que son capaces de ser limpiadas por los métodos de esta invención para obtener una matriz de tejido que sea sustancialmente acelular y esté sustancialmente exenta de componentes no colagenosos.

Una fuente preferida de tejido de mamífero es la túnica submucosa del intestino delgado, muy preferentemente del intestino delgado porcino. En el intestino delgado nativo, la túnica submucosa es la capa de tejido conectivo del órgano e incluye tanto células linfáticas como de vasos sanguíneos. Métodos para la obtención de túnica submucosa se dan a conocer en WO 96/31157. Para obtener túnica submucosa porcina, también denominada "submucosa", se extrae el intestino delgado de un cerdo y se vacía mecánicamente, preferentemente por medio de una máquina de limpieza de tripas (Bitterling, Nottingham, Reino Unido). La máquina de limpieza de tripas elimina por la fuerza la grasa y las capas de músculo, y las mucosas de la túnica submucosa usando una combinación de acción mecánica y lavado con agua. La acción mecánica se puede describir como una serie de rodillos que comprimen y quitan las sucesivas capas de la túnica submucosa cuando se pasa el intestino intacto entre ellas. Como la túnica submucosa del intestino delgado es comparativamente más dura y más rígida que el tejido circundante, se eliminan los componentes más blandos de la submucosa de la túnica submucosa. El resultado de la limpieza con la máquina es tal que los tejidos mesentéricos, la túnica serosa y la túnica muscularis del abumen de la túnica submucosa así como las capas de la túnica mucosa del lumen de la túnica submucosa son eliminados de la túnica submucosa para que se mantenga únicamente la capa de túnica submucosa del intestino. La matriz de tejido limpiada químicamente de la túnica submucosa también se denomina "capa de colágeno intestinal" o "ICL". Cabe destacar que en algunas fuentes animales, como carnívoros y omnívoros, el intestino delgado incluye un estrato compacto que es eliminado en gran medida mediante este paso de limpieza mecánica.

En el área se conocen otros métodos para vaciar mecánicamente el intestino delgado como se describe en la patente de los Estados Unidos N° 4,902,508 para Badylak. El método dado a conocer por esta patente incluye una abrasión suave del tejido intestinal para eliminar las capas abuminales, incluidas la túnica serosa y la túnica muscularis, y las capas internas que consisten en al menos una porción luminal de la túnica mucosa.

Las capas que permanecen son la túnica submucosa con la capa basilar unida que consta de lámina muscularis mucosa y, si estaba inicialmente presente en el tejido de mamífero extraído, estrato compacto. El material intestinal obtenido por cualquiera de los métodos se puede implantar o transformar primero en pared corporal o dispositivo vascular por una serie de métodos que incluyen sutura, unión con grapas, composiciones adhesivas, unión química y unión térmica. Para toda la especificación y los ejemplos se definen términos que atañen a ciertos parámetros operativos, para cantidades, tiempos y temperaturas que se pueden variar sin apartarse del espíritu y el alcance de la invención. Según se usa en este documento, una "cantidad eficaz" se refiere al volumen y la concentración de composición necesarios para obtener el efecto deseado. Una cantidad eficaz preferida para la limpieza química de tejido es una relación de 100:1 v/v entre solución y tejido, pero mal los volúmenes pueden ser determinados, más o menos, por los técnicos con experiencia al considerar la forma, la masa, el espesor, la densidad, y la celularidad del tejido que se va a limpiar. Los técnicos con experiencia pueden estimar el tiempo necesario para que los pasos químicos sean eficaces al considerar la celularidad, la densidad de la matriz y el espesor del material que se va a limpiar. A las soluciones les llevará más tiempo penetrar materiales más grandes, de mayor espesor o más densos,

y equilibrarse en el tejido La temperatura para el entorno y las soluciones utilizadas en la presente invención es preferentemente la temperatura ambiente, aproximadamente 25 °C, pero puede ser cualquiera comprendida en el rango por encima de las temperaturas de congelación de las soluciones utilizadas y por debajo de la temperatura de desnaturalización del material de tejido que se está tratando. Las temperaturas entre aproximadamente 4 °C y aproximadamente 45 °C son suficientes para que el tratamiento de limpieza sea eficaz. Por agitación, se entiende agitación o mezcla mecánica y se usa para mejorar la penetración de las composiciones químicas en el tejido y para reducir el tiempo necesario para que el tratamiento químico sea eficaz. La expresión "solución amortiguada" se refiere a una solución acuosa que contiene al menos un agente que conserva la concentración de ión hidrógeno o el pH de la solución.

En el método preferido, puede ser necesario limpiar manualmente el tejido extraído, por ejemplo mediante disección macroscópica, y/o limpiar mecánicamente del exceso de tejidos como grasa y vasculatura. La limpieza manual puede ser necesaria para algunos tejidos para facilitar la manipulación durante el procesamiento o para un tratamiento químico más eficaz.

En primer lugar el tejido se trata poniéndolo en contacto con una cantidad eficaz de un quelante, preferentemente alcalino para limitar de manera controlable la distensión de la matriz del tejido. Los quelantes aumentan la eliminación de células, residuos de células y estructuras de la membrana basal de la matriz, al reducir la concentración de catión divalente. El tratamiento alcalino disocia las glucoproteínas y los glucosaminoglucanos del tejido colagenoso y saponifica los lípidos. Los quelantes conocidos en el área que pueden ser utilizados incluyen, pero no exclusivamente, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y ácido etilendis(oxietileno)nitrito)tetraacético (EGTA). El EDTA es un quelante preferido y se puede tornar más alcalino mediante adición de hidróxido de sodio (NaOH), hidróxido de calcio $\text{Ca}(\text{OH})_2$, carbonato de sodio o peróxido de sodio. La concentración de EDTA o EGTA está comprendida preferentemente entre aproximadamente 1 y aproximadamente 200 mM; más preferentemente entre aproximadamente 50 y aproximadamente 150 mM; muy preferentemente es de alrededor de aproximadamente 100 mM. La concentración de NaOH está comprendida preferentemente entre 0.001 y aproximadamente 1 M; más preferentemente entre aproximadamente 0.001 y aproximadamente 0.10 M; muy preferentemente es de aproximadamente 0.01 M. Un técnico con experiencia puede determinar otros agentes alcalinos o básicos para llevar el pH de la solución quelante al rango de pH básico eficaz. El pH final de la solución quelante básica debería estar comprendido preferentemente entre aproximadamente 8 y aproximadamente 12, pero más preferentemente entre aproximadamente 11.1 y aproximadamente 11.8. En la realización más preferida el tejido se pone en contacto con una solución de EDTA 100 mM /NaOH 10 mM en agua. El tejido se pone en contacto preferentemente por inmersión en el quelante alcalino aunque se obtiene un tratamiento más eficaz por agitación del tejido y la solución juntos durante un tiempo, para que el paso de tratamiento sea eficaz.

