

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 488 766**

51 Int. Cl.:

C14C 1/06 (2006.01)
A61F 2/02 (2006.01)
A61F 2/28 (2006.01)
A61F 2/80 (2006.01)
A01N 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.01.2003 E 03703926 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.08.2013 EP 1476583**

54 Título: **Fijación resistente a la calcificación**

30 Prioridad:

25.01.2002 US 351996 P

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

28.08.2014

73 Titular/es:

**BIOMEDICAL DESIGN, INC. (100.0%)
SUITE 214, 2161 NEW MARKET PARKWAY S.E.
MARIETTA, GA 30067-9310, US**

72 Inventor/es:

**GIRARDOT, JEAN-MARIE y
GIRARDOT, MARIE-NADIA**

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 488 766 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

Fijación resistente a la calcificación

5 Campo de la invención

Esta invención se refiere a un proceso para la fijación de un tejido humano o animal antes de su implantación y, más especialmente, a un proceso de fijación en el que se fija un tejido con la mínima retracción para hacer que dicho tejido sea adecuadamente resistente a la degradación enzimática y de manera que también sea resistente a la calcificación.

Antecedentes de la invención

Con frecuencia se produce calcificación de las válvulas bioprotésicas conservadas o «fijadas» con glutaraldehído, lo que conlleva un fracaso debido a estenosis e insuficiencia. Además, la lenta liberación de glutaraldehído a partir del dispositivo implantado es citotóxica. Se han presentado varios procedimientos de entrecruzamiento o fijación de tejidos que no dependen de glutaraldehído y entre ellos se incluyen azida de acilo, fotooxidación, epoxi, genipina y carbodiimida. Esta última se describe en la patente de EE. UU. N.º 5.733.339 presentada el 31 de marzo de 1998. Sin embargo, es sabido que se produce retracción del tejido durante la fijación y no se ha perfeccionado todavía ningún procedimiento de entrecruzamiento que evite por completo la retracción del tejido (J. Heart Valve Dis. 2001; 10(1): 111-124). Aunque puede que esto no sea especialmente preocupante con respecto a determinado pericardio o tejido que pueda adaptarse tras la fijación, sí que puede que sea un problema para las valvas de la raíz aórtica porcina donde la interconexión precisa, es decir, coaptación, es muy importante y la retracción excesiva puede inducir la coaptación insuficiente de las valvas que puede hacer que la válvula no sea funcional. Por tanto, sigue existiendo la necesidad de mejorar la tecnología de fijación que induzca solo la mínima retracción del tejido y continúa la búsqueda de esta tecnología.

Resumen de la invención

Se ha encontrado un procedimiento de fijación mejorado basado en el tratamiento con carbodiimida hidrosoluble que tiene como resultado un tejido que presenta un entrecruzamiento tan eficaz como el del tejido fijado en glutaraldehído, pero que muestra solo una retracción mínima como resultado de la fijación y que, sorprendentemente, muestra una mejora de la resistencia a la calcificación tras su implantación en un mamífero.

En un aspecto más en particular, la invención proporciona un proceso de fijación de un tejido animal para hacerlo adecuado para su implantación en mamíferos vivos, comprendiendo dicho proceso una fijación en una etapa mediante el tratamiento de dicho tejido animal con una cantidad eficaz de un agente de conjugación que favorezca la formación de enlaces amida entre restos carboxilo reactivos y restos amino reactivos, en combinación con un potenciador de conjugación y con un agente de entrecruzamiento que contenga al menos dos restos amino reactivos, estando presente dicho agente de entrecruzamiento diamina en una cantidad de al menos 80 milimolar y realizándose dicho tratamiento de manera que tenga como resultado la formación de enlaces amidados entre dicho agente de entrecruzamiento y restos reactivos portados por las moléculas de dicho tejido animal. Por tanto, dicho tejido se hace resistente a la digestión con proteasa a la vez que produce solo una mínima reducción de la superficie durante la fijación y siendo el tejido fijado muy resistente a la calcificación.

En otro aspecto en particular, la invención proporciona un proceso de fijación de un tejido animal fresco para hacerlo adecuado para su implantación en mamíferos vivos, comprendiendo dicho proceso lavar, pero sin alterar de ninguna otra forma, el tejido escindido de un animal donante, tratar dicho tejido animal lavado con una cantidad eficaz de un agente de entrecruzamiento que contenga al menos dos restos amina reactivos y un agente de conjugación en combinación con un potenciador de conjugación, que favorece la formación de enlaces amida entre restos carboxilo reactivos y restos amina reactivos, estando presente dicho agente de entrecruzamiento diamina en una cantidad de al menos 80 milimolar y realizándose dicho tratamiento de manera que tenga como resultado la formación de enlaces amidados entre dicho agente de entrecruzamiento y restos reactivos portados por las moléculas de dicho tejido animal. Por tanto, dicho tejido se hace resistente a la digestión con proteasa a la vez que se produce solo una mínima reducción de la superficie durante la fijación y por lo cual el tejido fijado es muy resistente a la calcificación.

En un aspecto adicional en particular, la invención proporciona una prótesis formada al menos parcialmente por un tejido animal que contiene entrecruzamientos entre y dentro de las moléculas proteicas de dicho tejido, comprendiendo dichos entrecruzamientos enlaces amida entre restos reactivos de dicho tejido y enlaces amida adicionales entre restos reactivos de dicho tejido y los agentes de entrecruzamiento diamina que tienen una cadena de carbono con una longitud de al menos 4 átomos de carbono, obteniéndose dicho entrecruzamiento sometiendo dicho tejido a una solución acuosa que contenga una cantidad eficaz de un agente de conjugación hidrosoluble que favorece la formación de enlaces amida, un potenciador de conjugación y una concentración de entre 80 y 130 milimolar de dicho agente de entrecruzamiento diamina.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es una imagen de una valva aórtica porcina en la que se muestran puntos que indican las marcas realizadas para medir la cantidad de reducción de superficie que se produce durante la fijación.

La figura 2 es una gráfica en la que se muestra el efecto de la duración de la fijación tras la desnaturalización térmica de las valvas porcinas.

