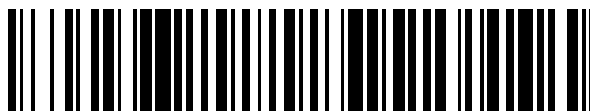


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 414 060**

51 Int. Cl.:

A61L 2/00 (2006.01)

A61L 27/36 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.12.2001 E 01271083 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.04.2013 EP 1343543**

54 Título: **Procedimiento para crear material biológico y biosintético para implantes**

30 Prioridad:

20.12.2000 AU PR217300

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

18.07.2013

73 Titular/es:

**KRYOCOR PTY. LTD. (100.0%)
36 MUNSTER TERRACE
NORTH MELBOURNE, VIC 3051, AU**

72 Inventor/es:

KETHARANATHAN, VETTIVETPILLAI

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 414 060 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para crear material biológico y biosintético para implantes.

5 **Antecedentes de la invención****Campo de la invención**

10 La presente invención se refiere a un procedimiento para crear material biológico y biosintético apropiado para implantes, para reemplazar o aumentar tejidos dañados, enfermos o ausentes, estructuras u órganos, de aplicación particular pero que no significa la aplicación exclusiva en el tratamiento de material autogénico, alogénico o xenogénico de origen mamífero, para conservar una organización microarquitectural e inhibir *in vivo* la calcificación, el crecimiento interno tisular y la angiogénesis transparietal. En una forma de realización, tal como puede determinarse por el uso, las células vivas trasplantadas pueden unirse y retenerse bajo condiciones *in vivo*.

15 **Descripción de la técnica relacionada**

La estabilización tisular y la fijación, utilizando, por ejemplo, glutaraldehído, para impartir fuerza, neutralizar los sitios antigénicos, y esterilizar el tejido biosintético y biológico para los implantes humanos, se ha descrito previamente en las patentes US nº 4.319.363, nº 4.466.139 y nº 4.681.588 (Ketharanathan) dan a conocer el procesamiento de material biosintético y biológico con una concentración constante de glutaraldehído y a un pH constante en un entorno líquido estático para impartir lugar a fuerza y duración, neutralizar los sitios antigénicos y esterilizar el material. La patente US nº 3.966.401 (Hancock & Fogarty), describe un procedimiento para presurizar los tejidos, tales como los de una válvula cardiaca, con un líquido curtiende tal como glutaraldehído, dentro del intervalo fisiológico, y liberando la presión, de forma tal, que el tejido natural conserve la flexibilidad. Por otra parte, la patente US nº 4.798.611 (Freeman) da a conocer un procedimiento para esterilizar, proporcionar elasticidad y reducir la antigenicidad mediante radiación gamma del material xenogénico a un nivel de entre 2 a 8 megarads, siguiendo el tratamiento con un agente de reticulación, por ejemplo, glutaraldehído.

30 En las prótesis tisulares biológicas implantadas tratadas con glutaraldehído, particularmente en las prótesis de válvulas cardiacas, se ha informado de la calcificación *in vivo*. La microcalcificación *in vivo* se demostró en las paredes del material al que se alude en la patente US nº 4.466.139 cuando se utilizó como un conducto vascular en perros, aunque la calcificación no provocó que el material fallara. El almacenamiento en alcohol al 50% antes del implante, redujo, sin eliminarlo, el grado de calcificación. En un esfuerzo para reducir o eliminar la calcificación, se han instituido varios procedimientos para reducir o eliminar la calcificación. La patente US nº 4.648.881 (Carpentier *et al.*) describe un procedimiento para inhibir la calcificación en los tejidos biológicos utilizando una solución deficiente en fosfato, y una patente US nº 5.931.969 (Carpentier *et al.*), da a conocer el tratamiento de un tejido fijado, por lo menos parcialmente, en una solución calentada de tratamiento, induciendo el movimiento tejido/solución durante entre 15 y 60 días. En la patente US nº 5.843.181 (Jaffe & Hancock), se da a conocer un procedimiento por el que el tejido biológico se transforma sustancialmente en acelular exponiéndolo, por lo menos, a una solución tamponada con un pH del orden de 5 a 8 antes de su fijación. La patente US nº 5.746.775 (Levy & Hirsch) da a conocer la inhibición de la calcificación *in vivo* sometiendo el tejido a una solución acuosa de un alcohol alifático inferior de entre el 60 y 80%, que contiene un agente anticálculo, durante, por lo menos, 20 minutos después del pretratamiento con glutaraldehído.

45 Se ha informado de diversos procedimientos del pretratamiento de sustratos con proteínas matriciales extracelulares, para simular una superficie proteínica, en un esfuerzo para promover el crecimiento, la unión y la retención de células vivientes trasplantadas sobre la superficie de materiales sintéticos. Por ejemplo, el revestimiento de material de poliéster para realizar injertos, con plasma humano y gel de fibrina, para la unión de células endoteliales a superficies sintéticas para injertos vasculares, con objeto de proporcionar por lo menos, un 50% de confluencia, se da a conocer en la patente US nº 4.820.626 (Williams & Jarrell). La patente US nº 5.632.778 (Goldstein) describe un procedimiento para matar células nativas en el colágeno intersticial, eliminando moléculas solubles de modo potencial inmunogénicamente activas, y tratando a continuación el tejido acelular con sustancias extracelulares y trasplantando células alogénicas o autólogas antes de implantar el material para injerto.

55 La patente US nº 4.553.974 (Dewanjee) da a conocer un procedimiento para crear un material de implante colágena con una calcificación disminuida *in vivo*, que comprende etapas múltiples de fijación del glutaraldehído, con una concentración del 0,25% del reticulador durante un tiempo de dos a doce horas.