Luego el tejido se pone en contacto con una cantidad eficaz de solución ácida, preferentemente que contenga una sal. El tratamiento ácido también cumple una función en la eliminación de glucoproteínas y glucosaminoglucanos así como en la eliminación de proteínas no colagenosas y ácidos nucleicos como ADN y ARN. El tratamiento con sal controla la distensión de la matriz de tejido colagenoso durante el tratamiento ácido y está involucrado en la eliminación de algunas glucoproteínas y proteoglucanos de la matriz colagenosa. Se pueden usar soluciones ácidas conocidas en el área que incluyen, pero no exclusivamente, ácido clorhídrico (HCl), ácido acético (CH_3COOH) y ácido sulfúrico (H_2SO_4). Un ácido preferido es el ácido clorhídrico (HCl) a una concentración preferentemente entre aproximadamente 0.5 y aproximadamente 2 M, más preferentemente entre aproximadamente 0.75 y aproximadamente 1.25 M; muy preferentemente de alrededor de 1 M. El pH final de la solución de ácido/sal está comprendido preferentemente entre aproximadamente 0 y aproximadamente 1, más preferentemente entre aproximadamente 0 y 0.75, y muy preferentemente entre aproximadamente 0.1 y aproximadamente 0.5. El ácido clorhídrico y otros ácidos fuertes son los más eficaces para romper las moléculas de ácido nucleico mientras que los ácidos más débiles son menos eficaces. Las sales que se pueden usar son preferentemente sales inorgánicas e incluyen, pero no exclusivamente, sales como cloruro de sodio (NaCl), cloruro de calcio (CaCl_2) y cloruro de potasio (KCl) aunque los técnicos con experiencia pueden determinar otras sales eficaces. Preferentemente las sales de cloruro se usan a una concentración preferentemente entre aproximadamente 0.1 y aproximadamente 2 M; más preferentemente entre aproximadamente 0.75 y aproximadamente 1.25 M; muy preferentemente de alrededor de 1 M. Una sal de cloruro preferida para usar en el método es cloruro de sodio (NaCl). En la realización más preferida, el tejido se pone en contacto con HCl 1 M/NaCl 1 M en agua. El tejido se pone en contacto preferentemente por inmersión en la solución de ácido/sal aunque se obtiene un tratamiento eficaz por agitación del tejido y la solución juntos durante un tiempo, para que el paso de tratamiento sea eficaz.

Después el tejido se pone en contacto con una cantidad eficaz de una solución de una sal que está preferentemente amortiguada a aproximadamente el pH fisiológico. La solución de la sal amortiguada neutraliza el material mientras reduce la distensión. Las sales que se pueden usar son preferentemente sales inorgánicas e incluyen, pero no exclusivamente, sales como cloruro de sodio (NaCl), cloruro de calcio (CaCl_2) y cloruro de potasio (KCl); y sales nitrogenadas como sulfato de amonio (NH_4SO_4) aunque los técnicos con experiencia pueden determinar otras sales eficaces. Preferentemente las sales de cloruro se usan a una concentración preferentemente entre aproximadamente 0.1 y aproximadamente 2 M; más preferentemente entre aproximadamente 0.75 y

aproximadamente 1.25 M; muy preferentemente de aproximadamente 1 M. Una sal de cloruro preferida para usar en el método es cloruro de sodio (NaCl). Los amortiguadores son conocidos en el área e incluyen, pero no exclusivamente, soluciones de fosfato y borato aunque los técnicos con experiencia pueden determinar otros amortiguadores para usar en el método. Un método preferido para amortiguar la solución de sal es agregar solución salina amortiguada con fosfato (PBS) preferentemente en la cual el fosfato está a una concentración entre aproximadamente 0.001 y aproximadamente 0.02 M y la sal a una concentración entre aproximadamente 0.07 y aproximadamente 0.3 M respecto a la solución de sal. Un pH preferido para la solución es entre aproximadamente 5 y aproximadamente 9, más preferentemente entre aproximadamente 7 y aproximadamente 8, y muy preferentemente entre aproximadamente 7.4 y aproximadamente 7.6. En la realización más preferida, el tejido se pone en contacto con cloruro de sodio (NaCl) 1 M/solución salina amortiguada con fosfato 10 mM (PBS) a un pH entre aproximadamente 7.0 y aproximadamente 7.6. El tejido se pone en contacto preferentemente por inmersión en la solución de sal amortiguada mientras se obtiene un tratamiento eficaz por agitación del tejido y la solución juntos durante un tiempo, para que el paso de tratamiento sea eficaz.

Después del tratamiento de limpieza química, preferentemente el tejido se enjuaga para liberarlo de los agentes de limpieza químicos poniéndolo en contacto con una cantidad eficaz de agente de enjuague. Se pueden usar agentes como agua, soluciones salinas isotónicas y soluciones amortiguadas de pH fisiológico y se pone en contacto con el tejido durante un tiempo suficiente para eliminar los agentes de limpieza. Una solución de enjuague preferida es solución salina amortiguada a pH fisiológico como solución salina amortiguada con fosfato (PBS). Otras maneras de enjuagar el tejido de agentes de limpieza químicos pueden ser determinadas por un técnico con experiencia. Los pasos de limpieza de poner en contacto el tejido con un quelante alcalino y poner en contacto el tejido con una solución ácida que contiene la sal, se pueden realizar en cualquier orden para lograr sustancialmente el mismo efecto de limpieza. Sin embargo, las soluciones no se pueden combinar y realizar como un solo paso.

