

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 426 668**

51 Int. Cl.:

A61L 27/24 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.03.1996 E 05077508 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.05.2013 EP 1623681**

54 Título: **Injertos de ICL no antigénicos reticulados con ácido peracético**

30 Prioridad:

07.04.1995 US 417868

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

24.10.2013

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**CARR, JR., ROBERT M;
TERMIN, PAUL L;
YOUNG, JANET HARDIN y
CONDON, KIMBERLIE D**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 426 668 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

Injertos de ICL no antigénicos reticulados con ácido peracético.

Campo de la invención

5 La invención se refiere a prótesis biológicas para implantes. La presente invención es una prótesis de tejido biocompatible, resiliente y no antigénica que se puede someter a estudio técnico para dar lugar a una variedad de formas y se puede usar para reparar, aumentar o restituir tejidos y órganos de mamíferos. La prótesis se degrada gradualmente y es reestructurada por las células hospedadoras que restituyen la prótesis implantada para restaurar la estructura y la función y resulta útil para la reparación y reconstrucción de órganos.

Breve Descripción de los Antecedentes de la Invención

10 A pesar de la creciente sofisticación de la tecnología médica, la reparación y restitución de tejidos dañados sigue siendo un problema frecuente, costoso y serio en sanidad. Las prótesis que se implantan actualmente están formadas por un número de materiales naturales tratados y sintéticos. El material protésico ideal debe ser químicamente inerte, no cancerígeno, capaz de resistir tensión mecánica, susceptible de ser fabricado con la forma requerida y apto para esterilización, no modificable físicamente por medio de los fluidos de los tejidos, sin provocar
15 una reacción inflamatoria o frente a cuerpo extraño, inducir un estado de hipersensibilidad o, en algunos casos, favorecer adhesiones viscerales (Jenkins S.D., et al., *Surgery* 94(2):392-398, 1983).

Por ejemplo, los defectos de pared corporales que no se pueden cerrar con tejido autógeno debidos a traumatismos, necrosis u otras causas requieren reparación, aumento o restitución con una malla metálica sintética. En el refuerzo o la reparación de defectos de pared abdominal, se han usado varios materiales protésicos, incluyendo una malla de
20 tántalo, malla metálica de acero inoxidable, DACRON®, ORLON®, FORTISAN®, nailon, polipropileno con forma de malla (MARLEX®), politetrafluoroetileno expandido microporoso (GORTE-TEX®), caucho de silicona reforzado con dacron (SILASTIC®), poliglactina 910 (VICRYL®), poliéster (MERSILENE®), ácido poliglicólico (DEXON®), colágeno dérmico de oveja procesado (PSDC®), pericardio bovino reticulado (PERI-GUARD®) y duramadre humana conservada (LYODURA®). Ningún material protésico ha conseguido aceptación universal.

25 Las principales ventajas de las mallas metálicas sintéticas son su carácter inerte, resistencia a infecciones y poder estimulador de fibroplastia. Su principal desventaja es la fragmentación que tiene lugar al año de implantación así como también la pérdida de maleabilidad. Las mallas metálicas sintéticas tienen la desventaja de ser fácilmente moldeadas y, excepto el nailon, conservan su resistencia a la tracción en el cuerpo. Su principal desventaja es la falta de naturaleza inerte, susceptibilidad a infecciones y su interferencia con la cicatrización de heridas.

30 Las mallas metálicas sintéticas absorbibles tienen la ventaja de no permanecer en el punto de implantación, pero con frecuencia tienen la desventaja de perder resistencia mecánica, debido a la disolución por parte del hospedador, antes de la increscencia tisular y celular apropiada.

El material más ampliamente usado para la restitución de pared abdominal y para el refuerzo durante las reparaciones de hernias es MARLEX®; no obstante, varios investigadores han informado de que con la contracción
35 de cicatrices, los injertos de malla metálica de polipropileno se distorsionan y se separan del tejido normal circundante en una espira de tejido fibroso. Otros han informado de adhesiones desde moderadas a graves cuando se usa MARLEX®.

Actualmente se piensa que GORE-TEX® es el polímero químicamente más inerte y se ha descubierto que provoca una reacción mínima frente a cuerpos extraños cuando se produce la implantación. Existe un problema principal con
40 el uso de politetrafluoroetileno en heridas contaminadas ya que no permite ningún drenaje macromolecular, lo cual limita el tratamiento de infecciones.

En primer lugar, el colágeno ha ganado utilidad como material para uso médico debido a que es un sustituto protésico biológico y natural de suministro abundante a partir de varias fuentes de origen animal. Los objetivos de
45 diseño para los materiales protésicos de colágeno fueron los mismos que para las prótesis de polímero sintético; la prótesis debería persistir y actuar esencialmente como material inerte. Teniendo presentes estos objetivos, se han desarrollado métodos de purificación y reticulación para mejorar la resistencia mecánica y disminuir la tasa de degradación del colágeno (Chvapil, M., et al. (1977) *J. Biomed. Mater. Res.* K 11: 297-314; Kligman, A.M., et al. (1986). *J. Dermatol. Surg. Oncol.* 12 (4): 351-357; Roe, S.C., et al (1990). *Artif. Organs.* 14:443-448. Woodroff, E.A. (1978). *J. Bioeng.* 2: 1-10). Agentes de reticulación originalmente usados incluyen glutaraldehído, formaldehído, poliepóxidos, diisocianatos (Borick P.M., et al. (1964) *J. Pharm. Sci.* 52: 1273-1275) y azidas de acilo. Se ha estudiado el colágeno de oveja dérmico procesado como implante para una variedad de aplicaciones. Antes de la implantación, se curte típicamente el colágeno dérmico de oveja con hexametildiisocianato (van Wachem, P.B., et al., *Biomaterials* 12 (Marzo): 215-223, 1991) o glutaraldehído (Rudolph, V.J., et al., *Ann. Thorac Surg* 52: 821-825, 1991). También se usó glutaraldehído, probablemente el agente de reticulación más ampliamente usado y
50 estudiado, como agente de esterilización. En general, estos agentes de reticulación generaron material de colágeno que se pareció más a un material sintético que a un tejido biológico natural, tanto mecánica como biológicamente.

La reticulación de colágeno nativo disminuye el carácter antigénico del material (Chvapil, M. (1980) Reconstitued collagen, pp. 313-324. In: Viidik, A., Vuust, J. (eds), Biology of Collagen, Academic Press, Londres; Harjula, A., et al (1980) *Ann Chir, Gynaecol.* 69: 256-262) por medio de unión de los epítomos antigénicos que los convierten en inaccesibles para la fagocitosis o irreconocibles por parte del sistema inmunitario. No obstante, los datos de los estudios que usan glutaraldehído como agente de reticulación son difíciles de interpretar ya que también se sabe que el tratamiento con glutaraldehído genera residuos citotóxicos (Chvapil, M. (1980), *supra*; Cooke, A., et al. (1983) *Br. J. Exp. Path.* 64: 172-176; Speer, D.P., et al (1980) *J. Biomed. Mater. Res.* 14: 753-764; Wiebe, D., et al (1988) *Surgery* 104: 26-23). Por tanto, es posible que el menor carácter antigénico asociado a la reticulación de glutaraldehído sea debido a la citotoxicidad no específica más que a un efecto específico sobre los determinantes antigénicos. El tratamiento con glutaraldehído es una manera aceptable de aumentar la durabilidad y de reducir el carácter antigénico de los materiales de colágeno, en comparación con los que no están reticulados. No obstante, el glutaraldehído que reticula los materiales de colágeno limita en gran medida la capacidad corporal para reestructurar la prótesis (Roe, S.C., et al (1990), *supra*).

Todos los problemas anteriores asociados a los materiales tradicionales provienen, en parte, de la incapacidad del cuerpo para reconocer cualquier implante como "inerte". Aunque de origen biológico, la modificación química del colágeno tiende a convertirlo en "extraño". Para mejorar el comportamiento a largo plazo de los dispositivos de colágeno implantados, es importante conservar muchas de las propiedades de los tejidos de colágeno natural. En este enfoque de "ingeniería tisular", se diseña la prótesis no como implante permanente sino como almacén o patrón para la regeneración o reestructuración. Estos principios de diseño de ingeniería tisular incorporan un requisito de restitución tisular isomorfa, en el que tiene lugar la biodegradación de la matriz del implante a aproximadamente la misma velocidad funcional de restitución tisular (Yannas, I.V. (1995) *Regeneration Templates*, pp. 1619-1635. In: Brozino, J.D. (ed). *The Biomedical Engineering Handbook*, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida).

Cuando se implanta dicha prótesis, su requisito mecánico y/o biológico debería servir inmediatamente como parte corporal. La prótesis también debería proporcionar una formación celular apropiada al hospedador por medio de increscencia de las células mesenquimales, y al mismo tiempo, a través de restitución tisular isomorfa, ser restituida por el tejido del hospedador, siendo el tejido del hospedador un análogo funcional del tejido original. Con el fin de proporcionar esto, el implante no debe suscitar una respuesta inmunológica humoral importante o ser citotóxico o pirógeno para favorecer la curación y el desarrollo de tejido nuevo.

Se han investigado ampliamente las prótesis o el material protésico procedente de tejido de explante procedente de mamíferos para la reparación quirúrgica o para la restitución de órganos o tejidos. Se procesa típicamente el tejido para retirar los componentes celulares dejando una matriz tisular natural. También se ha investigado el procesado adicional, tal como reticulación, desinfección o conformación con diferentes formas. La patente de Estados Unidos N.º. 3.562.820 de Braun describe formas de prótesis de banda y lámina, tubulares, generadas a partir de sub-mucosa adherida por medio del uso de una pasta de aglutinante tal como pasta de fibra de colágeno o mediante el uso de un medio ácido o alcalino. La patente de Estados Unidos N.º. 4.502.159 de Woodroof proporciona una prótesis tubular formada a partir de tejido pericárdico, en la cual se limpia el tejido de grasa, fibras y fragmentos extraños y posteriormente se coloca en una disolución salina de tampón de fosfato. A continuación se coloca el tejido pericárdico sobre un mandril y posteriormente se cierra la línea de unión por medio de sutura y posteriormente se somete el tejido a reticulación. La patente de Estados Unidos N.º. 4.703.108 de Silver proporciona una matriz biodegradable a partir de disoluciones de colágeno solubles o dispersiones de colágeno insolubles que se secan por medio de congelación y posteriormente se reticulan para formar una matriz de colágeno porosa. La patente de Estados Unidos N.º. 4.776.853 de Klement proporciona un proceso para preparar material biológico para implante que incluye extraer las células usando una disolución hipertónica a un pH alcalino, seguido de una disolución de alto contenido en sal que contiene detergente; someter el tejido a una disolución de enzima libre de proteasa y posteriormente a una disolución aniónica de detergente. La patente de Estados Unidos N.º. 4.801.299 de Brendel describe un método para procesar estructuras completas de origen corporal para implantes, por medio de tratamiento del tejido de procedencia corporal con detergentes, con el fin de retirar las estructuras celulares, ácidos nucleicos y lípidos, con el fin de dejar una matriz extracelular que posteriormente se esteriliza antes de la implantación. La patente de Estados Unidos N.º. 4.902.508 de Badylak describe una composición de injerto tisular de tres capas procedente de intestino delgado que comprende túnica submucosal, capa muscular de la mucosa y estrato compacto de la túnica mucosal. El método para obtener la composición de injerto tisular comprende someter a abrasión el tejido intestinal seguido de tratamiento con una disolución de antibiótico. La patente de Estados Unidos N.º. 5.336.616 de Livesey describe un método para procesar tejidos biológicos por medio de tratamiento del tejido con el fin de retirar células, tratamiento con una disolución citoprotectora, congelación, rehidratación y finalmente inoculación con células para repoblar el tejido. La patente de Estados Unidos N.º. 5.281.422 de Badylak describe un injerto tisular de multicapa que incluye dos capas superpuestas de material de colágeno.