La figura 3 es una gráfica en la que se muestra la resistencia a la digestión con enzimas proteolíticas del tejido de la pared y de las valvas, en relación con la duración de la fijación.

La figura 4 es una gráfica en la que se muestra la resistencia a la digestión con colagenasa del tejido de la pared y de las valvas, en relación con la duración de la fijación.

10

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

El proceso de fijación básico con el que tiene que ver la presente invención se describe en la patente de EE. UU. N.º 5.733.339. Sorprendentemente se ha encontrado que, mediante un aumento muy sustancial de la cantidad de agente de entrecruzamiento diamina, pueden obtenerse efectos considerables usando el proceso de entrecruzamiento de cardiodiimida básico.

Según se usa en este documento, el término «tejido bioprotésico» pretende incluir cualquier órgano o tejido que deriva en su totalidad o en parte de un humano o animal, o que se produce a partir de otro tejido orgánico, y que es para implantarse, por sí mismo o como parte de una bioprótesis, en un humano o en una animal. Por tanto, el término generalmente incluye tejido bioprotésico como corazones, válvulas cardíacas u otros componentes cardíacos, pericardio, injertos vasculares, componentes de vías urinarias y de la vejiga urinaria, tendones, intestinos y tejidos blandos en general, como piel, colágeno y similares. Aunque el tejido protésico con mucha frecuencia será uno obtenido a partir de tejidos naturales, lo que incluye, aunque sin limitaciones, tejido bovino, ovino, porcino y posiblemente incluso humano, también se pueden usar otros materiales naturales bien conocidos por los expertos en la materia.

El procedimiento de fijación en una etapa descrito en este documento consiste en estabilizar el tejido bioprotésico mediante la unión de restos carboxilo reactivos del tejido a un resto amina reactivo en el tejido o a un agente de entrecruzamiento, de manera que se dejen pocos restos activos sobre o dentro del tejido.

El término «entrecruzamiento», como se usa en este documento, se refiere a la fijación de tejido bioprotésico que es el resultado de la formación de enlaces de diversas longitudes dentro y entre las moléculas del tejido, como enlaces que resultan de la formación de enlaces amida a) entre dos restos reactivos del tejido, formándose así enlaces covalentes cortos dentro y entre las moléculas del tejido o b) entre restos reactivos del tejido y un agente de entrecruzamiento unido covalentemente.

El término «agente de entrecruzamiento» se usa en este documento para describir una diamina que tiene al menos dos grupos amina primarios libres, preferiblemente en cada uno de sus extremos, que es capaz de formar enlaces amida con grupos carboxilo en el tejido animal proteico. Preferiblemente debe ser una cadena lineal o un compuesto ramificado que tenga de 4 a 12 átomos de carbono; alternativamente, pero quizás menos deseable, se pueden emplear compuestos carbocíclicos en los que los restos amina reactivos se localizan apropiadamente en el anillo, como por ejemplo 2,4,6-triaminobenceno. Más preferiblemente, se elige un agente de entrecruzamiento di- o triamino que tiene un peso molecular de aproximadamente 190 o menos y preferiblemente aproximadamente 150 o menos, de manera que se asegure una penetración adecuada en el tejido fresco que normalmente se está tratando. Más preferiblemente, es una cadena lineal de 6 a 8 átomos de carbono de longitud con una amina reactiva localizada en cada extremo. Aunque el agente de entrecruzamiento puede tener sustituciones opcionales en toda su longitud, es preferiblemente un hidrocarburo que está sustituido solo con las aminas reactivas, por ejemplo, una cadena lineal alcano que tiene aminas en cada extremo. Los agentes preferidos son 1,6-hexanodiamina y 1,7-heptanodiamina.

Los términos «agente de conjugación» y «potenciador de conjugación», como se usan en este documento, se refieren a reactivos que favorecen y potencian la formación de enlaces amida. Estos enlaces se pueden formar entre una amina reactiva y un carboxilo reactivo en el tejido (uniéndose así dos grupos reactivos que están próximos), o entre una amina reactiva en un agente de entrecruzamiento y un carboxilo reactivo sobre o dentro del tejido. Los expertos en la síntesis de péptidos y técnicas relacionadas estarán familiarizados con dichos reactivos, por ejemplo, carbodiimidas y succinimidas hidrosolubles.

El agente de conjugación usado en las realizaciones preferidas es clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC), aunque se pueden usar otros agentes de conjugación adecuados como N-hidroxisuccinimida. El potenciador de conjugación preferido usado, cuando se usa EDC como agente de conjugación, es N-hidroxisulfosuccinimida (sulfo-NHS), aunque se pueden usar en su lugar otros potenciadores de conjugación adecuados, como NHS, HOBt y DMAP. La concentración del agente de conjugación y del potenciador de conjugación puede variar. No obstante, los expertos en la materia pueden determinar fácilmente las concentraciones apropiadas. Preferiblemente, el agente de conjugación se usa a una concentración de entre 10 mM y 500 mM, y lo más preferible a 100 mM o menos y, más preferiblemente, entre 20 mM y 50 mM. El potenciador de

conjugación se emplea preferiblemente entre 0,5 mM y 50 mM y más preferiblemente a 10 mM o menos.

- Los agentes de entrecruzamiento, el agente de conjugación y el potenciador de conjugación, así como sus productos de reacción, son preferiblemente hidrosolubles. Se deben seleccionar para maximizar la fijación y optimizar el entrecruzamiento del tejido, a la vez que se minimicen los riesgos de daño al tejido protésico durante el proceso de fijación, y de toxicidad, inflamación, calcificación, etc. después de la implantación. Todas las soluciones usadas para el entrecruzamiento se filtran preferiblemente antes de su uso a través de filtros de 0,45 µm o menos para minimizar el riesgo de contaminación.
- 10 Las condiciones de reacción para el entrecruzamiento de la prótesis pueden variar dependiendo de los agentes de entrecruzamiento, conjugación y potenciación empleados. En general, el proceso de entrecruzamiento se realiza en un tampón acuoso seleccionado entre aquellos bien conocidos por los expertos en la materia en cuanto a proporcionar la reacción de entrecruzamiento más eficaz, a la vez que minimice los riesgos de calcificación. Entre los ejemplos de tampones adecuados se incluyen, aunque sin limitaciones, ácido N-2-hidroetilpiperazina-N'-etanosulfónico (HEPES) y ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico (MOPS) y similares.