La composición de la invención es una matriz de tejido limpiada químicamente derivada de tejidos nativos, normalmente celulares. La matriz de tejido limpia es telopéptido de colágeno acelular, aproximadamente en un 93% en peso seco, con menos de aproximadamente un 5% en peso seco de glucoproteínas, glucosaminoglucanos, proteoglucanos, lípidos, proteínas no colagenosas y ácidos nucleicos tales como ADN y ARN. Es importante que la capacidad de biorremodelación de la matriz de tejido se conserva puesto que carece de residuos de detergentes unidos que afectarían negativamente la capacidad de biorremodelación del colágeno. Además, las moléculas de colágeno retuvieron sus regiones telopeptídicas, porque el tejido no se sometió a tratamiento con enzimas durante el proceso de limpieza.

Las matrices de tejido derivan de dermis, arteria, vena, pericardio, válvula cardíaca, duramadre, ligamento, intestino y fascia. Una composición muy preferida es una capa de colágeno intestinal limpiada químicamente derivada del intestino delgado. Son fuentes adecuadas de intestino delgado los organismos mamíferos tales como seres humanos, vacas, cerdos, ovejas, perros, cabras o caballos, aunque la fuente preferida es el intestino delgado del cerdo. En una realización preferida, la capa de colágeno comprende la túnica submucosa derivada del intestino delgado porcino. En otra realización, la capa de colágeno comprende la túnica submucosa y las capas basilares del intestino delgado. Las capas basilares consisten en la lámina muscularis mucosa y, si estaba presente en el tejido nativo, el estrato compacto.

La composición más preferida de la invención es la capa de colágeno intestinal, limpiada por el método de limpieza química de la invención, que es esencialmente colágeno, principalmente colágeno tipo I, con menos de aproximadamente 5% en peso seco de glucoproteínas, glucosaminoglucanos, proteoglucanos, lípidos, proteínas no colagenosas y ácidos nucleicos tales como ADN y ARN. La capa de colágeno carece de residuos de detergentes unidos que afectarían negativamente la capacidad de biorremodelación del colágeno. La capa de colágeno carece sustancialmente de células y residuos celulares, incluidos los ácidos nucleicos endógenos como ADN, ARN y de lípidos. Además, la capa de colágeno intestinal es estéril y carece de endotoxinas cuando se la procesa utilizando un equipo y soluciones estériles y una técnica aséptica.

Una vez que la matriz de tejido colagenoso se ha tornado sustancialmente acelular y exenta de componentes de la matriz extracelular sustancialmente no colagenosos, se pueden fabricar prótesis para implantación o injerto a partir de ella. Las capas de colágeno se pueden suturar o unir entre sí por medio de diversas técnicas conocidas en el área. Los métodos para unir las capas pueden emplear adhesivos como trombina, fibrina o materiales sintéticos tales como cianometacrilatos o agentes de reticulación químicos. Otros métodos pueden emplear calor generado por láser, luz o microondas. También se pueden emplear hornos de convección y baños de líquidos calefaccionados.

La soldadura térmica de las capas de colágeno es el método preferido para unir entre sí las capas de colágeno de la invención. En los documentos WO 95/22301, WO 96/31157 y en la patente de los Estados Unidos N° 5,571,216 se describen métodos para la soldadura térmica del colágeno. La ICL se corta primero longitudinalmente y se aplana sobre una placa plana, sólida. Después se superponen una o más capas sucesivas una sobre la otra, preferentemente en orientación perpendicular alternante. Se pone una segunda placa plana sólida sobre las capas y las dos placas se sujetan firmemente entre sí. Después se calientan el aparato completo, las placas sujetas y la

capas de colágeno durante un periodo de tiempo y en condiciones suficientes para efectuar la unión de las capas de colágeno entre sí. La cantidad de calor aplicado debe ser suficientemente alta como para permitir que el colágeno se una, pero no tan alta como para que el colágeno se desnaturalice irreversiblemente. El tiempo de calentamiento y la unión dependerán del tipo de capa de material de colágeno usado, el contenido de humedad y el espesor del material, y del calor aplicado. Un rango típico de calor es de aproximadamente 50 °C a aproximadamente 75 °C, más típicamente de 60 °C a 65 °C, y muy típicamente 62 °C. Un rango típico de tiempos será de aproximadamente 7 minutos a aproximadamente 24 horas, generalmente de aproximadamente una hora. El grado de calor y la cantidad de tiempo durante el cual se aplica el calor se puede determinar fácilmente mediante experimentación de rutina variando los parámetros de calor y tiempo. El paso de unión se puede realizar en una estufa convencional, aunque se pueden usar otros aparatos o aplicaciones de calor incluidos, pero no exclusivamente, un baño de agua, energía láser o conducción eléctrica del calor. Inmediatamente después del calentamiento y la unión, las capas de colágeno se enfrían, en aire o en un baño de agua, a un rango comprendido entre temperatura ambiente a 20 °C y 1 °C. Se requiere un enfriamiento rápido, denominado inactivación, para detener la acción del calentamiento y crear una unión eficaz entre las capas de colágeno. Para llevar a cabo esta etapa, las capas de colágeno se pueden enfriar, normalmente en un baño de agua, con una temperatura comprendida preferentemente entre aproximadamente 1 °C y aproximadamente 10 °C, muy preferentemente de aproximadamente 4 °C. Aunque se pueden usar temperaturas de enfriamiento por debajo de 1 °C, es necesario tener cuidado de no congelar las capas de colágeno, lo que puede producir lesiones estructurales. Además, en la inactivación se pueden usar temperaturas por encima de 10 °C, pero si la temperatura de la inactivación es demasiado alta, entonces la velocidad de enfriamiento puede no ser suficiente como para fijar las capas de colágeno entre sí.