60 Se ha puesto una atención considerable en el tamaño apropiado de los poros de los materiales sintéticos para la implantación, con objeto de promover la cicatrización o la biolización mediante el crecimiento interno tisular y, más recientemente, para la angiogénesis transparietal, para promover la endotelialización. Un aspecto no deseado es la naturaleza descontrolada del crecimiento intertisular particularmente en los conductos vasculares de un diámetro interno de 6 mm y menos, que causa el estrechamiento luminal, la trombosis y la oclusión, con el consiguiente fallo del injerto.

65

Sumario de la invención

5 La presente invención proporciona un procedimiento para crear un material para implante de tejidos autogénicos, alogénicos o xenogénicos de mamíferos, incluyendo dichos tejidos entre el 20% y el 80% y preferentemente, el 40% de colágeno en peso, el cual procedimiento implica: tratar dicho tejido con un agente de reticulación durante un período de tiempo de entre 30 minutos y 6 horas, que incluye la variación gradual de dicha concentración del agente de reticulación desde una concentración inicial de 0% a 0,25% peso/volumen, hasta una concentración final desde 0,5% al 5% peso/vol a lo largo de dicho período de tiempo, y variando gradualmente el pH de dicho agente de reticulación desde un valor inicial de 1 a 3, a un pH final de entre 5 a 8 durante dicho período de tiempo.

10 Preferentemente, el procedimiento incluye el tratamiento de dicho tejido con dicho agente de reticulación durante un período de tiempo de 2,5 horas aproximadamente.

15 Preferentemente, dicho procedimiento incluye el aumento progresivo de la concentración de dicho agente de reticulación y de dicho pH, a lo largo de dicho período de tiempo.

20 Preferentemente, dicha concentración inicial es aproximadamente del 0%, y dicha concentración final, preferentemente, es aproximadamente de 2,5% peso/volumen.

25 Preferentemente, dicho pH inicial es aproximadamente de 1,5, y dicho pH final, preferentemente, es aproximadamente de 7,4.

El tejido puede ser un material de, por ejemplo, origen humano, ovino, bovino y porcino. El tejido puede ser material tisular genéticamente manipulado o material tisular manipulado sobre un soporte degradable o duradero en un animal sustituto, o mediante sistemas de cultivo tisular en el laboratorio. El tejido puede consistir en material biológico que se encuentra de forma natural, tal como uréteres, pleura y vasos sanguíneos. El tejido puede ser de cualquier configuración, que incluye la tubular, la de tipo laminar o la tridimensional.

30 Preferentemente, el agente de reticulación es el glutaraldehído.

35 El material se trata, preferentemente, en un baño líquido circulante en un tambor rotatorio. En un baño circulante, el material tubular puede unirse a un sistema de flujo tal, que el líquido fluye a través de la luz de dicho tubo, a una velocidad de 200 a 400 ml por minuto, y preferentemente a 300 ml por minuto. Preferentemente, el procedimiento incluye adicionalmente, después de dicho período de tiempo, tratar dicho tejido con un agente de reticulación (preferentemente, una solución cuya recién preparada), a una concentración, de entre 0,5% al 5% (preferentemente 2,5%) peso/volumen y a un pH de entre 5 a 8 (preferentemente 7,4), a una temperatura de entre 20°C a 27°C (preferentemente 25%), durante un tiempo de entre 1 hora a 5 días (preferentemente de 48 horas).

40 Preferentemente, el tejido y la solución del agente de reticulación se mantienen a una temperatura de entre 20°C a 27°C, pero preferiblemente, aproximadamente, a 25°C .

45 La configuración de dicho tejido se mantiene preferentemente durante el tratamiento, mediante una matriz compresible a la que el tejido, preferentemente, no está unido, o se une a sólo uno de los extremos, para permitir el movimiento del material sobre dicha matriz.

50 De esa forma, el alineamiento microarquitectural tisular se mantiene sin dañar al tejido.

Preferentemente, dicho procedimiento incluye la esterilización de dicho tejido después de que éste haya sido sometido a reticulado, preferentemente, químicamente, o mediante irradiación gamma, en preferentemente entre 15 a 30 kJ·kg⁻¹(Kgys) y preferentemente a 25 kJ·kg⁻¹ (Kgys).

55 Opcionalmente, el procedimiento incluye la inmersión tisular antes de la esterilización, en agua oxigenada al 2% peso/vol, durante 30 minutos a 1,5 horas, pero preferentemente durante 1 hora.

Opcionalmente, el procedimiento incluye la incubación tisular en glicina al 5% peso/volumen, antes de la esterilización mediante irradiación gamma, durante 2 a 24 horas y preferentemente durante 12 horas.

60 Preferentemente, el procedimiento incluye la conservación de dicho material en alcohol etílico (es decir, etanol), en un 50% vol/vol, durante, por lo menos, tres semanas y, preferentemente, tres meses antes de la implantación.

65 De este modo, se ha encontrado que el tratamiento tisular, de esta forma, proporciona un material con una microarquitectura intacta y un revestimiento celular que inhibe la calcificación *in vivo*, el crecimiento interno y la angiogénesis transparietal, proporcionando un microentorno para la adhesión de las células vivas trasplantadas. Además, la hemocompatibilidad, la elasticidad y la flexibilidad pueden variarse, según el uso final deseado, variando el proceso dentro del intervalo funcional.

La presente invención proporciona también un material de implante creado mediante el procedimiento anteriormente descrito.