- El pH y la concentración de la solución tamponada pueden variar, de nuevo dependiendo de los agentes de entrecruzamiento, conjugación y potenciación empleados. Preferiblemente, la concentración y el pH del tampón se seleccionan para proporcionar la reacción de entrecruzamiento más eficaz, siendo a la vez lo menos perjudicial para la prótesis. Por ejemplo, con EDC como agente de conjugación y sulfo-NHS como potenciador de conjugación, el pH de la solución de tratamiento se mantiene entre 6,0 y 7,4. La temperatura de reacción puede estar entre 40 y 0°C; preferiblemente, la reacción se realiza simplemente a temperatura ambiente, por ejemplo, entre 21 y 25°C.

- Normalmente, el tejido protésico fresco que se va a fijar mediante el procedimiento de entrecruzamiento en una etapa de la presente invención se mantiene en hielo hasta que se pueda lavar varias veces con solución salina al 0,85% o alguna otra solución adecuada enfriada en hielo. Preferiblemente, dicho lavado se realiza inmediatamente después de ser escindido del animal donante, aunque en cualquier caso en el plazo de 72 horas y preferiblemente en el plazo de 48 horas. Si es necesario un tiempo adicional de conservación, el tejido lavado se conserva después, aunque preferiblemente no más de 24 horas, en un tampón apropiado a una temperatura baja, como 4°C. No se requiere ni deseable ningún otro pretratamiento que pudiera alterar las propiedades de dicho tejido fresco.

- Se ha encontrado que la sorprendente mejora de las propiedades del dispositivo bioprotésico fijado resultante es el resultado del uso de un gran exceso del agente de entrecruzamiento especificado por encima de la cantidad necesaria para fijar con eficacia el tejido bioprotésico. Se ha encontrado sorprendentemente que cuando se usa 4 a 5 veces más agente de entrecruzamiento diamina, en comparación con la cantidad más alta mencionada en la patente '339, para tratar el tejido fresco no tratado de otro modo (excepto por el lavado), se obtienen mejoras significativas sin ningún cambio perjudicial en otras propiedades ventajosas del producto resultante. Más específicamente, la reducción del área superficial que se produce durante la fijación, denominada en adelante en este documento «reducción de superficie», es de más del 50% y la resistencia del producto a la calcificación aumenta considerablemente. Estas ventajas se obtienen sin ningún cambio desventajoso en la desnaturalización térmica, resistencia a la digestión con proteasas o resistencia a la digestión con colagenasa.

- La concentración del agente de entrecruzamiento diamina está preferiblemente entre 80 y 135 milimolar, más preferiblemente entre 90 y 130 milimolar, aún más preferiblemente entre 95 y 125 milimolar y lo más preferible entre 100 y 125 milimolar. Como se indica previamente, el agente de entrecruzamiento diamina preferido tiene una longitud de la cadena de carbonos no superior a 12 átomos de carbono, por ejemplo, entre 4 y 8 átomos de carbono, más preferiblemente es una cadena lineal alcanos que tiene grupos amina en sus respectivos extremos y más preferiblemente es 1,6-hexanodiamina. El tratamiento del tejido animal se realiza preferiblemente mediante la aplicación de una solución acuosa que contiene el agente de conjugación, el potenciador de conjugación y la diamina de entrecruzamiento. Las concentraciones del agente de conjugación hidrosoluble, preferiblemente EDC, y el potenciador de conjugación, preferiblemente sulfo-NHS, son como se describe previamente, en concreto entre 10 nM y 100 nM de EDC y entre 0,5 nM y 10 nM de sulfo-NHS.

- Por supuesto es bien sabido que antes de que pueda implantarse un dispositivo bioprotésico en un mamífero, principalmente un ser humano, debe esterilizarse y esto se realiza normalmente como etapa final antes de su acondicionamiento. En consecuencia, con frecuencia es importante que el tejido que de forma ventajosa sufrió solo una reducción de superficie mínima durante la fijación, no se retraiga posteriormente durante la esterilización. Es por supuesto de especial importancia para el tratamiento de las válvulas cardíacas de sustitución o similares en donde la coaptación puede verse negativamente afectada (a diferencia de materias primas que posteriormente serán adaptadas como válvulas). En las solicitudes internacionales publicadas WO 98/34650 (13 de agosto de 1998) y WO 01/10209 (15 de febrero de 2001) se describen procesos de esterilización especialmente eficaces para material bioprotésico. Se ha demostrado que los materiales bioprotésicos, cuando se someten a fijación seguido de esterilización durante 48 horas a 40°C en una solución acuosa de EDC 25 mM, muestran solo una reducción de superficie mínima, lo que aún sigue siendo cierto si dicha esterilización se repite tres veces. Dicha prueba empleando la repetición del procedimiento de esterilización es meramente como precaución; en ocasiones, cuando los dispositivos bioprotésicos están siendo esterilizados, si al final del proceso el indicador que se incluye con el lote

sigue siendo positivo, cualquiera que sea el motivo, puede ser necesario repetir el procedimiento de esterilización y, en ocasiones excepcionales, incluso hasta dos veces. En consecuencia, se considera prudente medir la reducción de superficie del tejido que se ha sometido a dichas condiciones un tanto extremas. También se encontró que no se produciría una retracción significativa si la esterilización se realizaba en tratamiento con una solución que contenga isopropanol al 20% y agua tamponada al 80%, es decir, EDC 25 mM y etanolamina 100 mM (un bloqueante) durante 48 horas a 40°C.

Los siguientes ejemplos describen experimentos que se realizaron para demostrar la eficacia de la invención y describen el mejor modo actualmente conocido por los inventores. Sin embargo, debe entenderse que estos ejemplos no limitan el alcance de la invención en tanto que los límites de la invención se establecen en las reivindicaciones adjuntas al presente documento.

Ejemplo 1

Este primer experimento se realizó para demostrar el efecto de la concentración de 1,6-hexanodiamina sobre la reducción de la superficie durante el entrecruzamiento.