Un objetivo continuo de los investigadores consiste en desarrollar prótesis implantables que se puedan usar satisfactoriamente para sustituir o restituir tejidos de mamíferos, tales como defectos de pared abdominal y vasculatura.

Sumario de la Invención

La invención es como se explica en las reivindicaciones.

La presente invención soluciona las dificultades de los materiales actualmente disponibles y proporciona un dispositivo protésico para su uso en la reparación, aumento o restitución de tejidos dañados y órganos. La presente invención va destinada a un material protésico, que comprende dos o más capas unidas y superpuestas de túnica submucosal de intestino delgado, en el que la prótesis es hidrocloreuro de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida reticulada y ácido peracético esterilizado. La prótesis, cuando se implanta en un hospedador mamífero, experimenta biodegradación controlada acompañada de una restitución adecuada de las células vivas, o formación de tejido nuevo, de manera que tiene lugar la reestructuración y restitución de la prótesis implantada original por parte de las células y tejidos del hospedador. La prótesis de la presente invención, un material para reparación tisular, comprende un material de colágeno no antigénico procedente de un tejido de mamífero. El material de colágeno es capaz de formar capas y de unirse para formar láminas de multi-capas, tubos o prótesis con formas complejas. Las capas de colágeno unidas de la invención son estructuralmente estables, plegables, semi-permeables y aptas para sutura.

Por tanto, es un objetivo de la presente invención proporcionar un material textil para reparación tisular que no exhiba muchos de los inconvenientes asociados a muchos de los injertos usados clínicamente en la actualidad.

Otro objetivo es proporcionar un material protésico que permita facilitar la increscencia tisular y/o la regeneración del órgano en el punto de implantación, que sea un material estéril, no pirógeno y no antigénico, procedente de un tejido de colágeno de mamífero. Las prótesis preparadas a partir de este material, cuando se injertan en un paciente u hospedador receptor, no suscitan una respuesta inmunológica humoral importante. Las prótesis están formadas a partir de material que, de manera concomitante, experimenta bio-reestructuración controlada, que tiene lugar con restitución apropiada con células vivas, de manera que la prótesis original implantada es reestructurada por parte de las células vivas del paciente para formar un tejido u órgano regenerado.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar un método simple y repetible para la fabricación de un material textil de reparación tisular.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar un método para el uso de un nuevo material textil de reparación tisular de multi-finalidad para indicaciones de auto-injerto, aloinjerto y heteroinjerto.

Otro objeto es proporcionar un nuevo material textil de reparación tisular que pueda implantarse usando técnicas quirúrgicas convencionales.

Descripción Detallada de la Invención

La presente invención está destinada a prótesis tisulares sometidas estudio técnico que, cuando se implantan en un hospedador de mamífero, pueden servir como parte corporal de funcionamiento de reparación, aumento o restitución, o estructura tisular, y experimentar biodegradación controlada que tiene lugar de manera concomitante con la reestructuración por parte de las células del hospedador. De este modo, la prótesis de la presente invención, en sus diferentes realizaciones, tiene propiedades duales: en primer lugar, funciona como parte corporal de sustituto, y en segundo lugar, al tiempo que funciona como parte corporal de sustituto, funciona como matriz de reestructuración para la increscencia de las células del hospedador. Con esta finalidad, se desarrolló el material protésico de la presente invención, un material textil de reparación tisular, que comprendía un tejido de colágeno procedente de un mamífero que es convertido en no antigénico y es capaz de unirse a sí mismo o a otro material. Aunque las prótesis se ilustran por medio de la construcción de diferentes dispositivos y estructuras, la invención no se encuentra limitada a los mismos. Debe apreciarse que es preciso seleccionar el diseño del dispositivo en su forma y espesor dependiendo de la indicación final de la estructura.

En la realización preferida, el material de colágeno a partir del cual se forman las prótesis, o la propia prótesis, es convertido en estéril, no pirógeno y no antigénico. La prótesis, cuando se injerta en un hospedador o paciente receptor, no suscita una respuesta inmunológica humoral importante. Un nivel de respuesta aceptable es aquel que no demuestre un aumento significativo del valor de anticuerpos frente a proteínas tisulares de colágeno a partir de los niveles de valor de línea base, cuando se obtiene una muestra de suero sanguíneo del receptor y se somete a ensayo de anticuerpos frente a proteínas en extractos de tejido de colágeno.

El material de reparación tisular o la propia prótesis es convertido en no antigénico, al tiempo que mantiene su capacidad para que la prótesis experimente, de manera concomitante, bio-reestructuración controlada que ocurre con la restitución apropiada con células vivas. El método de preparación de un material de colágeno protésico no antigénico comprende la desinfección del material por medio de un método para evitar la degradación microbiana del material, por medio del uso de una disolución que comprende ácido peracético; y reticular el material de colágeno desinfectado con el agente de reticulación, hidrocloreuro de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC).

Se usa la túnica submucosal del intestino delgado procedente del cuerpo del mamífero para preparar dicho material de colágeno. Se separa la túnica submucosal, o se deslaminada, a partir de las otras capas de intestino delgado. Esta capa es denominada en lo sucesivo como Capa de Colágeno Intestinal ("ICL"). Además, las capas de colágeno del dispositivo protésico pueden ser del mismo material de colágeno, tal como dos o más capas de ICL, o de materiales de colágeno diferentes, tal como dos o más capas de ICL y una o más capas de fascia lata.

Se limpia mecánicamente la submucosa o la capa de colágeno intestinal (ICL), procedente de una fuente de mamífero, típicamente cerdo, vaca u oveja, comprimiendo la materia prima entre rodillos opuestos para retirar las capas musculares (túnica muscular) y la mucosa (túnica mucosal). La túnica submucosal del intestino delgado es más dura y rígida que el tejido circundante, y los rodillos comprimen los componentes más blandos de la submucosa. En los ejemplos siguientes, se recogió mecánicamente ICL procedente de intestino delgado de cerdo usando una máquina limpiadora de intestino Bitterling.

Dado a que la submucosa sometida a limpieza mecánica puede conservar ciertos fragmentos no apreciables a simple vista que afecten a la consistencia de las propiedades mecánicas, se puede limpiar químicamente la submucosa para retirar los fragmentos y otras sustancias, diferentes de colágeno, por ejemplo, por medio de inmersión en disoluciones tampón a 4 °C, o por medio de inmersión con NaOH o tripsina, u otras técnicas de limpieza conocidas. También se pueden incluir en el método de limpieza química medios alternativos que emplean detergentes tales como TRITON X-100TM (Rohm y Haas) o dodecilsulfato de sodio (SDS); enzimas tales como dispasa, tripsina o termolisina; y/o agentes quelantes tales como ácido etilendiaminotetracético (EDTA) o ácido etilbis(oxietilnitrilo)tetracético (EGTA).

Tras la limpieza, se debería descontaminar (ICL) o desinfectar con el uso de disoluciones diluidas de ácido peracético como se describe en la patente de Estados Unidos N°. 5.460.962. La descontaminación o la desinfección del material se lleva a cabo para evitar la degradación de la matriz de colágeno por parte de bacterias o enzimas proteolíticas. Se conocen otras disoluciones desinfectantes y sistemas para su uso con colágeno en la técnica, y se pueden usar con la condición de que, tras el tratamiento de desinfección, no exista interferencia alguna con la capacidad del material para ser reestructurado.

El dispositivo protésico de la presente invención tiene dos o más capas de colágeno superpuestas que se unen juntas. Según se usa en la presente memoria, "capas de colágeno unidas" significa formadas por dos o más capas del mismo material de colágeno o de un material de colágeno diferente, tratado de manera que las capas se superpongan unas con otras y se mantengan juntas de manera suficiente por medio de auto-laminado. Se puede conseguir la unión de las capas de colágeno de acuerdo con un número de formas diferentes: por medio de soldadura térmica o unión, adhesivos, unión química o suturas.

En un método preferido, y en los ejemplos siguientes, se desinfecta el ICL con una disolución de ácido peracético a una concentración entre aproximadamente 0,01 y 0,3% en v/v en agua, preferentemente de aproximadamente 0,1%, a un pH neutralizado entre aproximadamente pH 6 y pH 8 y se almacena hasta el uso a aproximadamente 4 °C en una disolución salina de tampón de fosfato (PBS). Se corta longitudinalmente y se alisa sobre una placa plana, y sólida. Posteriormente, se superponen las capas unas sobre otras. Se coloca una segunda placa plana sólida sobre la parte superior de las capas y se sujetan dos placas juntas de manera firme. A continuación, el aparato completo, las placas sujetas y las capas de colágeno, se calientan durante un tiempo y bajo las condiciones suficientes para llevar a cabo la unión de las capas de colágeno juntas. La cantidad aplicada de calor debería ser suficientemente elevada para permitir la unión del colágeno, pero no demasiado elevada como para provocar que el colágeno se desnaturalice de manera irreversible. El tiempo de calentamiento y unión dependerá del tipo de capa de material de colágeno usado, contenido de humedad y espesor del material, y del calor aplicado. Un intervalo típico de calor es desde aproximadamente 50 °C a aproximadamente 75 °C, más típicamente desde 60 °C hasta 65 °C y de la manera más típica de 62 °C. Un intervalo típico de tiempo será desde aproximadamente 7 minutos hasta aproximadamente 24 horas, típicamente de aproximadamente una hora. Se puede adivinar de manera sencilla la cantidad de calor y el tiempo durante el cual se aplica calor, por medio de experimentación rutinaria, variando los parámetros de calor y tiempo. Se puede conseguir la etapa de unión en un horno convencional, aunque se pueden usar otros aparatos o aplicaciones de calor incluyendo, pero sin limitarse a, un baño de agua, energía láser, o conducción térmica eléctrica. Inmediatamente después del calentamiento y de la unión, se enfría el aparato, al aire o en un baño de agua, a un intervalo entre temperatura ambiente a 20 °C y 1 °C. El enfriamiento rápido, la inactivación programada, detiene la acción de calentamiento de manera inmediata o casi inmediata. Para lograr la presente etapa, se puede enfriar el aparato, típicamente en un baño de agua, con una temperatura preferentemente entre aproximadamente 1 °C y aproximadamente 10 °C, del modo más preferido de aproximadamente 4 °C. Aunque se pueden usar temperaturas de enfriamiento por debajo de 1 °C, hay que tener cuidado para no congelar las capas de colágeno, lo que puede provocar un daño estructural. Además, se pueden usar temperaturas por encima de 10 °C en la inactivación, pero si la temperatura de inactivación es demasiado elevada, entonces no es posible detener el calentamiento en el tiempo con el fin de fijar de manera suficiente las capas de colágeno en su configuración actual.