Breve descripción de las figuras

5 Para que la presente invención pueda ser entendida más claramente, se describirá a continuación una forma de realización preferida, por ejemplo, haciendo referencia a las figuras adjuntas, en las que:

10 la figura 1 es una tinción fotomicrográfica de hematoxilina y eosina (H & E) de un uréter bovino procesado según el procedimiento de una forma de realización preferida de la presente invención, e implantado durante 127 días como un sustituto vascular en el modelo canino;

15 la figura 2 es una fotomicrografía H & E de un uréter bovino tratado según el procedimiento de la patente US nº 4.466.139, implantado durante 90 días como un sustituto vascular en el modelo canino; y

la figura 3 consiste en una fotomicrografía de una monocapa de células endoteliales de la vena safena humana, marcada anti CD31, unida a la superficie del flujo de un uréter bovino que se había tratado según el procedimiento de la forma de realización preferida.

20 Descripción detallada

Esta invención se basa en el descubrimiento sorprendente de que sometiendo material biológico y tejidos autogénico, alogénico y xenogénico biosintéticamente obtenidos mediante técnicas de ingeniería genética y material biológico o material biológico que se presenta naturalmente, a un aumento gradual en la concentración de un agente de reticulación tal como el glutaraldehído, y a un cambio gradual en el pH, desde el ácido al alcalino, combinado con un entorno fluido dinámico, preferentemente, un período de almacenamiento de, por lo menos, tres semanas, en un volumen al 50% volumen/volumen de etanol, y después de procesamiento, proporcionará una biomatriz no porosa con una microarquitectura intacta que es impermeable al crecimiento interior tisular y a la angiogénesis, inhibirá la calcificación *in vivo*, y será apropiado para la unión y la retención de células vivas trasplantadas. Además la flexibilidad y la elasticidad podrán controlarse mediante la penetración gradual del agente de reticulación en el material biológico o biosintético que no está unido o sólo unido por un extremo a una matriz compresible durante el procesamiento.

35 El material resultante, que posee una microarquitectura biológica durable, y una superficie que está revestida con células estabilizadas, por ejemplo, fibroblastos, sobre material tisular obtenido mediante ingeniería genética y uroteliotapizando uréteres de mamífero, posee afinidad por células vivientes trasplantadas y una capacidad para retenerlas bajo las condiciones biológicas requeridas. Las células vivientes trasplantadas interaccionarán más probablemente con las proteínas de la matriz extracelular (ECM) que se presentan de modo natural de estos revestimientos celulares mediante muchos sitios de unión celular, cada uno de los cuales puede tener más de un ligando proteico, que las ECM únicas o derivadas de ECM que se utilizan para revestir el poliéster y el material politetrafluoroetilénico, para ayudar en la adhesión de las células endoteliales. Se postula que los sitios de unión de ECM son todavía reconocidos y están disponibles para la unión celular mediante las células trasplantadas, incluso aunque la biomatriz se haya reticulado con glutaraldehído. En el caso del material biosintético, la interfase tisular biológica obtenida mediante ingeniería genética se presenta al entorno viviente, consistiendo el componente sintético sólo en una estructura endoesquelética y no estando nunca en contacto con estructuras vivientes.

50 Las características del material pueden variarse para aplicaciones específicas o para materiales específicos, cambiando los parámetros de tiempo, el porcentaje de glutaraldehído y el pH dentro del intervalo funcional. Por ejemplo, en el caso de tejido autogénico creado en el laboratorio, el glutaraldehído se utiliza para detener la proliferación tisular al nivel óptimo, mientras que en el tejido no autogénico, el glutaraldehído convierte al material en no inmunogénico. El grado de flexibilidad, elasticidad y durabilidad pueden variarse mediante el grado e intensidad de los procesos dinámicos.

55 Así, en un procedimiento para crear un material de implante tratando tejido autogénico, alogénico y xenogénico (tal como material biológico y tisular biosintético obtenido mediante ingeniería genética, y tejido biológico que se presenta de forma natural en configuraciones tubulares, en láminas planas y tridimensionales, para implantación quirúrgica) según una forma de realización preferida de la presente invención, el tejido que está en exceso se elimina, en primer lugar, del exterior tisular.

60 El tejido se une entonces a una matriz compresible, de forma que el movimiento del tejido sobre la matriz no se restrinja. En el caso del tejido tubular, éste no se deja unido a un alineador compresible.

65 El tejido que se monta se sitúa en un tambor que rota entre 10 y 20 rpm, preferentemente a 12 rpm o en un baño circulante a 25°C aproximadamente. Si se sitúa en un baño circulante, el tejido tubular puede unirse a un sistema de flujo tal que el líquido fluye a través de la luz a aproximadamente 300 ml por minuto.

Un agente de reticulación en forma de glutaraldehído se añade al tambor o al baño, cuya concentración se aumenta gradualmente desde 0% hasta un máximo predeterminado de 2,5% peso/vol., aumentando el pH de la solución desde 1,5 a 7,4 durante un período de 2,5 horas.

5 Una vez se ha alcanzado la concentración final predeterminada y el pH de la solución de glutaraldehído, el tejido se elimina del tambor rotatorio y se sitúa en un baño circulante de una solución recién preparada de glutaraldehído, que se mantiene entonces a una concentración de 2,5% peso/vol y a un pH de 7,4 a una temperatura de 25°C. Alternativamente, si el tejido ya se encuentra en el baño circulante, la solución se renueva como antes, y si está unido al sistema de flujo, éste se elimina y, como anteriormente, se reemplaza la solución. El tejido permanece en el
10 baño circulatorio durante 48 horas aproximadamente. El tejido se sumerge entonces en agua oxigenada al 2% en peso/vol, durante una hora.

El tejido (o, ahora, el material de implante) se esteriliza químicamente en una solución al 1% peso/vol de glutaraldehído y al 50% vol/vol de etanol durante, no menos de 18 horas. Alternativamente, puede esterilizarse en radiación gamma a entre 15 y 30 kJ·kg⁻¹ (kgys), pero a preferentemente 25 kJ·kg⁻¹ (kgys).