En la realización preferida, el material de colágeno es reticulado. La reticulación imparte una mayor resistencia e integridad estructural al constructo protésico formado, mientras que regula la biorremodelación del colágeno por las células cuando el constructo se implanta en un paciente. Los agentes de reticulación de colágeno incluyen glutaraldehído, formaldehído, carbodiimidias, diisocianato de hexametileno, bisimidatos, glioxal, cloruro de adipilo, almidón dialdehído y ciertos compuestos poliepoxicos tales como glicol diglicidil éter, poliol poliglicidil éter y diglicidil éster de ácido dicarboxílico. También se pueden usar métodos deshidrotérmicos, irradiación UV y/o métodos mediados por azúcar. El colágeno también se reticula naturalmente con el envejecimiento a temperatura ambiente. Sin embargo, los agentes de reticulación no necesitan estar limitados a estos ejemplos puesto que se pueden usar otros agentes de reticulación y métodos conocidos por los técnicos con experiencia. Los agentes de reticulación se deben elegir para que produzcan un material biocompatible capaz de ser remodelado por las células del huésped. Un agente de reticulación preferido es clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC). La solución de reticulación que contiene EDC y agua también puede contener acetona. La reticulación con EDC fue descrita en las publicaciones internacionales PCT N° WO 95/223011 y WO 96/31157.

En algunas realizaciones, se pueden agregar capas de colágeno adicionales a las superficies externa o interna de las capas de colágeno unidas, antes o después de la reticulación. En constructos tubulares, como en un constructo vascular, se puede agregar colágeno fibrilar denso a la superficie luminal para crear una superficie de flujo lisa para su aplicación final como se describe en la publicación internacional PCT N° WO 95/22301. Esta capa de colágeno lisa también promueve la unión de las células huésped, como en la formación de la neointima, que facilita el crecimiento hacia adentro y la biorremodelación del constructo. Como se describe en la publicación internacional PCT N° WO 95/22301, esta capa de colágeno lisa puede estar hecha de colágeno fibrilar o no fibrilar extraído con ácido, que predominantemente es colágeno tipo I, pero también puede incluir otros tipos de colágeno. El colágeno utilizado puede proceder de varias fuentes mamíferas, generalmente piel o tendones de bovinos, porcinos u ovinos. El colágeno se ha procesado preferentemente por extracción con ácido para obtener una dispersión de fibrillas o gel de alta pureza. El colágeno se puede extraer con ácido de la fuente de colágeno usando un ácido débil, como ácido acético, cítrico o fórmico. Una vez extraído en la solución, el colágeno se puede precipitar con sal usando NaCl y recuperar usando técnicas convencionales como centrifugación o filtración. Se describen detalles del colágeno extraído con ácido de tendón bovino, por ejemplo, en la patente de los Estados Unidos N° 5,106,949.

A la prótesis se le puede aplicar heparina por diversas técnicas bien conocidas. Con fines ilustrativos, la heparina se puede aplicar a la prótesis de las tres maneras siguientes. En primer lugar, se puede aplicar solución de benzalconio heparina (BA-Hep) a la prótesis, sumergiendo la prótesis en la solución y después secándola al aire. Este procedimiento trata el colágeno con un complejo de BA-Hep unido iónicamente. En segundo lugar, se puede usar EDC para activar la heparina, y después para unir covalentemente la heparina a la fibra de colágeno. En tercer lugar, se puede usar EDC para activar el colágeno, después unir covalentemente protamina al colágeno y después unir iónicamente la heparina a la protamina. También se podrían usar otros muchos procedimientos de recubrimiento, unión y adhesión bien conocidos en el área.

También se puede realizar el tratamiento del material de la matriz de tejido con agentes como factores de crecimiento o productos farmacéuticos además, o en sustitución, de la heparina. Los agentes pueden incluir, por ejemplo, factores de crecimiento para promover la vascularización y epitelización, como el factor de crecimiento derivado de macrófagos (MDGF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento derivado de células endoteliales vasculares (VEGF); antibióticos para luchar contra cualquier posible infección por el

implante quirúrgico; o factores de crecimiento nervioso incorporados en la capa de colágeno interna cuando la prótesis se usa como un conducto para la regeneración de nervios. Además o en sustitución de los fármacos, se pueden incluir componentes de matriz como proteoglucanos, glucoproteínas o glucosaminoglucanos dentro del constructo.

La prótesis de colágeno formada de esta manera también se puede esterilizar en una solución diluida de ácido peracético con un pH neutro. En la patente de los Estados Unidos N° 5,460,962 se describen métodos para esterilizar el colágeno. En el método preferido, el colágeno se desinfecta con una solución diluida de ácido peracético a pH neutro. La concentración de ácido peracético está comprendida preferentemente entre aproximadamente 0.01 y 0.3% v/v en agua a pH neutralizado entre aproximadamente pH 6 y pH 8. Como alternativa, también se puede usar esterilización con irradiación gamma, generalmente a 2.5 Mrad, o con plasma de gas para esterilizar el colágeno. También se pueden usar otros métodos conocidos en el área para esterilizar el colágeno.

Ejemplos

Ejemplo 1: Limpieza química de intestino delgado porcino vaciado mecánicamente

Se extrajo el intestino delgado de un cerdo y se limpió mecánicamente usando una máquina limpiadora de tripas Bitterling (Nottingham, Reino Unido) que retira a la fuerza la grasa, el músculo y las capas mucosas de la túnica submucosa usando una combinación de acción mecánica y lavado usando agua. La acción mecánica se puede describir como una serie de rodillos que comprimen y quitan las sucesivas capas de la túnica submucosa cuando se pasa el intestino intacto entre ellas. La túnica submucosa del intestino delgado es comparativamente más dura y más rígida que el tejido circundante, y los cilindros presan los componentes más blandos de la submucosa. El resultado de la limpieza a máquina fue tal que sólo quedó la capa submucosa del intestino. El resto del procedimiento se realizó en condiciones asépticas y a temperatura ambiente. Todas las soluciones químicas se usaron a temperatura ambiente. Después se cortó el intestino longitudinalmente hasta el lumen y luego se cortó en secciones de 15 cm. El material se pesó y se colocó en recipientes a una relación de aproximadamente 100:1 v/v entre solución y material intestinal.