Posteriormente, la estructura de material protésico o de multi-capas se reticula con hidrocioruro de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC). La reticulación del dispositivo protésico unido proporciona resistencia y cierta durabilidad al dispositivo para mejorar las propiedades de manipulación. La disolución de reticulación que contiene EDC y agua también puede contener acetona. En una realización preferida, se añade sulfo-N-hidroxisuccinimida al agente de reticulación (Staros, J.V. *Biochem*, 21, 3950-3955, 1982).

Se lleva a cabo un método que comprende la desinfección con ácido peracético y la posterior reticulación con EDC del material de ICL, para reducir el carácter antigénico del mismo. Se reducen o se retiran las proteínas inmunoreactivas presentes en el ICL no esterilizado y no reticulado, o se modifican sus epítomos de manera que no susciten más una respuesta inmunológica humoral importante. No obstante, los implantes de injerto de este material

muestran una respuesta inflamatoria transitoria inicial como resultado de una respuesta de cicatrización de heridas. Según se usa en la presente memoria, la expresión "no antigénica" significa que no suscita una respuesta inmunológica humoral importante en el hospedador o paciente en el cual se implanta la prótesis. Un nivel de respuesta aceptable es uno que no demuestre un aumento significativo del valor de anticuerpos frente a proteínas tisulares de colágeno a partir de los niveles de valor de línea base, cuando se obtiene una muestra de suero sanguíneo del receptor de la prótesis y se somete a ensayo de anticuerpos frente a proteínas en extractos de tejido de colágeno. Para un paciente u hospedador que no presenta sensibilidad previa frente a las proteínas tisulares de colágeno, el valor de anticuerpos de suero preferido es de 1:40 o menos.

Preferentemente, las prótesis de la realización preferida también son no pirógenas. Una prótesis que sea pirógena, cuando es injertada en un paciente u hospedador receptor, provoca una reacción febril en el paciente, afectando a la capacidad de reestructuración de la prótesis. Los pirógenos se evalúan por medio de inyección intravenosa de una disolución que contiene una muestra de material en tres conejos de ensayo. Se coloca una sonda de detección de temperatura en el recto de los conejos para controlar los cambios de temperatura. Si existe un aumento de temperatura en cualquiera de los conejos por encima de 0,5 °C, entonces se continúa el ensayo para esa muestra en cinco conejos más. Si no más que tres de los ocho conejos muestran aumentos individuales de temperatura de 0,5 °C o más y la suma de los ocho aumentos individuales de temperatura máxima no supera 3,3 °C, el material objeto de examen satisface los requisitos de ausencia de pirógenos. (Pyrogen Test (151), pp. 1718-1719. In: The United States Pharmacopeia (USP) 23 The United States Pharmacopeial Convention, Inc., Rockville, MD).

El material textil de reparación de tejidos de la presente invención, que funciona como parte de cuerpo de sustitución, puede ser plano, tubular o de geometría compleja. La forma del material textil de reparación tisular se decide a partir del uso deseado. De este modo, cuando se forman las capas de unión de la prótesis de la presente invención, se puede adaptar el molde o placa para acomodar la forma deseada. Se puede implantar el material textil de reparación tisular para reparar, aumentar o restituir órganos enfermos o dañados, tales como defectos de pared abdominal, pericardio, hernias, y otros órganos diferentes y estructuras que incluyen, pero sin limitarse, hueso, periostio, pericondrio, discos intervertebrales, cartílago articular, dermis, epidermis, intestino, ligamentos y tendones. Además, se puede usar el material textil de reparación tisular como parche vascular o intra-cardíaco, o como válvula cardíaca de sustitución.

Se pueden usar las láminas planas, por ejemplo, para actuar de soporte de órganos con prociencia o con hipermovilidad, por medio del uso de una lámina que actúa como eslinga para los órganos. Esta eslinga puede sujetar órganos tales como la vejiga o el útero.

Se pueden usar los injertos tubulares, por ejemplo, para restituir cortes transversales de órganos tubulares tales como vasculatura, esófago, traquea, intestino y conductos de Falopio. Estos órganos tienen una forma tubular básica con una superficie externa y una superficie de luz.

Además, se pueden conformar láminas planas y estructuras tubulares juntas para formar una estructura compleja con el fin de restituir o aumentar las válvulas cardíacas o venosas.

Además de funcionar como parte corporal de sustituto o soporte, la segunda función de la prótesis es la de ser una matriz o armazón para la bio-reestructuración. La "bio-reestructuración" se usa en el presente documento para referirse a la producción de colágeno estructural, vascularización y formación de epitelio por medio de la increscencia de células de hospedador, a una tasa funcional aproximadamente igual a la tasa de biodegradación de la prótesis implantada por parte de las células de hospedador y enzimas. El material textil de reparación tisular conserva las características de la prótesis implantada originalmente al tiempo que es reestructurado por parte del hospedador en el interior de todo, o considerablemente todo, el tejido del hospedador, y como tal, resulta funcional como análogo del tejido al que repara o restituye.

Las propiedades mecánicas incluyen una integridad mecánica tal que el material textil de reparación tisular resista la deformación plástica durante la bio-reestructuración, y de manera adicional sea plegable y apto para sutura. El término "plegable" significa buenas propiedades de manipulación. La expresión "apto para sutura" significa que las propiedades mecánicas de la capa incluyan retención de la sutura que permita que las agujas y los materiales de sutura pasen a través del material protésico en el momento de la sutura de la prótesis para la fijación a las secciones de tejido nativo, un proceso conocido como anastomosis. Durante la sutura, dichas prótesis no se deben desgarrar como resultado de las fuerzas de tracción aplicadas sobre las mismas por la sutura, ni se deben desgarrar cuando se anuda la sutura. La aptitud de sutura del material textil de reparación de tisular, es decir, la capacidad de la prótesis para resistir el desgarro cuando se produce la sutura, está relacionada con la resistencia mecánica intrínseca del material protésico, el espesor del injerto, la tensión aplicada sobre la sutura y la velocidad con la que se cierra el nudo.

Según se usa en la presente memoria, la expresión "sin deformación plástica" significa que las propiedades bio-mecánicas de la prótesis confieren durabilidad de manera que la prótesis no se estira, dilata o expande más allá de los límites normales tras la implantación. Como se describe a continuación, el estiramiento total de la prótesis implantada de la presente invención se encuentra dentro de los límites aceptables. La prótesis de la presente invención adquiere resistencia frente al estiramiento como función de la bio-reestructuración celular posterior a la

implantación por medio de sustitución del colágeno estructural por parte de las células del hospedador a una velocidad mayor que la pérdida de resistencia mecánica de los materiales implantados debido a la biodegradación y a la reestructuración. El material textil de reparación tisular de la presente invención es "semi-permeable", incluso cuando ha sido reticulado. La semi-permeabilidad permite la increscencia de las células del hospedador para la reestructuración o para la deposición de la capa de colágeno. La calidad "no porosa" de la prótesis evita el paso de fluidos que se pretende retener por medio de la implantación de la prótesis. Por el contrario, se pueden formar poros en la prótesis si se necesita calidad para la aplicación de la prótesis.

La integridad mecánica de la prótesis de la presente invención es también su capacidad para experimentar cubrición o plegado, así como la capacidad para cortar o recortar la prótesis obteniendo un borde limpio sin deslaminado o deshilachado de los bordes de la estructura.

De manera adicional, en otra realización de la invención, se pueden incluir fibras de colágeno cortadas mecánicamente entre las capas de colágeno, que añaden volumen a la estructura y que proporcionan un mecanismo para la tasa diferencial de reestructuración por parte de las células del hospedador. Se pueden alterar las propiedades de la estructura que incorpora las fibras por medio de variaciones de la longitud y el diámetro de las fibras; variaciones de la proporción de fibras usadas y reticulación completa o parcial de las fibras. La longitud de las fibras puede variar desde 0,1 cm hasta 5,0 cm.

En otra realización de la invención, se pueden incorporar hilos de colágeno, tales como los descritos en la patente de Estados Unidos N°. 5.378.469, en el material textil de reparación tisular de multicapa para el refuerzo o para diferentes tasas funcionales de reestructuración. Por ejemplo, se puede aplicar una hélice o "torsión" de una trenza de hilo de colágeno de 20 a 200 denier a la superficie del material textil de reparación tisular. El diámetro de la hélice o del hilo de colágeno puede variar desde 50 a 500 micras, preferentemente de 100 a 200 micras. De este modo, las propiedades de la capa de material textil de reparación tisular pueden variar por medio de la geometría del hilo usado para el refuerzo. La funcionalidad del diseño depende de la geometría de la trenza o de la torsión. De manera adicional, el hilo de colágeno oprime dicho material textil tejido o tricotado, liso y de fieltro, o se puede incorporar un material textil trenzado o tejido, tricotado tri-dimensional entre las capas o sobre la superficie de la estructura. Algunas realizaciones también pueden incluir un gel de colágeno entre las capas solas o con un fármaco, factor de crecimiento o antibiótico para funcionar como un sistema de administración. De manera adicional, se podría incorporar un gel de colágeno con un hilo o estructura de hilo entre las capas.

Como podrá apreciarse por parte del experto en la técnica, muchas de las realizaciones que incorporan gel de colágeno, hilo o estructura de hilo también afectarán a las propiedades físicas, tales como adaptabilidad, resistencia radial, resistencia a la torsión, retención de sutura y aptitud de plegado. Las propiedades físicas del hilo o estructura de hilo también pueden variar por medio de la reticulación de los hilos.

En algunas realizaciones, se pueden añadir capas de colágeno adicionales a las superficies externa o interna de las capas de colágeno unidas para crear una superficie de flujo suave para su aplicación última como se describe en la Publicación Internacional PCT N°. WO 95/22301. Esta capa de colágeno suave también favorece la unión de las células del hospedador lo que facilita la increscencia y la bio-remodelación. Como se describe en la Publicación Internacional PCT N°. WO 95/22301, esta capa de colágeno suave puede esta formada por colágeno fibrilar sometido a extracción con ácido o colágeno no fibrilar, que es predominantemente colágeno de tipo I, pero también puede incluir otros tipos de colágeno. El colágeno puede proceder de cualquier número de fuentes de mamíferos, típicamente piel bovina, porcina u ovina o tendones. Preferentemente, el colágeno se ha procesado por medio de extracción con ácido para dar lugar a una dispersión de fibrillas o gel de alta pureza. Se puede extraer el colágeno con ácido a partir de la fuente de colágeno usando un ácido débil, tal como ácido acético, ácido cítrico o ácido fórmico. Una vez extraído en la disolución, se puede precipitar con sal el colágeno usando NaCl y se puede recuperar, usando técnicas estándar tales como centrifugación o filtración. Los detalles de la extracción ácida de colágeno a partir de tendón bovino se describen, por ejemplo, en el documento de Estados Unidos 5.106.949.