Opcionalmente, el tejido se incuba en glicina al 5% peso/vol durante 2 a 24 horas, pero preferentemente durante 12 horas, antes de la esterilización.

20 Finalmente, el tejido se guarda en etanol al 50% vol/vol durante, como mínimo, tres semanas, y preferentemente, tres meses

Ejemplo 1

25 El procedimiento para tratar el tejido según esta forma de realización, se aplicó a uréteres bovinos para utilizarse como prótesis vasculares, de la forma siguiente:

Se recogieron los uréteres bovinos bajo condiciones higiénicas y se transportaron al laboratorio a 4°C. Se bombeó solución fisiológica salina a través de la pelvis y del uréter. El extremo de la vejiga distal se taponó temporalmente, aumentándose la presión de la solución fisiológica salina en la luz, hasta 115 mm Hg. Se anotó el diámetro del uréter en el punto medio. Un alineador comprensible de silicona ligeramente más estrecho en diámetro que el uréter, y montado sobre un introductor de acero en forma de nariz roma, se insertó a traumáticamente en el uréter relleno de presión. El introductor metálico se retiró, eliminándose el tejido en exceso del exterior del uréter. Éste se unió entonces a la silicona en un extremo, permitiendo algún movimiento a lo largo de ésta. El uréter montado se dispuso en un tambor rodante a 12 rpm, a una temperatura de 21°C. La concentración de glutaraldehído se aumentó gradualmente desde 0 a 2,5% peso/vol, y el pH de la solución se aumentó desde 1,5 a 5,9 añadiendo tampón de fosfato durante 3 horas. Una vez que la concentración y el pH predeterminados de la solución de glutaraldehído se alcanzaron, el uréter se extrajo del tambor rotante y se situó en un baño circulante de glutaraldehído al 2,5% en peso/vol a un pH de 7,4 durante 24 horas.

40 El material se retiró del glutaraldehído, se enjuagó brevemente en solución fisiológica salina tamponada y se situó en etanol al 50% vol/vol. Se retiró el alineador comprensible y la integridad del material se evaluó determinando la presión.

45 Se esterilizó químicamente al material mediante un proceso de calentamiento en una solución de etanol al 50% vol/vol en glutaraldehído al 1%, durante no menos de 18 horas; hasta que se logró una temperatura uniforme de dicho material; el material se enjuagó de la solución de esterilización con etanol al 50% vol/vol y se guardó, durante por lo menos tres semanas, con etanol al 50% vol/vol.

50 Ejemplo 2

La inhibición *in vivo* de la calcificación se evaluó en perros galgos de la siguiente forma:

55 Unos injertos de un diámetro interno de 6 mm y de no menos de 10 cm de largo, preparados a partir de uréteres bovinos, según esta forma de realización, se implantaron en la posición aorto-iliaca con la aorta distal ligada a la próxima anastomosis. Los injertos de 4 mm de diámetro interno y de no menos que de 6 cm de longitud, se implantaron como injertos de interposición femoral.

60 No se utilizó terapia anticoagulante o antiplaquetaria.

Se tomaron angiogramas a intervalos predeterminados para comprobar la permeabilidad y detectar aneurismas, dilatación o estenosis. Los animales se sacrificaron a intervalos predeterminados cuando un injerto se cerraba o cuando el animal estaba sometido a tensión.

65 Finalmente, se llevaron a cabo exámenes macro- y microscópicos de los explantes.

Cuando la permeabilidad, la integridad parietal y luminal del material implantado procesado por esta invención se compararon con las expuestas en la patente US nº 4.466.139, no se pudo llegar a ninguna conclusión. Sin embargo, cuando se examinaron las prótesis microscópicamente, no se advirtió calcificación en 13 prótesis explantadas entre los meses 1 y 18 procesados mediante el procedimiento de esta forma de realización. La figura 1 es una tinción fotomicrográfica de hematoxilina y eosina (H&E) de un uréter bovino procesado según esta forma de realización y que se implantó durante 127 días como sustituto vascular en el modelo canino. En el explante, la pared del injerto está libre de microcalcificación. En la vista que se muestra, la superficie FS del flujo está a la derecha.

Al contrario, en el mismo período de tiempo, 11 de 25 prótesis (es decir, el 44%) que se procesaron según el procedimiento de la patente US nº 4.466.139, presentaban áreas de microcalcificación en la pared, primariamente en los sitios anastomóticos. La figura 2 consiste en una fotomicrografía (H&E) de un uréter bovino procesado tal como se realiza en la patente US nº 4.466.139 y que se implantó durante 90 días como un sustituto vascular en el modelo canino. En el explante se demostraron áreas de microcalcificación (Ca) en la pared en la anastomosis distal. El injerto era patente en el explante. En la vista que se muestra la superficie del flujo (FS) se encuentra a la derecha.

Ejemplo 3

La unión y adherencia de las células endoteliales humanas de la vena safena trasplantadas a la superficie del uréter bovino procesado, se evaluaron de la forma siguiente. Se aislaron y sembraron células endoteliales de la vena safena, humana, utilizando técnicas publicadas o modificadas.