Se escindieron 80 valvas a partir de raíces aórticas porcinas frescas. Cada una de las valvas se secó sobre papel absorbente para eliminar el exceso de tampón y se colocaron planas con la cara interna hacia abajo sobre una superficie de vidrio. Con ayuda de un microscopio de disección equipado con una retícula, las valvas se marcaron posteriormente en las direcciones radial y circunferencial como se muestra en la figura 1, con colorante para marcaje de tejidos siguiendo las recomendaciones del fabricante. La distancia entre el punto central y cada uno de los cuatro puntos exteriores era de 5 mm antes del entrecruzamiento; por tanto, la distancia máxima entre las marcas era de 10 mm. Las valvas se distribuyeron a continuación de forma aleatoria en cuatro grupos de 20 valvas cada uno y se realizó el entrecruzamiento mediante la incubación en las condiciones siguientes:

Grupo 1. Solución acuosa de 1,6-hexanodiamina (DIA) 11,25 mM en tampón HEPES 20 mM, pH 6,5 que contenía 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) 20 mM y N-hidroxisulfosuccinimida (sulfo-NHS) 1 mM durante 96 horas a temperatura ambiente.

Grupo 2. Igual que el grupo 1, pero se uso DIA 62 mM.

Grupo 3. Igual que el grupo 1, pero se uso DIA 112,5 mM.

Grupo 4. Las valvas se incubaron siguiendo un procedimiento de dos etapas según la patente '339. El primer paso era idéntico al del grupo 1 durante 48 horas, al que le siguió un segundo paso de incubación con ácido subérico (ASU) 7,5 mM en presencia de EDC 20 mM/sulfo-NHS 1 mM.

Una vez completado el entrecruzamiento, las distancias entre las marcas se midieron de nuevo usando un microscopio equipado con una retícula para las direcciones radial y circunferencial para calcular la reducción de la superficie. Antes de cada uso se calibró el microscopio. Se calculó la reducción del tamaño y los resultados se presentan en la tabla 1.

Tabla 1

N.º grupo, condiciones	Reducción de superficie en % del original (media +/- ETM)
1. DIA = 11,25 mM	8,00 +/- 0,9
2. DIA = 62 mM	6,60 +/- 1,3
3. DIA = 112,5 mM	2,73 +/- 0,81
4. DIA 11,25/ASU 7,5 mM	12,2 +/- 0,9

En este experimento, las muestras fijadas en dos etapas, es decir, el grupo 4, mostraron una reducción del 12% del área superficial en comparación con solo aproximadamente el 3% en el grupo 3. En un experimento con condiciones comparables, se encontró que la retracción de las valvas fijadas en glutaraldehído era del 5% y superior. Los resultados demuestran que se consigue una reducción significativa de la retracción de las valvas con el aumento de la concentración de DIA, un resultado que es superior a la fijación en glutaraldehído que ha sido el método de referencia en la industria durante al menos dos decenios.

Ejemplo 2

El siguiente experimento se realizó para determinar el efecto de una concentración de DIA superior a 112,5 mM en el entrecruzamiento.

Se escindieron 21 valvas para cada una de las condiciones a partir de raíces aórticas porcinas frescas. Para cada una de las condiciones, siete raíces más sus tres respectivas valvas escindidas se incubaron durante 96 horas a temperatura ambiente en 250 ml de una solución acuosa de HEPES 20 mM y DIA a una concentración de 112,5 mM o de 160 mM, en presencia de EDC 20 mM y sulfo-NHS 1 mM. Tras la incubación, las muestras se lavaron con solución salina estéril y, a continuación, se esterilizaron tres veces durante 48 horas a 40°C con EDC 25 mM en

ausencia (0%) de alcohol isopropílico o en presencia de alcohol isopropílico al 5% o 20%. Para una de las condiciones se añadió etanolamina 100 mM como bloqueante durante la esterilización con una solución que contenía isopropanol al 20%.

5 Los resultados se presentan en la tabla 2 y demuestran que tres tratamientos de esterilización consecutivos de las valvas fijadas con DIA 112,5 mM, en ausencia de alcohol isopropílico, no induce una retracción significativa del tejido, es decir, en comparación con la tabla 1 para DIA 112,5 mM. La esterilización con la adición de alcohol al 5 o al 20% no tiene como consecuencia la retracción; sin embargo, la adición de etanolamina 100 mM cuando se estaba llevando a cabo la esterilización en presencia de alcohol isopropílico al 20% (cuando la retracción, por otro parte, debería ser mayor) inhibe significativamente la retracción debida a la esterilización repetida. Los datos también indican que el aumento de la concentración de DIA a 160 mM durante la etapa de entrecruzamiento inducía una retracción del tejido del 14% que se mantenía (el cual no se vio afectado durante la esterilización en ausencia o presencia de alcohol isopropílico); este grado de retracción era mucho mayor que el resultante de los tratamientos de fijación convencionales.

15

Tabla 2

DIA mM	Alcohol isopropílico %	Reducción de superficie en % del original (media +/- ETM)
112,5 mM	0	3,3 +/- 1,3
112,5 mM	5	6,7 +/- 1,2
112,5 mM	20	8,3 +/- 1,4
112,5 mM	20 + «bloqueante»	4,3 +/- 1,3
160 mM	0	14,6 +/- 1,3
160 mM	5	14,0 +/- 1,4
160 mM	20	14,2 +/- 1,3

Ejemplo 3

20

El siguiente experimento se realizó para determinar el efecto de la duración de la incubación sobre el entrecruzamiento de las válvulas aórticas porcinas desde tres puntos de vista diferentes.