A. A cada recipiente que contenía intestino se le agregó aproximadamente 1 L de solución de sal tetrasódica del ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 100 mM/solución de hidróxido de sodio (NaOH) 10 mM, esterilizada con un filtro de 0.22 mm (micrómetro). Después los recipientes se colocaron en una mesa vibratoria durante aproximadamente 18 horas a aproximadamente 200 rpm. Después de la agitación se retiró la solución de EDTA/NaOH de cada frasco.

B. A cada recipiente se le agregó después aproximadamente 1 L de solución de ácido clorhídrico (HCl) 1 M/solución de cloruro de sodio (NaCl) 1 M, esterilizada con un filtro de 0.22 mm. Después los recipientes se colocaron en una mesa vibratoria durante aproximadamente 6 a 8 horas a aproximadamente 200 rpm. Después de la agitación se retiró la solución de HCl/NaCl de cada recipiente.

C. A cada recipiente se le agregó después aproximadamente 1 L de solución de cloruro de sodio (NaCl) 1 M/solución salina amortiguada con fosfato (PBS) 10 mM, esterilizada con un filtro de 0.22 mm. Después los recipientes se colocaron en una mesa vibratoria durante aproximadamente 18 horas a 200 rpm. Después de la agitación se retiró la solución de NaCl/PBS de cada recipiente.

D. A cada recipiente se le agregó después aproximadamente 1 L de solución de PBS 10 mM esterilizada con un filtro de 0.22 mm. Después los recipientes se colocaron en una mesa vibratoria durante aproximadamente dos horas a 200 rpm. Después de la agitación, se retiró la solución salina amortiguada con fosfato de cada recipiente.

E. Finalmente, a cada recipiente se le agregó después aproximadamente 1 L de agua esterilizada con un filtro de 0.22 mm. Después los recipientes se colocaron en una mesa vibratoria durante aproximadamente una hora a 200 rpm. Después de la agitación, se retiró el agua de cada recipiente.

Las muestras tratadas se cortaron y se fijaron para análisis histológico. Se realizó tinción con hematoxilina y eosina (H&E) y tinción tricrómica de Masson tanto en muestras de cortes transversales como en muestras de cortes longitudinales de los tejidos de control y tratados. Las muestras de tejidos tratados aparecieron sin células y sin residuos celulares, mientras que las muestras de control aparecieron normal y esperablemente muy celulares.

Ejemplo 2: Limpieza química de una válvula cardíaca porcina

Se adquirió un corazón porcino de un lechón de 1 libra que se despachó en solución salina de pH fisiológico en hielo. En el transcurso de las 4 horas siguientes se extrajeron las válvulas cardíacas de la masa cardíaca usando un escalpelo y fórceps. También se realizó algo de disección macroscópica para retirar el exceso de tejido de alrededor de las válvulas. Una válvula se retuvo como control y se cortó en piezas de muestra que se fijaron para diversos análisis histológicos, mientras que la otra válvula se sometió al proceso de limpieza química. El resto del procedimiento se realizó en condiciones asépticas y a temperatura ambiente. Todas las soluciones químicas se usaron a temperatura ambiente.

5 La válvula se colocó en 1 L de solución de EDTA 100 mM/NaOH 10 mM durante aproximadamente 18 horas mientras se agitaba en una plataforma vibratoria. Después la válvula se colocó en 1 L de HCl 1 M/NaCl 1 M y se agitó durante 8 horas. Después la válvula se colocó en 1 L de HCl 1 M/solución salina amortiguada con fosfato (PBS)10 mM y se agitó durante aproximadamente 18 horas. Luego la válvula se enjuagó en PBS durante aproximadamente 2 a 4 horas y después finalmente se enjuagó con agua estéril durante aproximadamente 1 hora mientras se agitaba. Después se cortaron piezas de la muestra tratada y se fijaron para diversos análisis histológicos.

10 Se realizó tinción con hematoxilina y eosina (H&E) y tinción tricrómica de Masson tanto en muestras de cortes transversales como en muestras de cortes longitudinales de las válvulas de control y tratadas. Las muestras de válvula tratada aparecieron sin células y sin residuos celulares, mientras que las muestras de control aparecieron normal y esperablemente muy celulares.

15 Ejemplo 3: Limpieza química de arteria, pericardio y fascia de porcino

20 Se adquirieron un segmento de arteria femoral, el pericardio entero y la fascia de una cerda de 450 libras. Los tejidos se despacharon en solución salina de pH fisiológico en hielo. Los tejidos se diseccionaron posteriormente para retirar el exceso de tejido. Se tomaron muestras de cada tejido sin limpiar como muestras de control y se fijaron para diversos análisis histológicos, mientras que el resto de los tejidos se sometió al proceso de limpieza química. El resto del procedimiento se realizó en condiciones asépticas y a temperatura ambiente. Todas las soluciones químicas se usaron a temperatura ambiente.

25 Los tejidos se colocaron por separado en 1 L de solución de EDTA 100 mM/10 mM y se agitaron en una plataforma vibratoria durante aproximadamente 18 horas. Después los tejidos se colocaron por separado en 1 L de solución de HCl 1 M/NaCl 1 M y se agitaron durante 8 horas. A continuación, los tejidos se colocaron por separado en 1 L de solución de HCl 1 M/solución salina amortiguada con fosfato (PBS) 10 mM y después se agitaron durante aproximadamente 18 horas. Luego los tejidos se enjuagaron por separado en PBS durante aproximadamente 2 a 4 horas y después finalmente se enjuagaron con agua estéril durante aproximadamente 1 hora mientras se agitaban.
30 Después se cortaron piezas de las muestras tratadas y se fijaron para diversos análisis histológicos.

35 Se realizó tinción con hematoxilina y eosina (H&E) y tinción tricrómica de Masson tanto en muestras de cortes transversales como en muestras de cortes longitudinales de los tejidos de control y tratados. Las muestras de tejidos tratados aparecieron sin células y sin residuos celulares, mientras que las muestras de control aparecieron normal y esperablemente muy celulares.

Ejemplo 4: Limpieza química ordenada de manera diferente

40 Este procedimiento se realizó en condiciones asépticas y a temperatura ambiente y todas las soluciones químicas se usaron a temperatura ambiente.