Se aislaron células endoteliales de la vena safena humana a partir de segmentos varicosos invertidos de venas safena humanas obtenidos en el quirófano y transportados al laboratorio en soluciones salinas equilibradas Hanks, enfriadas (HBSS, Sigma Australia) que contenían ampicilina (100 µg/ml), gentamicina (50 µg/ml), anfotericina B (2,5 µg/ml), L-glutamina (2,5 mM) y bicarbonato sódico (0,23%), guardándose a 4°C. Los extremos venosos se unieron mediante seda quirúrgica. Se utilizó una técnica enzimática modificada de recuperación en la que las venas se sumergieron en 10 ml de 2 mg/ml de colagenasa (tipo Worthington IV, Sigma) durante 10 minutos a 37°C, agitándose verticalmente entonces en un agitador automático durante 1 minuto, a intervalos de 10 segundos. La suspensión celular recuperada se centrifugó a 800 g durante 5 minutos a 4°C, resuspendiéndose el sedimento celular resultante en 7,5 ml de M199 (Sigma Australia) que contenía suero de ternera o bovino fetal termoinactivado (FCS, CSL Australia), heparina (50 µg/ml, Sigma Australia) y un suplemento de células endoteliales (Sigma Australia). Las células se sembraron entonces sobre discos de Petri de 10 cm de diámetro revestidos con gelatina, e incubados a 37°C en un incubador con CO₂ al 5% y un 95% de aire humidificado (NuAire USA). Las células se desarrollaron hasta lograr la confluencia y se sometieron 3 veces a pases por un medio de cultivo.

Las células endoteliales se disociaron de las placas de cultivo tisular utilizando tripsina que contenía Tripsina al 0,25%/EDTA al 0,2% (Sigma Australia) durante 1 min. La actividad de la tripsina se inactivó con FCS al 20% y M199, centrifugándose la suspensión celular a 4°C, 800 g durante 5 minutos. El sedimento celular se volvió a suspender en medio de cultivo a una concentración celular de 1×10^6 células /ml.

Con la solución celular se rellenaron conductos de 4 mm de diámetro interno y de no menos de 10 cm de largo, haciéndose rotar (16 rotaciones/h) durante una hora en un incubador a 37°C. Después de llevar a cabo la siembra, los conductos se incubaron a 37°C bajo CO₂ al 5%. Después de 0, 24, 48 y 72 h de incubación, se tomaron muestras de los conductos (1 cm), para evaluar el porcentaje del cubrimiento celular y la densidad celular.

Los conductos sembrados con las células endoteliales de la vena safena humana, mostraron un cubrimiento confluyente superior al 50%, después de 72 horas de incubación. Los conductos se sometieron a un flujo *in vitro* con una media de 480 ml/min y una fuerza de cizallamiento de 114 µN/cm² (11,4 dinas/cm²) durante una hora, proporcionado por un sistema de flujo *in vitro* formado por una bomba monitora sanguínea (Gambro BMM10-1/3) para tres conductos sembrados conectada en paralelo a la línea externa de flujo.

La cubierta celular endotelial anterior y posterior al flujo se determinó después del marcaje de las células con anticuerpo anti CD31 (PECAM). Las células marcadas se detectaron con un sistema estreptavidina/biotina marcado con fosfatasa, con un cromógeno 5-bromo-4-cloro-3-inolilfosfato-nitroblue-tetrazolio (BCIP/NBT) (Dako Australia).

Resultados

Unas monocapas confluentes de células endoteliales estaban adheridas firmemente a la superficie biomatrical formada por células uroteliales, y permanecieron adheridas bajo una fuerza de cizallamiento *in vitro* de 114 µN/cm² (11,4 dinas/cm²). La figura 3 es una fotomicrografía de células marcadas anti CD3 detectadas con un sistema estreptavidina/biotina marcado con fosfatasa alcalina con un cromógeno BCIP/NBT. La figura 3 muestra una monocapa de células endoteliales de la vena safena (EC), unidas a la superficie de flujo de un uréter bovino, procesado según esta forma de realización, después de una hora de una fuerza de cizallamiento *in vitro* de 114 µN/cm² (11,4 dinas/cm²). En esta figura, la lámina propia está marcada LP, y el urotelio, URO.

Así, el procedimiento de esta forma de realización puede aplicarse a tejidos autogénicos, alogénicos y xenogénicos