Se incubaron cinco grupos de 4 válvulas cada uno en una solución acuosa que contenía HEPES 20 mM, DIA 25 112,5 mM, pH 6,5, EDC 20 mM y sulfo-NHS 1 mM durante 3, 6, 24, 48 y 96 horas. Las válvulas se lavaron después con solución salina estéril para eliminar cualquier bioproducto de la reacción. Se conservaron en HEPES 10 mM, cloruro sódico al 0,85%, pH 7,4 y alcohol isopropílico al 20% hasta su uso. Las pruebas de desnaturalización térmica y las pruebas de resistencia a la degradación proteolítica con colagenasa y con proteasa se realizaron para la determinación de la eficacia del entrecruzamiento. Los procedimientos de estas pruebas se describen en J. Heart 30 Valve Dis. 1996; 5(5):518-25. Como control se utilizaron raíces aórticas porcinas frescas.

a. Desnaturalización térmica

Las valvas se escindieron a partir de raíces aórticas y se sometieron (n = 3 por condición) a pruebas de estabilidad 35 térmica como se describe en la referencia anterior. Los resultados se muestran en la figura 2 e indican que el entrecruzamiento del tejido de las valvas se produce razonablemente rápido, consiguiéndose la máxima estabilidad a la desnaturalización térmica en aproximadamente 24 horas de incubación y produciéndose en consecuencia pocos cambios.

40 b. Resistencia a la digestión con proteasa

Las valvas (9 por condición) y los fragmentos de pared aórtica (12 por condición) se sometieron a digestión con proteasa a 50°C durante 24 horas según la prueba descrita en la referencia anterior. Los resultados se presentan en la figura 3 e indican que la resistencia máxima a la digestión tanto de las valvas como de la pared aórtica se produce 45 aproximadamente 24 horas después del entrecruzamiento.

c. Resistencia a la digestión con colagenasa

Las valvas (9 por condición) y los fragmentos de pared aórtica (12 por condición) se sometieron a digestión con colagenasa a 37°C durante 72 horas según la prueba descrita en la referencia anterior. Los resultados que se muestran en la figura 4 demuestran que la resistencia máxima se obtiene de forma sustancial aproximadamente 24 horas después de la fijación y esta resistencia solo se mejora mínimamente como resultado del tratamiento durante otro periodo de 24 horas.

55 Ejemplo 4

Después de los buenos resultados obtenidos en el ejemplo 3, se realizó un experimento para comparar el entrecruzamiento del tejido usando EDC y DIA 112 mM con el tejido fijado en glutaraldehído convencional, usando generalmente las mismas pautas de la prueba que en el ejemplo 3.

- 5 Las raíces aórticas porcinas se entrecruzaron usando una solución acuosa de DIA 112 mM, tampón HEPES 20 mM, pH 6,5, EDC 20 mM y sulfo-NHS 1 mM. Después de 96 horas de incubación a temperatura ambiente, las válvulas se lavaron minuciosamente con solución salina estéril para eliminar los reactivos que no habían reaccionado y cualquier bioproducto de la reacción. Las válvulas se esterilizaron tres veces según el procedimiento de esterilización del ejemplo 2, usando isopropanol al 20%. Las raíces aórticas porcinas fijadas en glutaraldehído convencional o sin fijar se obtuvieron de Medtronic Heart Valves en Santa Ana, CA. Las valvas y los fragmentos de pared aórtica (5 mm × 5 mm) se escindieron y sometieron a las pruebas de entrecruzamiento como se describen de forma general en el ejemplo 3. Además, las valvas y los fragmentos de pared aórtica se implantaron bajo la dermis en ratas jóvenes durante 8 semanas para evaluar la resistencia a la calcificación.

15 a. Desnaturalización térmica

Los resultados de la desnaturalización térmica de las valvas se presentan en la tabla 4A. La temperatura de desnaturalización térmica para las valvas frescas (es decir, sin fijar) y para las valvas fijadas en glutaraldehído se encontró que era de 65,5°C y 84,9°C, respectivamente, lo que coincide con los resultados previos de la prueba. La temperatura de desnaturalización térmica determinada para las valvas entrecruzadas con EDC es de 80,5°C, lo que representa un aumento significativo de 15°C sobre la del tejido fresco. Aunque es ligeramente menor que la de las valvas fijadas en glutaraldehído, se considera que es totalmente aceptable. Esta temperatura más baja de desnaturalización, junto con las diferencias cinéticas mencionadas previamente, indica que el entrecruzamiento con EDC en presencia de DIA 112 mM induce entrecruzamientos diferentes a los de la fijación con glutaraldehído.

25

Tabla 4A

Temperatura de desnaturalización (°C, media +/- ETM)		
Entrecruzamiento con EDC (n=6)	Fijado en glutaraldehído (n=6)	Fresco (n=4)
80,5 +/- 0,3	84,9 +/- 0,4	65,5 +/- 0,1

b. Resistencia a la digestión con proteasa

30

Para esta prueba se usó una solución ligeramente más concentrada que la solución de la prueba habitual; se disolvieron 242 mg de pronasa en 250 ml de solución, en lugar de 150 mg. Los resultados de la resistencia a la digestión con proteasas se presentan en la tabla 4B. El tejido fresco se digería completamente después de 24 horas de incubación. No existen diferencias significativas entre la fijación con carbodiimida usando esta concentración alta de diamina y el entrecruzamiento convencional con glutaraldehído tanto para las valvas como para la pared aórtica con respecto a la resistencia a la digestión con proteasa. Estos resultados sugieren que este procedimiento de entrecruzamiento es tan eficaz como la fijación con glutaraldehído.

35

Tabla 4B

40

Resistencia a la digestión con proteasa (% peso remanente, media +/- ETM)			
	Entrecruzamiento con EDC	Fijado en glutaraldehído	Fresco
Valvas (n=12)	72,0 +/- 2,4	75,3 +/- 4,2	0
Pared aórtica (n=12)	28,0 +/- 0,8	26,3 +/- 2,1	0

c. Resistencia a la digestión con colagenasa

Los resultados de la resistencia a la digestión con colagenasa se muestran en la tabla 4C. Las valvas frescas, compuestas principalmente de colágeno, se digieren completamente; sin embargo queda una parte significativa de las paredes aórticas. Con respecto a las valvas, no existen diferencias significativas entre el tejido fijado en EDC y el tejido fijado en glutaraldehído; sin embargo, parece que el tejido de la pared fijado en glutaraldehído es ligeramente menos resistente a la digestión con colagenasa que el tejido fijado en EDC. En conjunto, los resultados muestran que el tejido entrecruzado con EDC y DIA 112 mM es al menos tan resistente a la colagenasa como el tejido entrecruzado con glutaraldehído.