Generalmente, las dispersiones de colágeno o geles para su uso en la presente invención están a una concentración de aproximadamente 1 a 10 mg/ml, preferentemente desde aproximadamente hasta aproximadamente 6 mg/ml, y del modo más preferido desde aproximadamente 3 a 5 mg/ml y a un pH de aproximadamente 2 a 4. Un disolvente preferido para el colágeno es ácido acético diluido, por ejemplo, desde aproximadamente 0,05 hasta 0,1%. Se pueden usar otros disolventes de colágeno convencionales con tal de que dichos disolventes sean compatibles.

Una vez que se ha producido el dispositivo protésico, se puede secar al aire, se puede envasar y esterilizar con irradiación gamma, típicamente de 2 Mrad, y se puede almacenar. También se pueden usar disoluciones químicas que emplean esterilización terminal tales como disoluciones de ácido peracético como se describe en la patente de Estados Unidos N°. 5.460.962.

En los ejemplos siguientes, se corta longitudinalmente el ICL y se aplana sobre una placa de vidrio, aunque se puede usar cualquier molde firme no aislado e inerte. Además, el molde puede tener cualquier forma: plana, redondeada o compleja. En un molde redondo o complejo, las piezas superior e inferior del molde se construyen de manera apropiada para conformar la prótesis completa con la forma deseada. Una vez construida de este modo, la prótesis mantiene su forma. De este modo, por ejemplo, si se conforma la prótesis con forma redondeada, se puede

5 usar como dispositivo de restitución de valvas para válvulas cardíacas. El material textil de reparación tisular de multi-capa puede someterse a formación de túbulos usando varios medios alternativos o sus combinaciones. Se puede conformar un material textil de reparación tisular de multicapa con forma de tubo bien en posición normal o invertida. El tubo se puede preparar mecánicamente por medio de sutura, usando suturas interrumpidas con material de sutura apropiado de forma que, de manera ventajosa, el cirujano pueda recortar y conformar el tubo en el momento del implante sin que se produzca desmoronamiento. Otros procesos para suturar la submucosa pueden incluir unión adhesiva, tal como el uso de pegamentos basados en fibrina o adhesivos de tipo industrial tales como poliuretano, acetato de vinilo o poliepoxi. Preferentemente, también se pueden usar técnicas de unión térmica que incluyen soldadura láser o soldadura térmica de la sutura, seguido de inactivación, para sellar los lados del tubo formado de este modo. Son posibles otros medios mecánicos, tales como el uso de fijadores adhesivos o grapas. Con estas técnicas de formación de túbulos, los extremos de los lados pueden presentar terminación de tope o pueden estar superpuestos. Si los lados están superpuestos, se puede recortar la sutura una vez que se ha formado el tubo. Además, típicamente estas técnicas de formación de túbulos se llevan a cabo sobre un mandril para determinar el diámetro deseado.

15 Se puede mantener el tubo estructural formado de este modo sobre un mandril u otro husillo apropiado para el procesado posterior. Para controlar las tasas funcionales de biodegradación y, por tanto, la tasa de disminución de la resistencia de la prótesis durante la bio-remodelación, se reticula la prótesis, usando hidrocioruro de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC). La reticulación de la prótesis también contribuye a evitar la deformación de la luz, manteniendo el diámetro del tubo uniforme, y aumentando la resistencia frente al reventado. Se aumenta la resistencia de unión de la sutura o de la prótesis de multicapa cuando se usan métodos de unión térmica o unión por deshidratación. Se piensa que la reticulación de la capa de colágeno intestinal también mejora la resistencia de retención de la sutura frente a la propagación de fisuras.

25 Se puede depositar el colágeno sobre la superficie interna o externa del ICL, como se describe en el Ejemplo 5 de la patente de Estados Unidos 5.256.418. Brevemente, cuando se tiene que someter el material textil de reparación tisular a formación de túbulos, se ajusta el material textil de multi-capa en un extremo por medio de ajustes Luer y la dispersión de colágeno rellena el tubo. Esta etapa también se puede conseguir como se describe en la solicitud de patente anteriormente referenciada usando un cabezal de presión hidrostática. También se puede depositar la capa interna de colágeno haciendo fluir el colágeno al interior de ambos extremos del tubo de forma simultánea. Posteriormente, se coloca el tubo en un baño de polietilenglicol de 20% (PEG) en una disolución salina isotónica de tampón de fosfato (PBS), pH neutro. El gradiente osmótico entre la disolución interna de colágeno y la disolución externa de PEG en combinación provoca una concentración simultánea y la deposición del colágeno a lo largo de la luz de la pared interna de la capa estructural. A continuación, se retira el tubo del baño de PEG, y se inserta una varilla de vidrio con el diámetro deseado de la luz de la prótesis en el interior de la disolución de colágeno, o de manera alternativa, se cierra un extremo de la prótesis y se aplica presión de aire de forma interna para mantener la luz del tubo en posición abierta. Posteriormente, se permite el secado de la prótesis y posteriormente se re-hidrata en PBS. El revestimiento de colágeno formado de este modo, en forma de colágeno fibrilar denso, rellena las pequeñas irregularidades de la capa estructural intestinal, dando como resultado una prótesis que presenta por un lado superficie de flujo suave y espesor uniforme. El procedimiento también facilita la unión del gel de colágeno a la capa de colágeno intestinal. Se puede producir una capa de colágeno de densidad y espesor variable modificando las condiciones de deposición que se pueden determinar por medio de cambios de los parámetros de rutina. Se pueden usar los mismos procedimientos para aplicar el colágeno a la superficie externa del ICL con el fin de crear una prótesis de tres capas.

45 La estructura protésica es trombogénica en los dispositivos de restitución de vasos sanguíneos de diámetro pequeño. Solo se puede usar en aplicaciones vasculares para vasos sanguíneos de flujo elevado (diámetro grande). Por tanto, la prótesis se debe convertir en no trombogénica para que resulte útil en la restitución o reparación de vasos sanguíneos de diámetro pequeño.

50 Se puede aplicar heparina a la prótesis, por medio de varias técnicas bien conocidas. A modo de ilustración, se puede aplicar heparina a la prótesis de las siguientes tres maneras. En primer lugar, se puede aplicar una disolución de heparina de benzalconio (BA-Hep) a la prótesis sumergiendo la prótesis en la disolución y posteriormente secándola al aire. Este procedimiento trata el colágeno con un complejo de BA-Hep unido de forma iónica. En segundo lugar, se puede usar EDC para activar la heparina, posteriormente para unir covalentemente la heparina a la fibra de colágeno. En tercer lugar, se puede usar EDC para activar el colágeno, posteriormente unir covalentemente protamina al colágeno y posteriormente unir iónicamente heparina a la protamina. También se conocen bien en la técnica y se podrían usar otros muchos procedimientos de revestimiento, unión y fijación.

55 Se puede conseguir el tratamiento del material textil de reparación tisular con fármacos además de o como sustitutivo de heparina. Los fármacos pueden incluir por ejemplo, factores de crecimiento para favorecer la vascularización y la formación de epitelio, tal como un factor de crecimiento derivado de macrófago (MDGF), un factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), un factor de crecimiento derivado de células endoteliales (ECDGF); antibióticos para luchar contra cualquier infección potencial resultante del implante quirúrgico; o factores de crecimiento de nervios incorporados en la capa interna de colágeno cuando se usa la prótesis como conducto para la regeneración de nervios. Además de o como sustitutivo de los fármacos, se pueden incluir dentro de la estructura componentes de matriz tales como proteoglicanos o glucoproteínas o glucosaminoglucanos.

Se puede agujerear el material de reparación tisular haciendo uso de láser con el fin de crear poros de tamaño micrónico a través de la prótesis completa para contribuir a la increscencia celular usando un láser excímero (por ejemplo a longitudes de onda de KrFo ArF). El tamaño de poro puede variar desde 10 hasta 500 micras, pero preferentemente es desde aproximadamente 15 a 50 micras y el espaciado puede variar, pero se prefiere aproximadamente 500 micras sobre el centro. Se puede agujerear el material de reparación tisular haciendo uso de un láser en cualquier momento durante el proceso de preparación de la prótesis, pero preferentemente se hace antes de la descontaminación o esterilización.

También se pueden formar huecos o espacios por medio del método de inversión de fase. En el momento de la formación de capas de ICL, se distribuyen partículas cristalinas entre las capas, que son insolubles en la fuente de calor líquida para unión, pero que deberían ser solubles en el baño de inactivación o en la disolución de reticulación. Si se usa un láser o calor seco para unir las capas, entonces puede ser cualquier sólido cristalino con tal de que sea soluble en el baño de inactivación o en la disolución de reticulación. Cuando se solubiliza el sólido cristalino y se ha difundido, queda el espacio que había ocupado el sólido. El tamaño de las partículas puede variar desde 10 a 100 micras, pero preferentemente es desde aproximadamente 15 hasta 50 micras y el espaciado puede variar entre las partículas cuando se distribuyen entre las capas. El número y tamaño de los huecos formados también afectará a las propiedades físicas (es decir, adaptabilidad, resistencia a la torsión, retención a la sutura y aptitud de plegado).

Se proporcionan los siguiente ejemplos para aclarar más la práctica de la presente invención y no deberían interpretarse de ningún modo como que limitan el alcance de la presente invención.

Ejemplos

20 Ejemplo 1: Recogida y Procesado de Capa de Colágeno Intestinal Procedente de Intestino Porcino

Se recogió intestino delgado de cerdo y se separó mecánicamente, usando una máquina de limpieza de intestino Bitterling (Nottingham, Reino Unido) que retira la grasa de manera forzada, el músculo y las capas de mucosa de la túnica submucosal usando una combinación de acción mecánica y lavado usando agua caliente. Se puede describir la acción mecánica como series de rodillos que comprimen y separan las capas sucesivas de la túnica submucosal cuando se hace correr el intestino intacto entre ellos. La túnica submucosal de intestino delgado es más dura y más rígida que el tejido circundante, y los rodillos aprietan los componentes más blandos de la submucosa. El resultado de la limpieza a máquina fue tal que únicamente permaneció la capa submucosal del intestino. Finalmente, se descontaminó la submucosa con ácido peracético de 0,3% durante 18 horas a 4 °C y posteriormente se lavó en disolución salina con tampón de fosfato. El producto que quedó fue una capa de colágeno intestinal (ICL).

30 Ejemplo 2: Diferentes Temperaturas de Soldadura y Concentraciones EDC de ICL

Se examinaron los efectos de la temperatura de soldadura (seguido de inactivación), tiempo de soldadura, concentración de 1-etil-3-(3(dimetilamino)propil)carbodiimida (ECD), concentración de acetona y tiempo de reticulación, tras la soldadura sobre la resistencia de soldadura, para la aplicación de tubo de dos capas de ICL. ICL fue porcino como se ha descrito en el Ejemplo 1. Se midieron las calidades de resistencia usando un ensayo de retención de sutura y un ensayo de resistencia de tracción final (UTS).