- para crear material de implante para el hombre o los animales para reemplazar o aumentar estructuras, órganos o tejidos enfermos, ausentes o dañados. El procedimiento puede ajustarse para dotar de las características necesarias a tejidos biológicos o sintéticos para implantes de características específicas. El material resultante podría implantarse, por ejemplo, en el entorno cardiovascular, como un pequeño injerto de vaso coronario o una derivación vascular periférica, una válvula cardíaca de tejido artificial o una biobarrera de implante intravascular para evitar el crecimiento tisular interno y por tanto, la estenosis en los implantes intravasculares. La naturaleza no porosa e impermeable del tejido de material procesado inhibe el crecimiento interno del tejido y la angiogénesis a través de la pared, una de las principales causas de fallo en los injertos de derivación vascular sintéticos de pequeño diámetro. El material podría también implantarse en el entorno no cardiovascular, como por ejemplo, piel artificial, parche de reparación de hernias o ligamentos artificiales. La función del material puede potenciarse además añadiendo células vivas antes de la implantación. Por ejemplo, la adición de células endoteliales en la superficie del flujo del reemplazamiento de los vasos pequeños, proporcionará una función anticoagulante para evitar la coagulación sanguínea.
- 5
- 10
- 15 Pueden llevarse a cabo modificaciones en la invención, tal como resulta evidente para los expertos en la materia. Estas y otras modificaciones pueden realizarse sin apartarse del alcance de esta invención, cuya naturaleza puede discernirse a partir de la anterior descripción y de las figuras.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento para crear un material de implante a partir del tejido autogénico, alogénico o xenogénico de mamíferos, comprendiendo dicho tejido entre 20% y 80% de colágeno en peso, implicando dicho procedimiento:
- 10 tratar dicho tejido con un agente de reticulación durante un período de entre 30 minutos y 6 horas, que incluye variar gradualmente la concentración de dicho agente de reticulación a partir de una concentración inicial de 0% a 0,25% en peso/volumen a una concentración final de 0,5% a 5% en peso/volumen a lo largo de dicho período de tiempo, y variar gradualmente el pH de dicho agente de reticulación desde un pH inicial de 1 a 3 hasta un pH final de 5 a 8 a lo largo de dicho período de tiempo.
- 15 2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicho tejido comprende aproximadamente 40% en peso de colágeno.
3. Procedimiento según la reivindicación 1 o 2, en el que dicho período de tiempo es de aproximadamente 2,5 horas.
- 20 4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que incluye aumentar progresivamente la concentración de dicho agente de reticulación y de dicho pH a lo largo de dicho período de tiempo.
5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha concentración inicial es de aproximadamente 0%.
- 25 6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha concentración final es de aproximadamente 2,5% en peso/volumen.
7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho pH inicial es de aproximadamente 1,5.
- 30 8. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho pH final es de aproximadamente 7,4.
9. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho tejido es de origen humano, ovino, bovino y porcino.
- 35 10. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho tejido es material tisular biológico manipulado genéticamente, material tisular manipulado genéticamente sobre un soporte duradero o degradable en un animal sustituto o material tisular manipulado genéticamente mediante sistemas de cultivo de tejido en un laboratorio.
- 40 11. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que dicho tejido es un material biológico natural.
- 45 12. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho agente de reticulación es el glutaraldehído.
13. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que incluye el tratamiento de dicho material en un baño de líquido circulante o un tambor rotatorio.
- 50 14. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que dicho material es tubular y dicho procedimiento incluye las etapas siguientes:
- 55 tratar dicho tejido en un baño de líquido circulante o un tambor rotatorio; y
- unir dicho tejido a un sistema de flujo, de manera que el líquido fluye a través de la luz de dicho tejido a una velocidad de 200 ml por minuto a 400 ml por minuto.
- 60 15. Procedimiento según la reivindicación 14, en el que dicho tejido se une a un sistema de flujo, de manera que el líquido fluye a través de la luz de dicho tejido a un caudal de aproximadamente 300 ml por minuto.
- 65 16. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que incluye, después de dicho período de tiempo, el tratamiento de dicho tejido con un agente de reticulación a una concentración de 0,5% a 5% en peso/volumen y un pH de 5 a 8, a una temperatura de 20°C a 27°C, durante un periodo de tiempo adicional de entre 1 hora a 5 días.
17. Procedimiento según la reivindicación 16, que incluye, después de dicho período de tiempo, tratar dicho tejido

con un agente de reticulación a una concentración de aproximadamente 2,5% en peso/volumen.

- 5 18. Procedimiento según la reivindicación 16 o 17, que incluye, después de dicho período de tiempo, tratar dicho tejido con un agente de reticulación, a un pH de aproximadamente 7,4.
19. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18, que incluye, después de dicho período de tiempo, tratar dicho tejido con un agente de reticulación a una temperatura de aproximadamente 25°C.
- 10 20. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 19, en el que dicho período de tiempo es de aproximadamente 48 horas.
21. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que incluye el mantenimiento de dicho tejido y de la solución del agente de reticulación a una temperatura de 20°C a 27°C.
- 15 22. Procedimiento según la reivindicación 21, en el que dicho tejido y la solución del agente de reticulación se mantienen a una temperatura de aproximadamente 25°C.
23. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que incluye el mantenimiento de la configuración de dicho tejido durante el tratamiento mediante una matriz compresible.
- 20 24. Procedimiento según la reivindicación 23, en el que dicho tejido no se une o se une en sólo un extremo para permitir el movimiento de dicho material sobre dicha matriz.
- 25 25. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que incluye la esterilización de dicho tejido después de que dicho tejido haya sido reticulado.
26. Procedimiento según la reivindicación 25, en el que dicho tejido es esterilizado químicamente.
27. Procedimiento según la reivindicación 25 o 26, que incluye la inmersión de dicho tejido antes de la esterilización, en agua oxigenada a aproximadamente 2% en peso/volumen, durante entre 30 minutos y 1,5 horas.
- 30 28. Procedimiento según la reivindicación 27, en el que dicho tejido se sumerge antes de la esterilización en agua oxigenada a aproximadamente 2% peso/volumen durante aproximadamente 1 hora.
- 35 29. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 25 a 28, que incluye la esterilización de dicho tejido mediante irradiación gamma en $15 \text{ kJ}\cdot\text{kg}^{-1}$ (kilograys) a $30 \text{ kJ}\cdot\text{kg}^{-1}$ (kilograys).
- 40 30. Procedimiento según la reivindicación 29, en el que dicho tejido se esteriliza mediante irradiación gamma en $25 \text{ kJ}\cdot\text{kg}^{-1}$ (kilograys).
31. Procedimiento según la reivindicación 29 o 30, que incluye la incubación de dicho tejido en un 5% en peso/volumen de glicina antes de la esterilización mediante irradiación gamma, durante 2 a 24 horas.
- 45 32. Procedimiento según la reivindicación 31, en el que dicho tejido se incuba en un 5% peso/volumen de glicina antes de la esterilización mediante irradiación gamma, durante aproximadamente 12 horas.
33. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que incluye guardar dicho material en etanol al 50% volumen/volumen durante un mínimo de tres semanas anteriores a la implantación.
- 50 34. Material de implante creado mediante el procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 33.