50

Tabla 4C

Resistencia a la digestión con colagenasa (% peso remanente, media +/- ETM)			
	Entrecruzamiento con EDC	Fijado en glutaraldehído	Fresco
Valvas (n=12)	94,6 +/- 5,6	97,6 +/- 5,7	0
Pared aórtica (n=12)	96,2 +/- 0,8	79,7 +/- 5,5	72,0 +/- 0,9

d. Calcificación 8 semanas después de la implantación en ratas jóvenes.

5

Las valvas y los fragmentos de pared (1 cm x 1 cm) se disecaron a partir de raíces aórticas porcinas esterilizadas. Las muestras se lavaron tres veces durante 2 minutos con solución salina estéril y, a continuación, se implantaron aleatoriamente bajo la dermis en ratas jóvenes. Transcurridas 8 semanas, las muestras se recuperaron, se lavaron y se sometieron a un análisis cuantitativo de calcio, como se describe en la referencia mencionada anteriormente.

10

Tabla 4D

Calcificación (mg de Ca ⁺⁺ /g de muestra seca, media +/- ETM)		
	Entrecruzamiento con EDC	Fijado en glutaraldehído
Valvas (n=9)	11,2 +/- 6,8	216,5 +/- 5,8
Pared aórtica (n=9)	39,9 +/- 2,6	82,1 +/- 4,6

Los resultados presentados en la tabla 4 D indican que el tejido entrecruzado con EDC en presencia de DIA 15 112 mM, ya fueran valvas o paredes aórticas, es significativamente más resistente a la calcificación que el tejido fijado en glutaraldehído.

Asimismo, la calcificación de las paredes aórticas no solo era significativamente menor que la del tejido de la pared aórtica fijado en glutaraldehído, sino que también era menor que la del tejido de la pared aórtica comparable fijado 20 como se describe en la patente '339. El nivel de calcio referido anteriormente en el tejido de la pared 8 semanas después de la implantación está ligeramente por debajo de los niveles observados previamente solo 4 semanas después de la implantación. Previamente se describió que 8 semanas después de la implantación, la concentración de calcio en dichas paredes aórticas estaba en torno a 80 mg de Ca⁺⁺ por gramo de muestra, nivel que es sustancialmente el doble del observado ahora en la presente muestra y que se considera clínicamente significativo.

25

Los resultados obtenidos en los ejemplos anteriores muestran la eficacia de la invención a la hora de minimizar la reducción en el área superficial que se produce como consecuencia de una fijación en una etapa que se ha realizado para mejorar las características del material bioprotésico, por ejemplo, su desnaturalización térmica, su resistencia a la digestión con proteasa y su resistencia a la digestión con colagenasa. A este respecto, durante los 30 últimos decenios, la fijación con glutaraldehído ha sido el método de referencia generalmente aceptado y, por tanto, puede hacerse la comparación justificadamente con la fijación con glutaraldehído del mismo tejido. Así, se ha demostrado que las características del tejido tratado usando el proceso de fijación mejorado se compara favorablemente con las características del mismo tejido cuando se trata con glutaraldehído durante 7 días en estos tres aspectos. En el ejemplo 3 se muestra también que parece que los efectos de la fijación usando este proceso se 35 maximizan esencialmente después de la incubación durante aproximadamente 24 a 48 horas y que puede no ser necesario un tratamiento adicional, aunque no es perjudicial. Este plazo de 24 horas para la obtención del entrecruzamiento final también se puede contrastar con otros procedimientos de entrecruzamiento que se completan sustancialmente después de una o dos horas de duración, lo que indica que es muy probable que se produzca un entrecruzamiento diferente, ya que el presente proceso se basa en la penetración profunda en el tejido fresco con el 40 tiempo. Por consiguiente, aunque se puede ver que se obtiene una mejora muy sustancial de las propiedades después del tratamiento durante 8 horas, la fijación con concentración alta de amina EDC se realiza a temperatura ambiente durante un periodo de al menos 24 horas. Quizás, la mejora más considerable que se produce es la resistencia a la calcificación, lo que en muchos aspectos es una de las características más importantes de un dispositivo bioprotésico, considerando que la calcificación se ha demostrado que es una de las causas principales de 45 fallo de las válvulas cardíacas protésicas que da lugar a estenosis e insuficiencia en su funcionamiento. Aunque la fijación mediante el proceso descrito en la patente '339 previa proporcionaba algunas mejoras en la resistencia a la calcificación sobre el tejido bioprotésico fijado en glutaraldehído comparable, en la tabla 4 D se muestra que el tejido de la pared aórtica tiene una resistencia a la calcificación de aproximadamente el doble en comparación con la del tejido fijado en glutaraldehído y que las valvas tratadas de este modo muestran una resistencia casi 20 veces mayor. 50 Esta sorprendente resistencia a la calcificación se espera que proporcione una durabilidad extremadamente valiosa a los dispositivos bioprotésicos, incluido el tejido tratado según esta invención.

Aunque el tratamiento se realiza preferiblemente usando una solución acuosa, podrían usarse en su lugar otros solventes biocompatibles o combinaciones de solventes, como se conoce generalmente en la técnica.