Se cortó el intestino porcino vaciado mecánicamente en cinco secciones de 15 cm como se describe en el ejemplo 1.

45 A cada recipiente se le agregó después aproximadamente 1 L de solución de ácido clorhídrico (HCl) 1 M/solución de cloruro de sodio (NaCl) 1 M, esterilizada con un filtro de 0.22 mm. Después los recipientes se colocaron en una mesa vibratoria durante aproximadamente 6 a 8 horas a aproximadamente 200 rpm. Después de la agitación se retiró la solución de HCl/NaCl de cada recipiente.

50 A cada recipiente que contenía intestino se le agregó aproximadamente 1 L de solución de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 100 mM/solución de hidróxido de sodio (NaOH) 10 mM, esterilizada con un filtro de 0.22 mm (micrómetro). Después los recipientes se colocaron en una mesa vibratoria durante aproximadamente 18 horas a aproximadamente 200 rpm. Después de la agitación se retiró la solución de EDTA/NaOH de cada frasco.

55 A cada recipiente se le agregó después aproximadamente 1 L de solución de cloruro de sodio (NaCl) 1 M/solución salina amortiguada con fosfato (PBS) 10 mM, esterilizada con un filtro de 0.22 mm. Después los recipientes se colocaron en una mesa vibratoria durante aproximadamente 18 horas a 200 rpm. Después de la agitación se retiró la solución de NaCl/PBS de cada recipiente.

60 A cada recipiente se le agregó después aproximadamente 1 L de solución de PBS 10 mM esterilizada con un filtro de 0.22 mm. Después los recipientes se colocaron en una mesa vibratoria durante aproximadamente una hora a 200 rpm. Después de la agitación, se retiró la solución salina amortiguada con fosfato de cada recipiente.

Finalmente, a cada recipiente se le agregó después aproximadamente 1 L de agua esterilizada con un filtro de 0.22

mm. Después los recipientes se colocaron en una mesa vibratoria durante aproximadamente una hora a 200 rpm. Después de la agitación, se retiró el agua de cada recipiente.

5 Después se cortaron piezas de las muestras tratadas y se fijaron para diversos análisis histológicos. Se realizó tinción con hematoxilina y eosina (H&E) y tinción tricrómica de Masson tanto en muestras de cortes transversales como en muestras de cortes longitudinales de los tejidos de control y tratados. Las muestras de tejidos tratados aparecieron sin células y sin residuos celulares, mientras que las muestras de control aparecieron normal y esperablemente muy celulares.

10 Ejemplo 5: Diversos agentes alcalinos y quelantes

La limpieza de la submucosa intestinal porcina vaciada mecánicamente se realizó de acuerdo con el ejemplo 1. Este procedimiento se llevó a cabo en condiciones asépticas y a temperatura ambiente y todas las soluciones químicas se usaron a temperatura ambiente. Se siguió el proceso de limpieza química del ejemplo 1, pero con la sustitución del quelante alcalino del paso A por otros quelantes alcalinos de naturaleza similar:

20 A. A cada recipiente que contenía intestino se le agregó aproximadamente 1 L de solución o bien de ácido etilénbis(oxietilénonitrilo)tetraacético (EGTA) 100 mM/NaOH 10 mM, o bien de EDTA 100 mM/Ca(OH)₂ (hidróxido de calcio) 10 mM; o bien de EDTA 100 mM/solución de K₂CO₃ (carbonato de potasio) 10 mM, esterilizada con un filtro de 0.22 mm (micrómetro). Después los recipientes se colocaron en una mesa vibratoria durante aproximadamente 18 horas a aproximadamente 200 rpm. Después de la agitación, se retiró la solución de quelantes de cada frasco.

25 B. A cada recipiente se le agregó después aproximadamente 1 L de solución de ácido clorhídrico (HCl) 1 M/solución de cloruro de sodio (NaCl) 1 M, esterilizada con un filtro de 0.22 mm. Después los recipientes se colocaron en una mesa vibratoria durante aproximadamente 6 a 8 horas a aproximadamente 200 rpm. Después de la agitación se retiró la solución de HCl/NaCl de cada recipiente.

30 C. A cada recipiente se le agregó después aproximadamente 1 L de solución de cloruro de sodio (NaCl) 1 M/solución salina amortiguada con fosfato (PBS) 10 mM, esterilizada con un filtro de 0.22 mm. Después los recipientes se colocaron en una mesa vibratoria durante aproximadamente 18 horas a 200 rpm. Después de la agitación se retiró la solución de NaCl/PBS de cada recipiente.

35 D. A cada recipiente se le agregó después aproximadamente 1 L de solución de PBS 10 mM esterilizada con un filtro de 0.22 mm. Después los recipientes se colocaron en una mesa vibratoria durante aproximadamente una hora a 200 rpm. Después de la agitación, se retiró la solución salina amortiguada con fosfato de cada recipiente.

E. Finalmente, a cada recipiente se le agregó después aproximadamente 1 L de agua esterilizada con un filtro de 0.22 mm. Después los recipientes se colocaron en una mesa vibratoria durante aproximadamente una hora a 200 rpm. Después de la agitación, se retiró el agua de cada recipiente. Las muestras se fijaron para análisis histológicos.

40 Se realizó tinción con hematoxilina y eosina (H&E) y tinción tricrómica de Masson tanto en muestras de cortes transversales como en muestras de cortes longitudinales de los tejidos de control y tratados. Las muestras de tejidos tratados aparecieron sin células y sin residuos celulares, mientras que las muestras de control aparecieron normal y esperablemente muy celulares.

45 Ejemplo 6: Diversos ácidos y sales

La submucosa intestinal porcina vaciada mecánicamente del ejemplo 1 se limpió químicamente usando un ácido sustituido o una sal sustituida en el paso B. Este procedimiento se realizó en condiciones asépticas y a temperatura ambiente y todas las soluciones químicas se usaron a temperatura ambiente.