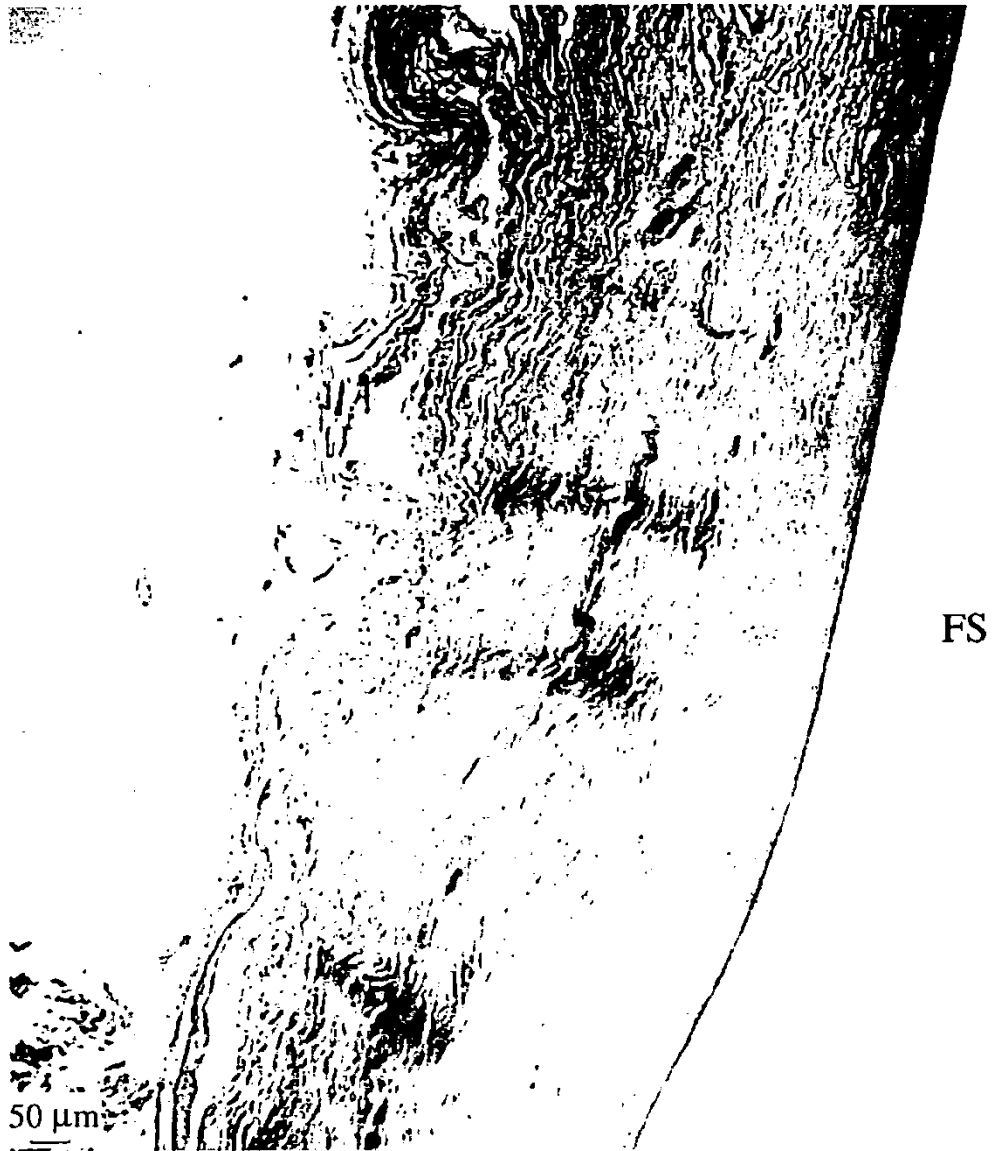


Figura 1

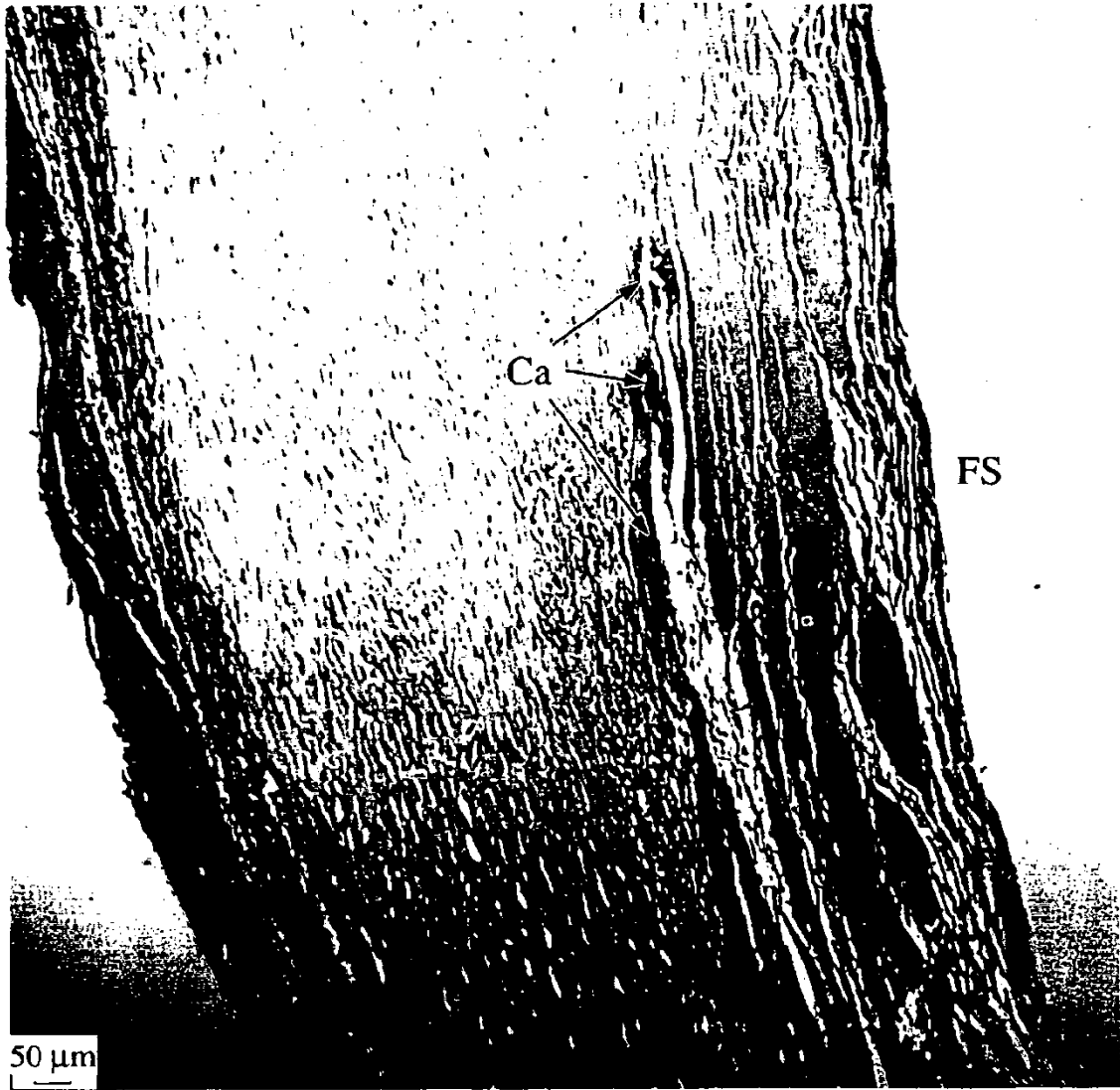