55

REIVINDICACIONES

1. Un proceso de fijación de un tejido animal para hacerlo adecuado para su implantación en mamíferos vivos, comprendiendo dicho proceso una fijación en una etapa mediante el tratamiento de dicho tejido animal con una cantidad eficaz de un agente de conjugación que favorezca la formación de enlaces amida entre restos carboxilo reactivos y restos amino reactivos, en combinación con un potenciador de conjugación y con un agente de entrecruzamiento que contenga al menos dos restos amino reactivos, estando presente dicho agente de entrecruzamiento diamina en una cantidad de al menos 80 milimolar y realizándose dicho tratamiento de manera que tenga como resultado la formación de enlaces amidados entre dicho agente de entrecruzamiento y restos reactivos portados por las moléculas de dicho tejido animal.
2. El proceso de la reivindicación 1 en el que dicho agente de entrecruzamiento diamina tiene una cadena de carbono de al menos 4 átomos de carbono.
3. El proceso de la reivindicación 2 en el que dicho agente de entrecruzamiento es 1,6-hexanodiamina.
4. El proceso de la reivindicación 3 en el que dicha hexanodiamina está presente a una concentración de entre 100 y 125 milimolar.
5. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en el que dicho agente de entrecruzamiento y dicho agente de conjugación son hidrosolubles.
6. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en el que dicho agente de conjugación es EDC.
7. El proceso de la reivindicación 6, en el que dicho tratamiento se realiza durante al menos 24 horas a temperatura ambiente.
8. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en el que el tejido fresco se lava y, a continuación, se trata en el plazo de 72 horas desde la escisión del tejido.
9. Una prótesis formada al menos parcialmente por un tejido animal que contiene entrecruzamientos entre y dentro de las moléculas proteicas de dicho tejido, comprendiendo los entrecruzamientos enlaces amida entre restos reactivos de dicho tejido y enlaces amida adicionales entre restos reactivos de dicho tejido y agentes de entrecruzamiento diamina que tienen una cadena de carbono con una longitud de al menos 4 átomos de carbono, obteniéndose dicho entrecruzamiento sometiendo dicho tejido a una solución acuosa que contiene una cantidad eficaz de un agente de conjugación hidrosoluble que promueve la formación de enlaces amida, un potenciador de conjugación y una concentración de entre 80 y 130 milimolar de dicho agente de entrecruzamiento diamina.