50 A. A cada recipiente que contenía intestino se le agregó aproximadamente 1 L de solución de sal tetrasódica del ácido etilénodiaminotetraacético (EDTA) 100 mM/solución de hidróxido de sodio (NaOH) 10 mM, esterilizada con un filtro de 0.22 mm (micrómetro). Después los recipientes se colocaron en una mesa vibratoria durante aproximadamente 18 horas a aproximadamente 200 rpm. Después de la agitación se retiró la solución de EDTA/NaOH de cada frasco.

55 B. A cada recipiente se le agregó después una solución o bien de CH₃COOH (ácido acético) 1 M/NaCl 1 M o bien de H₂SO₄ (ácido sulfúrico) 1 M/solución de NaCl 1 M, esterilizada con un filtro de 0.22 mm. Después los recipientes se colocaron en una mesa vibratoria durante aproximadamente 6 a 8 horas a aproximadamente 200 rpm. Después de la agitación, se retiró la solución de cada recipiente.

60 C. A cada recipiente se le agregó después aproximadamente 1 L de solución de cloruro de sodio (NaCl) 1 M/solución salina amortiguada con fosfato (PBS) 10 mM, esterilizada con un filtro de 0.22 mm. Después los recipientes se colocaron en una mesa vibratoria durante aproximadamente 18 horas a 200 rpm. Después de la agitación se retiró la solución de NaCl/PBS de cada recipiente.

D. A cada recipiente se le agregó después aproximadamente 1 L de solución de PBS 10 mM, esterilizada con

un filtro de 0.22 mm. Después los recipientes se colocaron en una mesa vibratoria durante aproximadamente una hora a 200 rpm. Después de la agitación, se retiró la solución salina amortiguada con fosfato de cada recipiente.

5 E. Finalmente, a cada recipiente se le agregó después aproximadamente 1 L de agua esterilizada con un filtro de 0.22 mm. Después los recipientes se colocaron en una mesa vibratoria durante aproximadamente una hora a 200 rpm. Después de la agitación, se retiró el agua de cada recipiente.

10 Después se cortaron piezas de las muestras tratadas y se fijaron para diversos análisis histológicos. Se realizó tinción con hematoxilina y eosina (H&E) y tinción tricrómica de Masson tanto en muestras de cortes transversales como en muestras de cortes longitudinales de los tejidos de control y tratados. Las muestras de tejidos tratados aparecieron sin células y sin residuos celulares, mientras que las muestras de control aparecieron normal y esperablemente muy celulares.

15 Ejemplo 7: Contenido de glucosaminoglucano (GAG) de ICL determinado por electroforesis en gel de acetato de celulosa y ensayo con azul Alcian

Para determinar el contenido de GAG de ICL, se realizó electroforesis en gel de acetato de celulosa con tinción posterior con azul Alcian en extractos de ICL limpiada químicamente.

20 Se cortaron muestras de ICL sometidas al régimen de limpieza química indicado en el ejemplo 1, en piezas de 0.125 cm² y se pusieron en tubos eppendorf. Para digerir las muestras, se añadieron 100 µl de papaína (0,1 mg/ml de papaína en fosfato sódico 0.1 M, cloruro sódico 0.1 M, EDTA 0.005 M, 0.9 mg/ml de cisteína, pH 5.8) a cada tubo y se incubó durante aproximadamente 18 horas a 60 °C. Se prepararon patrones que contenían cantidades conocidas de GAG (heparina) en paralelo. Después se agregaron Dowex (0.4 g de la forma en HCl) y 3 ml de agua. Después de centrifugar para eliminar la resina Dowex, se extrajo 1 ml y se liofilizó. Luego las muestras se rehidrataron en 100 µl de agua purificada y se centrifugaron durante aproximadamente 5 minutos.

25 Se separaron muestras en láminas de acetato de celulosa usando el método de Newton, et al. (1974). Las láminas de acetato de celulosa se sumergieron en cloruro de litio 0.1 M/solución amortiguadora de EDTA (pH 5.8) y se secaron suavemente. Se aplicaron las muestras (5 µl cada una) a las láminas en el extremo del cátodo y se sometieron a electroforesis durante 30 minutos a 5 mA.

30 Después de la electroforesis, las láminas se sumergieron inmediatamente en una solución de tinción con azul Alcian (0.2% de azul Alcian 8GX, cloruro de magnesio 0.05 M, solución amortiguadora de acetato de sodio 0.025 M (pH 5.8) en alcohol etilénico al 50%) y se colocaron en una plataforma vibratoria durante aproximadamente 30 minutos a temperatura ambiente. Después las láminas se destiñeron en al menos tres lavados de solución para destiñir (cloruro de magnesio 0.05 M, solución amortiguadora de acetato de sodio 0.025 M (pH 5.8) en alcohol etilénico al 50%) durante un total de aproximadamente 30 minutos en una plataforma vibratoria. No se observó tinción de GAG detectable para la ICL digerida con papaína, mientras que se detectó tan poco como 0.005 microgramos de patrón de heparina.

35 Estos resultados demostraron que la cantidad total de GAG restante en la ICL limpiada químicamente es menor de 1% (peso seco).

40 Ejemplo 8: Contenido de lípidos de ICL determinado por extracción con cloruro de metileno

45 Se tendió de forma plana ICL en placas de plástico y se secó al aire durante dos horas. Una vez seca, la ICL se cortó en pequeñas piezas de aproximadamente 1 cm² de las cuales se transfirieron 1.100 g a un cartucho para soxhlet.

50 A un balón marca Kontes 24/40 se le agregaron 90 ml de cloruro de metileno. El soxhlet se montó en la campana de extracción con el fondo del balón en un baño de agua calefaccionada, y agua enfriada con hielo circulando por el destilador.

55 Se dejó que la extracción continuara durante 4 horas, después de lo cual se desmontó el soxhlet. El balón que contenía el solvente y el material extraído se dejó en el baño de agua calefaccionada hasta que se evaporó el cloruro de metileno y quedaron 5 ml. Después el cloruro de metileno se transfirió a un tubo de cultivo de vidrio de 11 x 13 y se evaporó el resto del solvente. Se agregaron 2 ml de cloruro de metileno al tubo y el tubo se tapó inmediatamente y se colocó en un congelador a -20 °C.