Se invirtió el ICL y se estiró sobre un par de mandriles que se introdujeron en un bastidor de montaje de ICL. Los mandriles fueron de tubo de acero inoxidable con un diámetro externo de 4,75 mm. A continuación, se colocaron el ICL y los mandriles en una cámara de deshidratación ajustada a una humedad relativa de 20% a 4 °C durante aproximadamente 60 minutos. Tras la deshidratación, se retiró el ICL de la cámara y los mandriles. Se retiraron las áreas de marcaje linfático y se enrolló manualmente el ICL alrededor del mandril dos veces para forma una estructura de bicapa "no soldada". Se volvió a introducir el ICL enrollado en la cámara de deshidratación y se dejó secar durante otros 90 minutos a 20% de humedad relativa hasta aproximadamente 50% de humedad +/- 10%. Con el fin de determinar la cantidad de humedad presente en la estructura de la muestra, se usó un horno CEM™.

Se ajustó un horno THERMOCENTER™ para el tratamiento de temperatura diseñado con el fin de soldar las estructuras. Las temperaturas sometidas a ensayo para la soldadura variaron desde 55° hasta 70 °C. Una vez que se hubieron colocado las estructuras en el horno, se dejó equilibrar el horno antes de comenzar a contar el tiempo. Se permitió que las estructuras permanecieran en la cámara durante el tiempo necesario para esa condición. Los tiempos de soldadura variaron entre 7 y 30 minutos. Tan pronto como se hubo completado el tiempo se retiraron las estructuras de la cámara y se colocaron en un baño de agua a 4 °C durante aproximadamente 2 a 5 minutos. A continuación se volvieron a introducir las estructuras soldadas en la cámara de deshidratación durante aproximadamente 30 minutos hasta que se deshidrataron hasta aproximadamente 20% +/- 10%.

Tras la deshidratación, se introdujeron las estructuras en el interior de un recipiente que contenía EDC bien con agua desionizada o bien con agua desionizada y acetona, a concentraciones apropiadas para las condiciones sometidas a ensayo. Las concentraciones de EDC sometidas a ensayo fueron 50, 100 y 200 mM. Las concentraciones de acetona sometidas a ensayo fueron 0, 50 y 90% en agua. Se determinó la duración de tiempo para la reticulación por medio de las condiciones sometidas a ensayo. Los tiempos de reticulación fueron 6, 12 y 24 horas. Tras la reticulación, se retiró la estructura de la disolución y se lavó con disolución salina con tampón de fosfato de pH fisiológico (PBS) tres veces a temperatura ambiente. Posteriormente, se retiró la estructura soldada y

reticulada del mandril y se almacenó en PBS hasta el ensayo. Además de las treinta estructuras que se prepararon, se prepararon otras dos estructuras de bicapa por medio de soldadura a 62 °C durante 15 minutos y se reticularon en EDC de 100 mM en 100% de H₂O durante 18 horas.

5 Se usó un ensayo de retención de sutura para determinar la capacidad de la estructura para mantener la sutura. Se aseguró una pieza de la estructura en un dispositivo de medición de fuerza CHATTILION™ y se llevó a cabo una perforación de 1-2 mm con una sutura 6-0 SURGILENE™, se atravesó una pared de la estructura y se aseguró. Posteriormente, el dispositivo tira en la zona de sutura para determinar la fuerza necesaria para desgarrar el material de la estructura. La sutura media se rompe entre 400-500 g de fuerza; la fuerza con la que tiran los cirujanos tiende a ser de 150 g.

10 Se llevó a cabo el ensayo de resistencia de material/soldadura para determinar el UTS de la estructura. Se llevaron a cabo escisiones de anillos de muestra de 5 mm de longitud a partir de cada tubo y sometió cada uno de ellos a ensayo de resistencia de tracción final (UTS) usando un sistema de ensayo mecánico MTS™. Se llevaron a cabo tres escisiones de anillos de muestra a partir de cada tubo para tres acciones de ensayo de tirado realizadas para cada estructura para un total de 90 acciones de tirado. Se colocó un anillo en las sujeciones del MTS™ y se tiró con una tasa de 0,02 kg de fuerza/s hasta que la soldadura se separa o se rompe, o hasta que el material se rompe (en lugar de la soldadura).

Ejemplo 3: Diferentes Temperaturas de Soldadura de ICL

Se examinaron el efecto de la temperatura de soldadura y la inactivación tras la soldadura sobre la resistencia de soldadura, para la aplicación de tubo de dos capas de ICL.

20 Se cortó a lo largo una muestra de ICL de 10 pies (3,05 m) de longitud y se preparó como en el procedimiento mencionado en el Ejemplo 2. Se prepararon seis tubos de 6 mm de diámetro de longitud variable entre 15-20 cm para cada condición de temperatura.

25 Se sometieron los tubos a una condición de temperatura al tiempo que se mantenían húmedos durante 3,5 horas. Las condiciones de las temperaturas fueron: Temperatura Ambiente (20 °C), 55 °C, 62 °C y 62 °C y posteriormente se inactivaron de forma inmediata en un baño a 4 °C durante un minuto. A continuación, se reticularon todos los tubos en EDC. Se colocaron seis tubos juntos en 300 ml de EDC 100 mM durante la noche a temperatura ambiente. A continuación se lavaron los tubos con disolución salina con tampón de fosfato de concentración fisiológica tras la reticulación.

30 Se llevaron a cabo escisiones de anillos de muestra de 5 mm de longitud para cada tubo y se sometió a ensayo la resistencia a la tracción final (UTS) usando un MTS™. Se tomaron cinco anillos de muestra de cada tubo para 5 acciones de ensayo de tirado sobre cada uno de los 6 tubos por condición, para un total de 30 acciones de tirado.

35 La resistencia de soldadura fue menos consistente para los tubos unidos por medio de deshidratación a temperatura ambiente en comparación con los otros tratamientos de temperatura cuando se sometieron a ensayo usando el ensayo UTS. Uno de los seis tubos soldados a temperatura ambiente presentó unas mediciones de UTS comparables a las de los otros tratamientos. Para los tubos soldados a otras temperaturas, con o sin inactivación, no hubo diferencias en la resistencia de soldadura. Tras el ensayo de UTS, se determinó que la ruptura del material no fue una separación de la soldadura sino un fallo del material en todos los casos.

Ejemplo 4: El Carácter Antigénico de la Capa de Colágeno Intestinal Reticulada

40 Se obtuvieron muestras nuevas de capa intestinal submucosal porcina tras la etapa de limpieza como se ha descrito en el Ejemplo 1. Posteriormente, se dejaron las muestras sin tratar y se almacenaron en agua, se sumergieron en una disolución salina de tampón de fosfato de concentración fisiológica, se trataron con ácido peracético de 0,1%, o se trataron con ácido peracético de 0,1% y posteriormente se reticularon con hidrocloreuro de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC). A continuación, se extrajeron las muestras con una disolución de NaCl 0,5 M/ácido tartárico 0,1 M durante aproximadamente 18 horas.

45 Se procesaron dos geles de poliacrilamida-dodecilsulfato de sodio de tris-glicina de 12% (Novex Precast Geles cat# EC6009) y posteriormente se transfirieron después de aproximadamente 18 horas sobre un papel de nitrocelulosa de 0,45 µ. Se procesaron los extractos de ácido tartárico de ICL tratado o no tratado frente a una línea estándar de control que contenía: 10 µl de Estándares Preteñidos de Caleidoscopio (Bio Rad cat# 161-0324) : 2 µl de estándares de intervalo de peso molecular reducido SDS-PAGE bio-teñidos (Bio-Rad cat# 161-0306) : 6 µl de tampón de carga; se introdujeron 10 µl de estándar de control en cada línea. Se secó el gel durante aproximadamente 2 horas con leche no grasa seca de 1% (Carnation) en disolución salina de tampón de fosfato. A continuación, se lavó el gel tres veces con disolución salina de tampón de borato Tween con 200 µl de lavado por línea. Se añadió anticuerpo primario en 200 µl de suero Rb y disolución salina de tampón de borato (ácido bórico 100 mM: borato de sodio 25 mM: NaCl 150 mM)/Tween, a cada línea en diferentes intervalos de valor (1:40, 1:160, 1:640 y 1:2560). A continuación, se incubó el gel a temperatura ambiente durante una hora en una plataforma de agitación (Bellco Biotechnology) ajustando la velocidad a 10. Posteriormente, se lavó el gel de nuevo tres veces con disolución salina

de tampón de borato/Tween. Se añadió un anticuerpo secundario, Ig-AP anti-conejo de cabra (Southern Biotechnology Associates Inc. cat# 4010-04) a una dilución de 1:1000 sobre las líneas a 200 µl por línea y se incubó el gel durante una hora a temperatura ambiente sobre una plataforma de agitación. A continuación, se sumergió la membrana de nitrocelulosa en una disolución de desarrollo de color AP al tiempo que se incubó a temperatura ambiente en una plataforma de agitación hasta que el desarrollo de color resultó completo. Se detuvo el desarrollo por medio de lavado de la membrana en agua desionizada durante diez minutos en una plataforma de agitación al tiempo que se cambió el agua una vez durante diez minutos. Posteriormente, se secó al aire la membrana.

Los resultados obtenidos a partir del análisis del gel sugieren que el carácter antigénico del ICL derivado de porcino tratado con ácido peracético y EDC fue mucho menor en comparación con los otros tratamientos.

10 Ejemplo 5: Material Textil de Reparación Tisular de Seis Capas como Parche para Pared Abdominal

Se superpusieron seis capas de colágeno intestinal porcino unas encima de otras sobre una placa de vidrio. A continuación, se colocó una segunda placa de vidrio sobre la parte superior de las capas de colágeno intestinal y se fijó firmemente a la primera placa. Se colocó el aparato en el interior de un horno de tipo convencional a 62 °C durante una hora. Inmediatamente después del calentamiento, se colocó el aparato en el interior de un baño de agua a 4 °C durante diez minutos. Se desmontó el aparato, se retiraron las capas de colágeno intestinal y se trataron con hidrócloruro de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) 100 mM en acetona de 50% durante cuatro horas a 25 °C. Se secó el material y se esterilizó por medio de radiación gamma (2,5 Mrad).

Se suturó el material textil de reparación tisular en un defecto de 3 cm x 5 cm en la línea medida de conejos blancos de Nueva Zelanda (4 kg) usando una sutura de prolono 2-0 continua. Se sacrificaron los animales a las cuatro semanas, diez semanas y 16 semanas, y se examinaron macroscópica, mecánica e histológicamente. El examen macroscópico mostró hinchamiento e inflamación mínimos. Se cubrió el injerto con una capa tisular micécea que, al parecer, era continua al peritoneo parietal. Se pudo observar que los vasos sanguíneos pequeños avanzaban en sentido circunferencial desde la periferia hasta el centro del parche. Desde el punto de vista mecánico, el injerto fue estable sin que se observara la formación de nuevas hernias. El examen histológico reveló relativamente pocas células inflamatorias y las observadas se encontraban principalmente cerca del margen del injerto (debido a la presencia de material de sutura de prolono). La superficie peritoneal fue suave y estaba cubierta completamente por mesotelio.