Figura 2

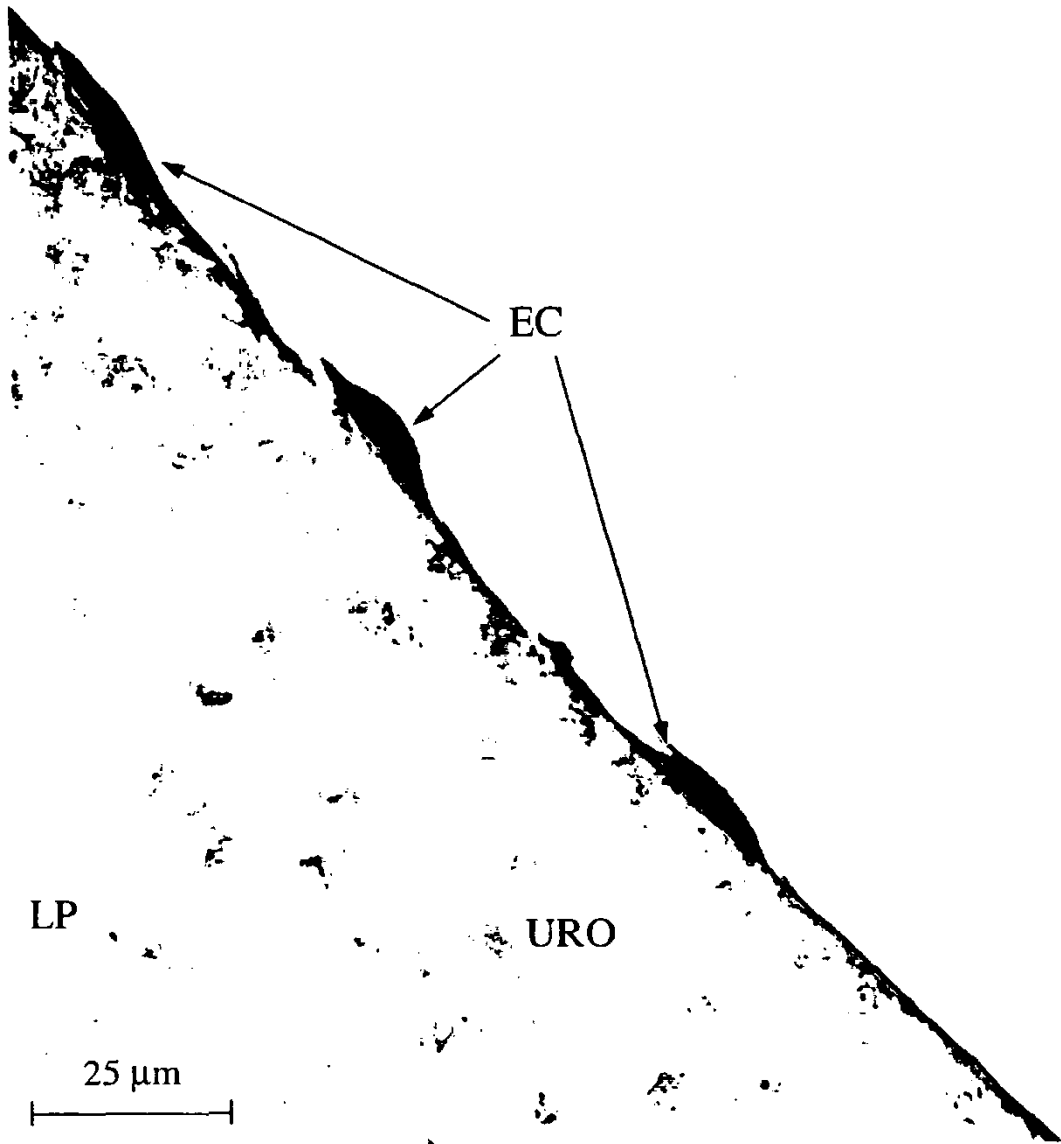


Figura 3