60 Después se determinó el peso del material extraído. El tubo de vidrio se colocó en un baño de hielo. Se taró el peso de una navecilla para pesar de aluminio Ludiag de 1.12 ml en una microbalanza (Spectrum Supermicro). Se agregaron 10 µl de la extracción resuspendida a la navecilla para pesar, y el solvente se evaporó colocando la navecilla sobre una plancha caliente durante 45 segundos. Se dejó enfriar la navecilla durante aproximadamente 190 segundos y se la colocó en la microbalanza. Después se repitió el procedimiento para volúmenes de extracción

de 20 µl y 30 µl.

- 5 Los resultados indican que el porcentaje de lípidos en la ICL seca, limpiada químicamente, es menor de aproximadamente 0.7% en peso de lípidos. En contraposición, la ICL que no se limpió químicamente contiene una fracción mayor de lípidos; al menos aproximadamente 1.5% en peso en la ICL seca que no se limpió químicamente por el método de la invención.

Ejemplo 9: Análisis de aminoácidos de ICL

- 10 Los colágenos son proteínas caracterizadas por sus regiones triple helicoidales que tienen un triplete repetido de los aminoácidos glicina-X-Y, donde X es frecuentemente prolina e Y es frecuentemente hidroxiprolina. La hidroxiprolina se usa a menudo como un aminoácido para identificar y cuantificar colágenos. (Udenfriend, Science, 152:1335-1340, 1966).

- 15 Para determinar el análisis completo de los aminoácidos de ICL, se realizó HPLC PICO-TAG de la ICL porcina limpiada mecánicamente (no limpiada químicamente) y la ICL limpiada químicamente. Se midió y comparó el contenido de hidroxiprolina de ambos materiales.

- 20 Se secaron adicionalmente piezas de muestras de ICL de cada condición que pesaban entre aproximadamente 0.31 y aproximadamente 0.36 g usando una estufa CEM AVC80 (CEM Corp.; Matthews, NC). Se cortaron muestras más pequeñas de esas piezas de ICL secas que pesaron entre aproximadamente 9.5 y aproximadamente 13.1 mg. Las muestras se colocaron en tubos de cultivo con tapa de rosca y después se hidrolizaron (n = 3 para cada condición) en fenol al 1% en HCl 6 M a 110 °C durante aproximadamente 16 horas. Luego, los hidrolizados de ICL se diluyeron en HCl 0.1 M para normalizar las concentraciones del material a 1 mg/ml. Se agregaron a tubos de vidrio (6 x 55) rotulados, 20 ml de los hidrolizados y 8 ml de L-norleucina a una concentración de 1.25 mmol/ml como patrón interno. Después las muestras se congelaron y se liofilizaron. Después las muestras se volvieron a secar agregando 20 ml de etanol:agua:trietilamina 2:2:1 a los tubos, congelando y liofilizando. Después se derivatizaron las muestras durante 20 minutos a temperatura ambiente agregando 20 ml de reactivo (etanol:agua:trietilamina:PITC 7:1:1:1) seguido de congelación y liofilización. Finalmente, las muestras se suspendieron en 200 ml de diluyente de muestras PICO-TAG y se distribuyeron alícuotas en viales de HPLC.

- 35 Se prepararon patrones de aminoácidos de la siguiente manera: se agregó 0.1 ml de patrón de aminoácidos (producto N°: A-9531, Sigma) a 1.9 ml de HCl 0.1 M. Se realizaron cinco diluciones seriadas 1:1 usando HCl 0.1 M. Se agregaron juntos volúmenes de 100 ml de cada dilución seriada y 8 ml de L-norleucina de 1.25 mmol/ml a tubos de vidrio (6 x 55) y después se prepararon de la misma manera que las muestras de ICL.

- 40 Se corrieron las muestras y los patrones en una columna para aminoácidos PICO-TAG de 3.9 x 150 mm (pieza N° 88131; Waters Corp.; Milford, MA). Se analizaron inyecciones de 10 ml para las muestras y de 20 ml para los patrones, por triplicado en cada caso.

- 45 Los resultados indican que para el material de ICL limpiado químicamente, el contenido de los aminoácidos colagenosos principales en el material se aproxima al de las preparaciones de colágeno purificadas. Usando la hidroxiprolina como una medida del contenido de colágeno, se calcula que el porcentaje en peso de colágeno en ICL es al menos aproximadamente 93% de colágeno en peso seco. En contraposición, la ICL que no se limpió químicamente contiene una alta fracción de aminoácidos no colagenosos; entre aproximadamente 11 y 25% en peso seco de la ICL es un material no colagenoso.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición de matriz de tejido colagenoso biorremodelable que deriva de un tejido nativo de mamífero que se tornó exenta de residuos de detergente y modificación enzimática, destinada a ser implantada para reparar o reemplazar una parte del cuerpo dañada o enferma, que contiene colágeno y elastina, donde la matriz de tejido comprende
- 10 telopéptido de colágeno acelular, aproximadamente 93% en peso seco; elastina, y componentes no colagenosos donde dichos componentes representan menos del 5% de la composición total basado en el peso seco.
- 15 2. La composición de matriz de tejido colagenoso biorremodelable de la reivindicación 1 en la cual el tejido nativo de mamífero se selecciona del grupo que consiste en dermis, arteria, vena, pericardio, válvula cardíaca, duramadre, ligamento, hueso, cartílago, fascia e intestino.
- 20 3. La composición de matriz de tejido colagenoso biorremodelable de la reivindicación 1 o 2 en la cual el tejido nativo de mamífero comprende la túnica submucosa del intestino delgado.
- 25 4. La composición de matriz de tejido colagenoso biorremodelable de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en la cual la matriz de tejido colagenoso se limpia químicamente.
5. La composición de matriz de tejido colagenoso biorremodelable de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en la cual la matriz de tejido colagenoso es estéril.
- 30 6. La composición de matriz de tejido colagenoso biorremodelable de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en la cual la matriz de tejido colagenoso se extiende en capas que se unen para formar láminas multicapa, tubos o prótesis de forma compleja.
7. La composición de matriz de tejido colagenoso biorremodelable de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en la cual la matriz de tejido colagenoso es reticulada.