Ejemplo 6: Material Textil de Reparación Tisular de Dos Capas como Parche de Reparación Pericárdico

Se superpusieron dos capas de colágeno intestinal porcino, una encima de otra, sobre una placa de vidrio. Posteriormente, se colocó una segunda placa de vidrio sobre la parte superior de las capas de colágeno intestinal y se fijó firmemente a la primera placa. Se colocó el aparato en el interior de un horno de tipo convencional a 62 °C durante una hora. Inmediatamente después del calentamiento, se colocó el aparato en un baño de agua a 4 °C durante diez minutos. Se desmontó el aparato, se retiraron las capas de colágeno intestinal, y se trataron con hidrócloruro de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida 10 mM (EDC) en acetona de 50% durante cuatro horas a 25 °C. Se secó el material y se esterilizó por medio de radiación gamma (2,5 Mrad).

Se llevó a cabo la escisión de una parte de 3 x 3 cm de pericardio de conejo blanco de Nueva Zelanda y se restituyó con una pieza igual de material textil de reparación tisular (sometida a anastomosis con suturas interrumpidas de prolono 7-0). Se sacrificaron los animales a las cuatro semanas y a los 180 días, se examinaron macroscópica, mecánica e histológicamente. El examen macroscópico mostró hinchamiento e inflamación mínimos. Se pudo observar que los vasos sanguíneos pequeños avanzaban en sentido circunferencial desde la periferia hasta el centro del parche. Desde el punto de vista mecánico, el injerto fue estable sin adhesión ni al tejido del esternón ni al tejido pericárdico. El examen histológico reveló relativamente pocas células inflamatorias y las observadas se encontraban principalmente cerca del margen del injerto (debido a la presencia de material de sutura de prolono).

Ejemplo 7: Dispositivo de Reparación de Hernias

Se desarrolló un dispositivo de prototipo para reparación de hernias usando ICL para disponer de una región interna hueca. Cuando se completó, el dispositivo presentaba una conformación redondeada unida en la periferia y una región interna hinchada que se convirtió en hinchada por medio de la inclusión de disolución salina de tampón de fosfato de concentración fisiológica. Opcionalmente, la región interna puede albergar una bobina de hilo para obtener una rigidez añadida u otra sustancia para el soporte estructural o la administración de una sustancia.

Con el fin de conectar las láminas de multicapa de ICL, se recortaron longitudes de 15 cm de ICL de marcaje linfático y se cortaron los lados con los marcajes para formar una lámina. Se secaron con Texwipes. Se colocaron las láminas en forma de capas, con el lado mucosal hacia abajo, sobre una placa de vidrio limpia (6" x 8") (15,24 cm x 20,32 cm). En este caso, se formaron dos parches de dos capas y dos parches de cuatro capas por medio de la colocación en forma de capas de por un lado dos y por otro lado cuatro capas de ICL sobre las placas de vidrio. Se colocó una segunda placa de vidrio (6" x 8") (15,24 cm x 20,32 cm) sobre la parte superior de la última capa de ICL y se fijaron juntas las placas y posteriormente se colocaron en un horno hidratado a 62 °C durante una hora. A continuación, se inactivaron las estructuras en agua desionizada a 4 °C durante aproximadamente diez minutos. Posteriormente, se retiraron las placas de vidrio del baño y se retiró la placa de cada parche. Posteriormente, se

suavizaron las capas de ICL actualmente unidas para retirar cualquier burbuja o arruga. Se volvió a colocar la placa de vidrio sobre las capas de ICL y se volvieron a introducir en el horno hidratado durante 30-60 minutos hasta sequedad. Se retiraron los parches del horno y se re-hidrataron parcialmente por medio de pulverización con disolución salina de tampón fosfato de concentración fisiológica.

- 5 Para la construcción de la estructura de bi-capa, se retiró un parche de bi-capa de las placas de vidrio y se colocó sobre otro parche bi-capa que todavía se encontraba en la otra placa de vidrio. Se colocó una placa anular ($d_o=8,75$ m; $d_{interno} = 6$ cm) sobre el segundo parche. A continuación se inyectaron aproximadamente 10 cc de disolución salina de tampón de fosfato de concentración fisiológica a través de una aguja de calibre 25 entre los dos parches de bicapa. Posteriormente, se colocó una segunda placa de vidrio sobre la parte superior de la placa anular y a
10 continuación se fijaron juntas. Para la construcción de una estructura de cuatro capas, se siguieron las mismas etapas exceptuando que se usaron dos parches de cuatro capas en lugar de dos parches de bi-capa. Se colocaron los parches en un horno hidratado a 62 °C durante una hora. A continuación, se inactivaron las estructuras en agua desionizada a 4 °C durante quince minutos. Posteriormente, se reticularon las estructuras en 200 ml de EDC 100 mM en acetona de 50% durante aproximadamente 18 horas y después se lavaron con agua desionizada. A
15 continuación, se recortaron las estructuras para la conformación con una cuchilla de afeitar hasta el tamaño del borde externo de la placa anular.

Ejemplo 8: Restitución de Disco Intervertebral

Se configuraron ICL, colágeno fibrilar denso y ácido hialurónico para que se aproximaran de manera estrecha a la estructura anatómica y la composición de un disco intervertebral.

- 20 Se prepararon disquetes de colágeno fibrilar densos que contenían ácido hialurónico. Se disolvieron 9 mg de sal de sodio de ácido hialurónico procedente de traquea de bovino (Sigma) en 3 ml de ácido acético de 0,5N. Se añadieron 15 ml de colágeno de 5mg/ml (Antek) y se mezcló. Se centrifugó la mezcla para retirar las burbujas de aire. Se añadieron 5 ml de la disolución a tres pocillos Transwell (Costar) de una placa de seis pocillos (Costar). Se añadió PEG N600 al área exterior de los pocillos Transwell para cubrir la parte inferior de las membranas. Se mantuvo la
25 placa a 4 °C sobre una mesa de agitación orbital, a baja velocidad, durante aproximadamente 22 horas con un intercambio de disolución de PEG después de 5,5 horas. Se retiró la disolución de PEG y se deshidrataron los pocillos Transwell a 4 °C/20% de RH durante la noche.

- Para conectar las láminas de multicapa de ICL, se recortaron longitudes de 15 cm de ICL de marcajes linfáticos y se cortó el borde con los marcajes para formar una lámina. Se secaron las láminas con Texwipes. Sobre una placa de
30 vidrio limpia, se colocaron las láminas en forma de capas, con el lado mucosal hacia abajo, hasta obtener un espesor de cinco capas y se colocó una segunda placa de vidrios sobre la parte superior de la quinta capa. Se construyeron cinco parches de cinco capas. Se fijaron las placas con el ICL entre ellas y se colocaron en un horno hidratado a 62 °C durante una hora. Posteriormente se inactivaron las estructuras en agua RODI a 4 °C durante aproximadamente diez minutos, posteriormente se retiraron del baño de inactivación y se almacenaron a 4 °C hasta
35 el montaje del disco.

- Se colocó otro parche grande sobre otra placa de vidrio. Se colocó un parche ligeramente más pequeño sobre el primer parche alineado con un borde del parche más grande. Se cortó un parche por la mitad y se cortó un orificio en el centro de cada uno, aproximándose al tamaño de los disquetes de DFC. Con los orificios centrales alineados, se colocaron las dos mitades sobre el segundo parche alineado al mismo borde. Se colocaron tres disquetes de
40 DFC/HA rehidratados dentro del orificio central. Se colocó otro parche ligeramente más pequeño sobre las dos mitades que contenían los disquetes DFC y se colocó un parche más grande sobre el parche más pequeño, ambos alineados al mismo borde. Se colocó una segunda placa de vidrio sobre la parte superior de la estructura. La forma resultante fue la de una cuña, siendo el lado más grueso el que presenta los bordes alineados que roscan en el lado opuesto. Se colocó el dispositivo formado de este modo en un horno hidratado a 62 °C durante una hora y
45 posteriormente se inactivó en agua RODI a 4 °C durante aproximadamente diez minutos. A continuación, se reticuló el dispositivo en EDC 100 mM (Sigma) en acetona de 90% (Baxter) durante aproximadamente cinco horas y posteriormente se lavó con tres intercambios de disolución salina de tampón de fosfato. A continuación, se recortaron los bordes del dispositivo con una cuchilla de afeitar.

Ejemplo 9: La Formación de una Estructura de Injerto Vascular

- 50 Se recogió yeyuno proximal de cerdo y se procesó con una Máquina de Limpieza de Intestino (Bitterling, Nottingham, Reino Unido) y posteriormente se descontaminó con una disolución de ácido peracético como se describe en el Ejemplo 1. Se cortó de forma abierta en sentido longitudinal el ICL tratado con ácido peracético (PA-ICL) y se retiraron las áreas de marcaje linfático para formar una lámina de ICL. Se enrollaron las láminas de ICL alrededor de mandriles de acero inoxidable de 6,0 mm de diámetro para formar estructuras de bicapa. A
55 continuación, se colocaron las estructuras (sobre mandriles) en una cámara de horno THERMOCENTER™ equilibrada ajustada a 62 °C durante aproximadamente 1 hora. Se retiraron las estructuras de la cámara y se colocaron en un baño de agua a 4 °C durante aproximadamente 2 a 5 minutos. Se reticularon químicamente las estructuras en 50 ml de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida 100 mM (EDC) en una disolución de agua/acetona 50/50 durante 18 horas para formar las estructuras de injerto vascular (PA/EDC-ICL) reticuladas con

EDC y tratadas con ácido peracético. Se retiraron las estructuras de los mandriles y se lavaron con agua para retirar la disolución de EDC residual.

Tras la retirada de los mandriles, se depositó a extracción una capa (de un espesor de aproximadamente 200 μm) de colágeno de tipo I extraída de tendón bovino, sobre la superficie de la luz de las estructuras de acuerdo con el método descrito en la patente de Estados Unidos 5.256.418. Se fijaron herméticamente las barbas de policarbonato (ajustes de cierre de Luer que presentan una forma cónica en un extremo) en cualquiera de los extremos de las estructuras y se colocaron las estructuras horizontalmente en un elemento de fijación de deposición. Se unió una reserva de 50 ml de colágeno extraído con ácido de 2,5 mg/ml, preparado por medio del método descrito en la patente de Estados Unidos N.º. 5.106.949, por medio de las barbas. Se permitió que el colágeno rellenara la luz del tubo de ICL y posteriormente se colocó en el interior de un baño de agitación de polietilenglicol de peso molecular 8000 de 20% (Sigma Chemicals Co.) durante 16 horas a 4 °C. A continuación, se desmanteló el aparato y se colocó una varilla de vidrio de 4 mm de diámetro en el interior del tubo de ICL relleno con colágeno con el fin de fijar el diámetro de la luz. Posteriormente, se dejó secar la prótesis.

Se revistió la capa de DFC de la luz con heparina de cloruro de benzalconio (HBAC) por medio de inmersión de los injertos tres veces en una disolución de 800 U/ml de HBAC y se dejó secar. Finalmente, el injerto recibió un tratamiento final de esterilización química de ácido peracético en volumen/volumen. Se almacenó el injerto en estado seco hasta el procedimiento del implante.

Ejemplo 10: Estudios de Implante en Modelos de Animales

Se mantuvieron en ayunas veinte y cinco perros bastardos que pesaban 15-25 kg durante la noche y posteriormente se anestesiaron con tiopental por vía intravenosa (30 mg/kg), se entubaron y se mantuvieron con haloetano y óxido nítrico. Se administró cefazolina (1000 mg) por vía intravenosa de forma pre-operativa así como de forma pos-operativa. Se practicó sobre cada perro bien un injerto de derivación aórtico o bien un injerto de interposición femoral. Para los injertos de derivación aórticos, se realizó una incisión abdominal en la mitad y la aorta quedó expuesta desde las arterias renales hasta la bifurcación, seguido de la administración de heparina intravenosa (100 U/kg). Se colocaron los injertos (6 mm x 8 mm) entre la aorta infra-renal distal (anastomosis termino lateral) y la aorta que se encontraba en posición proximal con respecto al bifurcación (anastomosis termino lateral). Se ligó la aorta en posición distal con respecto a la anastomosis proximal. Se cerraron las incisiones y se mantuvieron los perros con aspirina durante 30 días después de la cirugía. Para los injertos de interposición femorales, se abrieron los animales lateralmente, quedando expuestas las arterias femorales y se practicó una escisión de 5 cm de longitud. Se sometieron los injertos (4 mm x 5 cm) a anastomosis de forma terminal con respecto al arteria femoral. En el lado contralateral, se colocó un injerto de control. Se cerraron las incisiones y se mantuvieron los animales con aspirina durante 30 días después de la cirugía. El seguimiento pos-operatorio varió desde 30 días hasta 360 días. Se recogieron muestras de sangre de pre-implante y de pos-implante transcurridas cuatro y ocho semanas. Se sacrificaron los animales en diferentes momentos (30 días, 60 días, 90 días, 180 días y 360 días).

Se mantuvieron en ayunas conejos blancos de Nueva Zelanda que pesaban 3,5-4,5 kg durante la noche y posteriormente se anestesiaron con acepromacina (20 mg) y cetamina (40 mg), se entubaron y se mantuvieron con cetamina (50 mg/ml) inyectada por vía intravenosa según fue necesario. De forma pre-operativa, se administró penicilina por vía intramuscular (60.000 U). Se llevó a cabo una incisión abdominal media quedando expuesta la aorta desde las arterias renales hasta la bifurcación, seguido de la administración de heparina intravenosa (100 U/kg). Se llevó a cabo una escisión de 3 cm de longitud de la aorta, y se sometieron los injertos a anastomosis (2,5 mm x 3 cm) de forma terminal hasta la aorta. Se cerraron las incisiones y se mantuvieron y se mantuvieron los animales sin terapia anticoagulante después de la cirugía. El seguimiento pos-operatorio varía desde 30 días hasta 360 días. Se sacrificaron los animales en diferentes momentos (30 días, 60 días, 90 días, 180 días y 360 días).

Se fijaron los implantes junto con los tejidos vasculares adyacentes obtenidos a partir de animales sacrificados para el análisis por microscopía de transmisión electrónica (TEM) durante 4 horas en una disolución de paraformaldehído de 2%, glutaraldehído de 2,5% en cacodilato de sodio de 0,1 M, pH 7,4. Posteriormente, se pos-fijaron las muestras en OsO_4 de 1,0% (en cacodilato de sodio 0,1 M) y se tiñeron en bloque con acetato de uranilo de 2,0% (acuoso). Tras la fijación secundaria, se deshidrataron todas las muestras en series de etanol graduadas y óxido de propileno y se intercalaron en Epox 812 (Enerst F. Fullam, Rochester, NY, EE.UU.). Se tiñeron secciones ultrafinas (~ 700 nm) con acetato de uranilo y citrato de plomo. Se examinaron las secciones en un JEOL Instruments JEM100S a 80 kV. Para la microscopía electrónica de barrido (SEM), se fijaron las muestras durante 18 horas en una disolución de Karnovsky de concentración media y se lavaron cinco veces con tampón de fosfato de Sorensen antes de la pos-fijación en OsO_4 de 1,0% durante 1 hora. A continuación, se lavaron las muestras dos veces con tampón de fosfato de Sorensen y tres veces con agua destilada doble. Se logró la deshidratación a través de series de etanol (50%, 70%, 90% y 100%), seguido de secado de punto crítico. Se montaron las muestras y se revistieron con oro/paladio 60/40.

Se examinaron histológicamente los explantes de injerto de ICL procedentes de perro y conejo para evaluar la increscencia de las células de hospedador. La tinción de tricromo de Masson de un explante de 60 días mostró un infiltrado de hospedador significativo. La tinción de color azul más oscuro mostró colágeno del ICL mientras que la matriz que rodea a los microfibrilastos, teñida de color azul más claro, mostró una abundancia de colágeno del

hospedador. El aumento de alto poder de la sección mostró numerosas células entremezcladas con el ICL. La respuesta inflamatoria observada a los 30 días se había resuelto y la respuesta celular fue predominantemente miofibroblástica. Las células endoteliales revistieron la superficie del injerto remodelado como queda demostrado por medio de SEM y de la tinción de Factor VIII. A los 360 días, se había formado una "neo-arteria" madura. La neo-adventicia estaba formada por haces de colágeno del hospedador poblados con células parecidas a los fibroblastos. Parece que las células y las matrices de la estructura remodelada fueron bastante maduras y de tipo tisular.

Ejemplo 11: Generación de Anticuerpos Anti-ICL

Se obtuvieron muestras nuevas de capa intestinal submucosal porcina tras la etapa de limpieza que se describe en el ejemplo 1 pero no se trataron con ácido peracético. Posteriormente, se dejaron las muestra sin tratar (NC-ICL), se trataron con ácido peracético de 0,1% (PA-ICL) o se trataron con ácido peracético de 0,1% y posteriormente se reticularon con hidrocioruro de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (PA/EDC-ICL).

Se inmunizaron conejos blancos de Nueva Zelanda con 0,5 mg de uno cualquiera de los tres tipos de muestras de ICL (NC-ICL, PA-ICL o PA/EDC-ICL) para generar anti-suero. Inicialmente, se inyectaron por vía subcutánea a los conejos 0,5 ml de ICL no tratado homogeneizado en un adyuvante completo de Freund (1:1, 1 mg/ml). Los conejos simulados recibieron 0,5 ml de disolución salina de tampón de fosfato en adyuvante completo de Freund. Se inyectaron de refuerzo 0,5 ml de la forma apropiada de ICL en adyuvante incompleto de Freund (0,25 mg/ml) a los conejos cada 3 a 4 meses. Se recogieron muestras de suero 10-14 días después de cada refuerzo.

Ejemplo 12: Generación de Extractos de ICL y Caracterización de Proteínas Potencialmente Antigénicas Asociadas al Colágeno Nativo

Se extrajeron proteínas procedentes de NC-ICL, PA-ICL o PA/EDC-ICL usando ácido tartárico (Bellon, G., et al (1988) *Anal Biochem*, 175: 263-273) o TRITON X-100 (Rohm y Haas). Se mezclaron NC-ICL pulverizado, PA-ICL o PA/EDC-ICL (10% peso/volumen) bien con ácido tartárico (ácido tartárico 0,1 M, NaCl 0,5 M) o con tampón de extracción TRITON X-100 (Rohm y Haas) (TEB: TRITON X-100 1% en Tris HCl 20 mM (pH 7,2), EGTA 2 mM, EDTA 2 mM, fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1 mM, y 25 mg/ml de cada una de aprotinina, leupeptina y pepstatina (Sigma, St. Louis, MO)). Se incubaron las muestras durante la noche a 4 °C. Se filtraron sobre un tamiz metálico los extractos para retirar fragmentos, se sometieron a diálisis con PBS y se concentraron usando Centriprep-30 (Amicon, Danvers, MA). Se almacenaron los extractos a -80 °C hasta ser usados.

Se separaron extractos de ácido tartárico y TEB sobre geles de poliacrilamida de 10% por medio de SDS-PAGE de acuerdo con Laemmli (Laemmli, Reino Unido (1970) *Nature* 227: 680-685). Bien se tiñeron los geles con plata (Bio-Rad, Hercules, CA) o bien se transfirieron a membranas de microcelulosa (Amersham, Arlington Heights, IL). Se visualizaron bandas de proteínas múltiples en los extractos NC-ICL por medio de tinción con plata. Por el contrario, únicamente dos bandas resultaron visibles en los extractos PA-ICL y no se observaron bandas de proteínas en las líneas que contenían PA/EDC-ICL. Estos resultados sugieren que el tratamiento con ácido peracético y EDC, en combinación, conduce a una disminución de las proteínas extraíbles que no son de colágeno en ICL.

Se llevó a cabo la inmunotransferencia durante la noche usando una Célula de Transferencia de Blot (Bio-Rad) en un tampón de transferencia de metanol de 20% y Tris Glicina. Se bloquearon las membranas de nitrocelulosa que contenían proteínas transferidas sobre ICL con tampón de Blotto (leche seca no grasa de 1% en disolución salina de tampón de borato con Tween-20 de 0,1% (BBS/Tween)) durante una hora a temperatura ambiente. Se transfirieron las membranas de nitrocelulosa a un aparato de multi-pantalla que contenía 12 líneas individuales. Se lavaron las membranas tres veces con BBS/Tween. Se añadieron sueros de ensayo o de control positivos (100 µl/línea) a la membrana y se agitaron a temperatura ambiente durante 1 hora. Se lavó cada línea tres veces con BBS/Tween. Anticuerpos secundarios: se añadieron Ig anti-conejo de cabra marcado con ALPH o Ig anti-perro de cabra marcado con ALPH (Southern Biotechnology) a las líneas apropiadas (100 µl/línea) y se añadió estreptavidina-AP (100 µl) a una de las líneas que contenía los estándares de peso molecular de Calidoscopio (Bio-Rad). Se usó un estuche de sustrato conjugado de fosfatasa alcalina (Bio-Rad) para visualizar las inmunotransferencias.

Se usó suero de anti-NC-ICL de conejo, generado por medio de inmunización con NC-ICL, para detectar proteínas potencialmente inmunoreactivas. Los sueros de ratones inmunizados reconocieron antígenos con pesos moleculares dentro del intervalo de <30, 40-70 y >100 kDa en el extracto de ácido tartárico. Se sometieron a ensayo estos mismos sueros sobre inmunotransferencias de extractos TEB a partir de NC-ICL. Se detectaron proteínas inmunoreactivas con intervalos de peso molecular similares a los detectados en el extracto de ácido tartárico, con reactividad adicional detectada en el intervalo de 70-100 kDa. Los resultados indicaron que NC-ICL contiene proteínas múltiples que son inmunoreactivas y estas proteínas se pueden extraer por medio de ácido tartárico o TEB. El número elevado de proteínas inmunoreactivas presentes en el extracto de TEB se correlacionó con el aumento de proteínas extraídas usando TEB, en comparación con ácido tartárico.

Ejemplo 13: Efecto del tratamiento de PA o EDC de ICL sobre el Carácter Antigénico del Colágeno de Tipo I en ICL

Se sometieron a ensayo sueros procedentes de ratones inmunizados con NC-ICL, PA-ICL o PA/EDC-ICL (sueros preparados como se describe en el ejemplo 11) o colágeno de tipo I extraído con ácido (Organogenesis, Canton, MA) en cuanto a los anticuerpos específicos de colágeno de tipo I por medio de ELISA. Se revistieron las placas de

ELISA (Immulon II, NUNC, Bridgeport, NJ) con 200 ml/pocillo de colágeno de tipo I extraído con ácido de 1 mg/ml en tampón de carbonato de 0,05 M (pH 9,6) durante la noche a 4 °C. Se lavaron las placas dos veces con PBS/Tween-20 (0,1%). Se añadieron muestras de animales o anticuerpo anti-colágeno de tipo I de conejo (Southern Biotechnology, Birmingham, AL) a los pocillos (100 ml/pocillo) y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente. Se lavaron las placas tres veces con PBS/Tween. Se añadieron anticuerpos secundarios: Ig anti-conejo de cabra marcado con ALPH o IG anti-perro de cabra marcado con ALPH (Southern Biotechnology) a los pocillos apropiados y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. Se lavaron las placas tres veces con PBS/Tween. Se añadió sustrato de P-nitrofenilfosfato (PNPP) (1 mg/ml) a cada pocillo (100 ml/pocillo). Se leyó la absorbancia a 405 nm en un lector de microplacas SpectraMax (Molecular Devices, Sunnydale, CA).

- 5 No fue posible detectar anticuerpos anti-colágeno de tipo I en los sueros procedentes de conejos inmunizados con cualquier forma de ICL, incluso a una dilución de suero de 1:40. Por el contrario, los conejos inmunizados con colágeno de tipo I purificado presentaron un valor de anticuerpos de 1:2560. Estos datos sugieren que la reticulación no resulta necesaria para reducir el carácter antigénico hasta colágeno de tipo I, ya que los conejos inmunizados con NC-ICL no generaron anticuerpos anti-colágeno de tipo I. De este modo, estos datos sugieren que las proteínas inmunodominantes en NC-ICL son proteínas que no son de colágeno. De igual modo, el efecto de PA y EDC sobre la reducción del carácter antigénico de ICL va destinado a las proteínas que no son colágeno.

Ejemplo 14: Efectos de la Desinfección y Reticulación sobre el Carácter Antigénico de ICL

Se determinó el efecto del tratamiento de PA y EDC sobre el carácter antigénico de ICL por medio del uso de antisuero anti-NC-ICL para investigar las proteínas inmunoreactivas presentes en ácido tartárico o en los extractos de TEB de PA o PA/EDC tratado con ICL.

Se separaron los extractos de PA-ICL y los extractos de TEB de PA/EDC-ICL sobre geles SDS-PAGE de 10% y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa para el análisis de inmunotransferencia, como se describe en el Ejemplo 12. Se usaron antisueros específicos de NC-ICL para investigar las proteínas inmunoreactivas en cada extracto. Incluso cuando tuvo lugar la sobre-exposición de las inmunotransferencias de PA-ICL y PA/EDC-ICL, no fue posible detectar reactividad en las líneas que contenían anticuerpos anti-NC-ICL, lo que sugiere de este modo que las proteínas inmunoreactivas detectadas en NC-ICL bien se pierden o bien tiene lugar la modificación de sus epítomos de manera que ya no sean reconocidos por el anti-suero anti-NC-ICL. Para abordar esta última cuestión, también se sometió a ensayo suero procedente de conejos inmunizados bien con PA-ICL o bien con PA/EDC-ICL. No se detectó ninguna unión de anticuerpo en ninguna de las líneas por encima del nivel de fondo. Estos datos indican que incluso cuando se inmunizaron los conejos con ICL modificado no generaron anticuerpos que pudieran reconocer las proteínas extraídas con ICL modificado. Estos resultados sugieren que las proteínas retiradas o modificadas durante el proceso de desinfección y la reticulación son las mismas proteínas responsables del carácter antigénico de NC-ICL.

Se analizó la respuesta de anticuerpos de conejos inmunizados con PA-ICL o PA/EDC-ICL por medio de inmunotransferencia, como se describe en el Ejemplo 12. Se adoptó este enfoque para garantizar que la ausencia de reactividad del suero anti-NC-ICL con PA/EDC-ICL se debía a la ausencia de proteínas en ICL y no se debía a una incapacidad para extraer las proteínas que podrían resultar accesibles para el sistema inmunológico *in vivo*, ya que la reticulación de los materiales de colágeno con EDC podría reducir la cantidad y la calidad de la proteína extraída a partir de ICL. Se generaron anti-sueros anti-ICL usando PA-ICL o PA/EDC-ICL para inmunizar conejos. Se sometieron a ensayo los sueros procedentes de estos conejos desde el punto de vista de los anticuerpos específicos para proteínas bien en ácido tartárico o en extractos de proteína de TEB de NC-ICL. Anti-PA-ICL reconoció las proteínas 207, 170 y 38-24 kDa reconocidas por anti-NC-ICL, pero perdió reactividad frente a las proteínas de peso molecular más bajo. No se detectaron bandas por parte del suero anti-PA/EDC-ICL del conejo 1. El suero procedente de otro conejo anti-PA/EDC-ICL reaccionó con las proteínas de 24-38 kDa. Estos datos sugirieron que tanto PA-ICL como PA/EDC-ICL fueron menos antigénicos que NC-ICL. Se retiraron cada uno de los epítomos antigénicos de ICL durante el proceso de desinfección y reticulación o se modificaron para reducir su carácter antigénico. En cada caso, la desinfección y la reticulación dio lugar a un material cuyo carácter antigénico se vio reducido de forma significativa.

Ejemplo 15: Determinación de la Respuesta Inmunológica Humoral en Receptores de Injerto

Se sometieron a ensayo perros en cuanto a la respuesta inmunológica humoral frente a los componentes de injerto de ICL para determinar si ICL debía conservar su carácter antigénico con el fin de estimular la increscencia celular en el interior del injerto. Se recogieron muestras de sangre de pre-implante y de cuatro a ocho semanas de pos-implante de quince perros sometidos a implantes vasculares de PA/EDC-ICL. Se sometieron a ensayo los anticuerpos del suero procedente de cada muestra de sangre tanto en ácido tartárico como en extractos de TEB de NC-ICL. Incluso a una dilución de suero de 1:40, ninguno de los perros sometidos a ensayo presentó anticuerpos que reaccionaran con proteínas ICL. Se sometieron a ensayo las mismas muestras de suero en cuanto a la presencia de anticuerpos anti-colágeno de tipo I por medio de ELISA. Todas las muestras de suero fueron negativas en cuanto a anticuerpos de colágeno de tipo I a una dilución de suero de 1:40. La tinción de tricromo de Masson de las sección de parafina del explante de estos perros no mostraron infiltración de las células del hospedador. Estos resultados demuestran que PA/EDC-ICL no exhibe respuesta de anticuerpo cuando el hospedador está

remodelando de forma activa el material.

Aunque se ha descrito la invención anterior con cierto detalle a modo de ilustración y ejemplo con fines de claridad y comprensión, es obvio para el experto en la técnica que se pueden poner en práctica ciertos cambios y modificaciones dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

- 1.- Un prótesis que comprende dos o más capas unidas y superpuestas de túnica submucosal de intestino delgado, en el que dicha prótesis es hidrocloreto de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida reticulado y ácido peracético esterilizado.
- 5 2.- La prótesis de la reivindicación 1, en la que la forma de dicha prótesis es plana, tubular o compleja.
- 3.- La prótesis de la reivindicación 1, en la que dichas capas de colágeno están unidas por medio de soldadura térmica durante un tiempo y en unas condiciones suficientes para llevar a cabo la unión de las capas de colágeno.
- 4.- La prótesis de la reivindicación 1, en la que una o más superficies de dicha prótesis está revestida con un material de colágeno que actúa como superficie de flujo suave.
- 10 5.- La prótesis de la reivindicación 1, en la que dicha prótesis además contiene poros.
- 6.- La prótesis de la reivindicación 1, en la que dicha prótesis además está formada por fibras de colágeno cortadas.
- 7.- La prótesis de la reivindicación 1, en la que dicha prótesis además está formada por hilos de colágeno.
- 8.- La prótesis de la reivindicación 7, en la que dichos hilos de colágeno están dispuestos para formar un fieltro, manojo, una urdimbre o trenza.
- 15 9.- La prótesis de cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en la que dichos hilos o fibras de colágeno están parcial o completamente reticulados.
- 10.- La prótesis de la reivindicación 1, en la que dicha prótesis contiene de manera adicional un anti-coagulante; uno o más antibióticos, o uno o más factores de crecimiento.
- 11.- La prótesis de la reivindicación 1, en la que la túnica submucosal del intestino delgado es porcina.
- 20 12.- La prótesis de la reivindicación 10, en la que el anti-coagulante es heparina.
- 13.- Una prótesis como la de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en la que la prótesis es un parche vascular.
- 14.- Una prótesis como la una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en la que la prótesis es un parche intra-cardíaco.
- 25 15.- Una prótesis como la de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en la que la prótesis es una eslinga de soporte de para vejiga o una eslinga de soporte para útero.
- 16.- Una prótesis como la de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en la que la prótesis es un dispositivo de restitución de válvula cardíaca.
- 30 17.- Una prótesis como la de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en la que la prótesis es un parche para pared abdominal.
- 18.- Una prótesis como la de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en la que la prótesis es un parche para reparación pericárdica.
- 19.- Una prótesis como la de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en la que la prótesis es un parche para reparación de hernias.
- 35 20.- Una prótesis como la de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en la que la prótesis es un dispositivo de restitución de discos intervertebrales.
- 21.- Una prótesis como la de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en la que la prótesis es una estructura de injerto vascular.
- 40 22.- Un método para preparar una prótesis que tiene dos o más capas de túnica submucosal de intestino delgado unidas y superpuestas, que comprende:
- (a) esterilizar las capas unidas de túnica submucosal usando una disolución de ácido peracético; y
- (b) reticular las capas unidas de túnica submucosal con hidrocloreto de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida.
- 45 23.- El método de la reivindicación 22, en el que las capas están unidas por medio de soldadura térmica, en el que dicha soldadura térmica es desde 50 °C hasta 75 °C, más preferentemente desde 60 °C hasta 65 °C, y del modo

más preferido a 62 °C.

24.- El método de la reivindicación 22, en el que dicho enfriamiento se consigue por medio de inactivación.

25.- El método de acuerdo con la reivindicación 23, en el que dicha soldadura térmica se consigue durante un tiempo de 7 minutos a 24 horas, preferentemente de 1 hora.