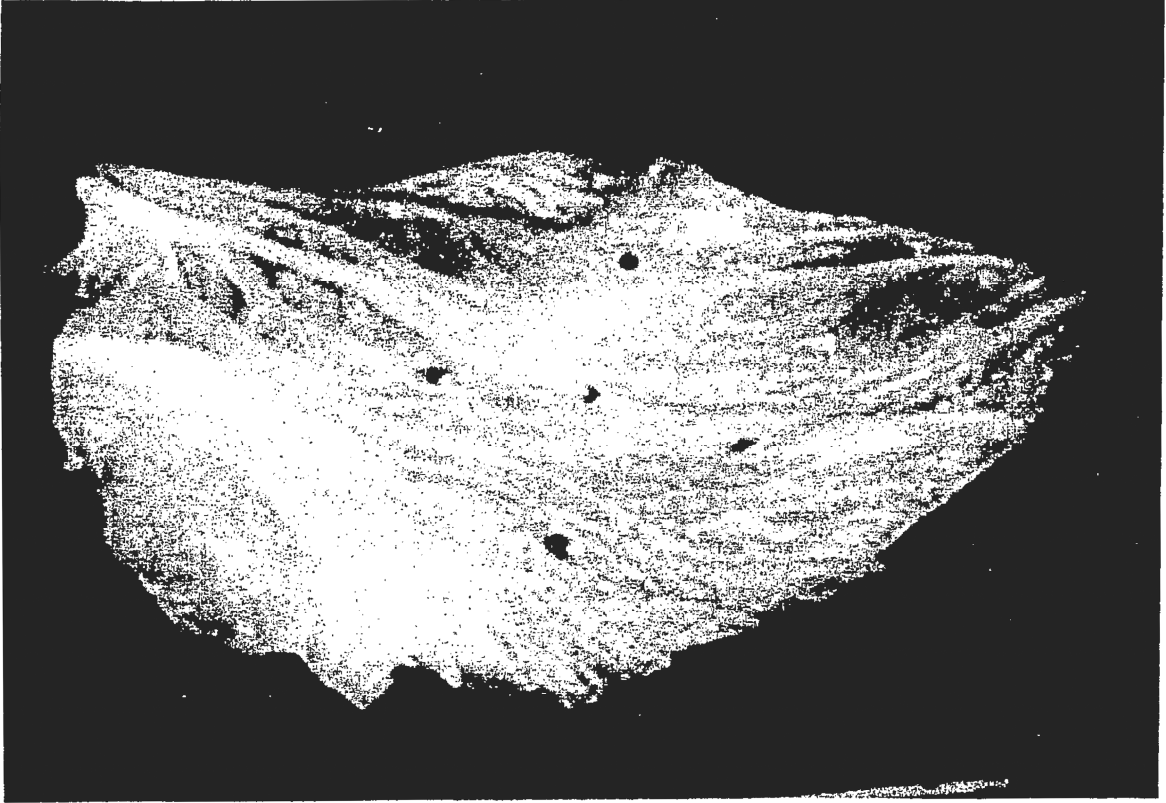


FIG. 1

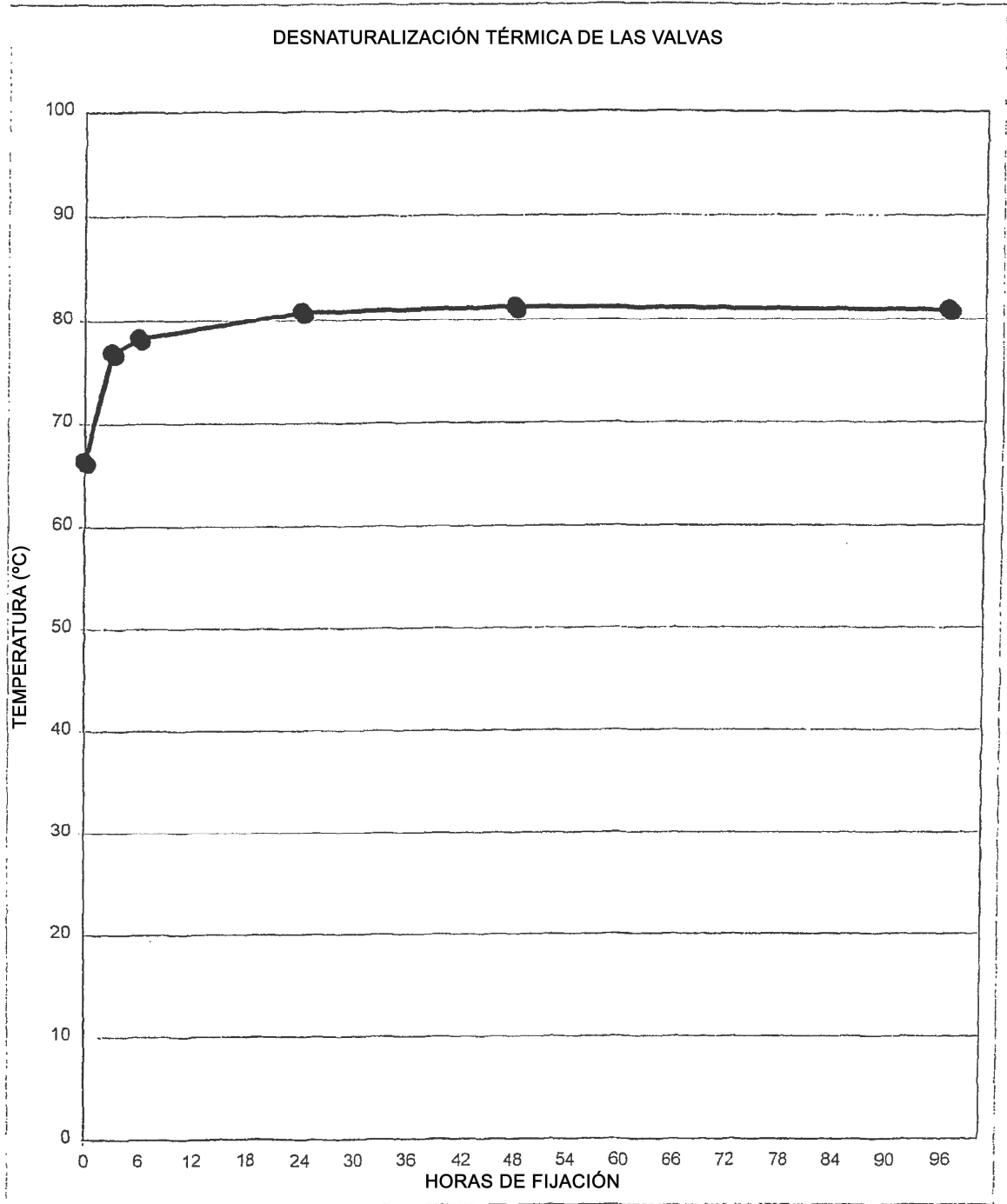


FIG. 2

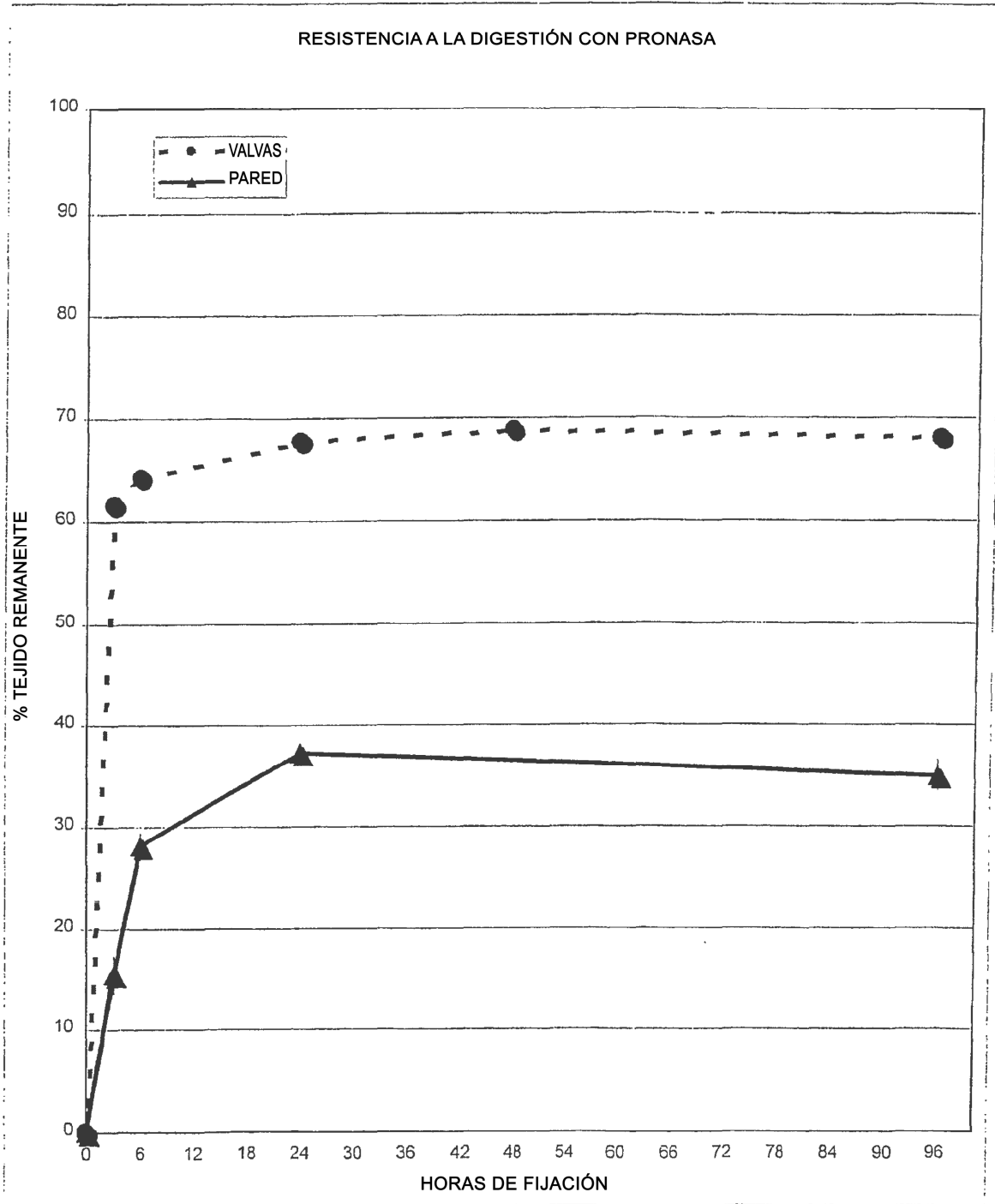


FIG. 3

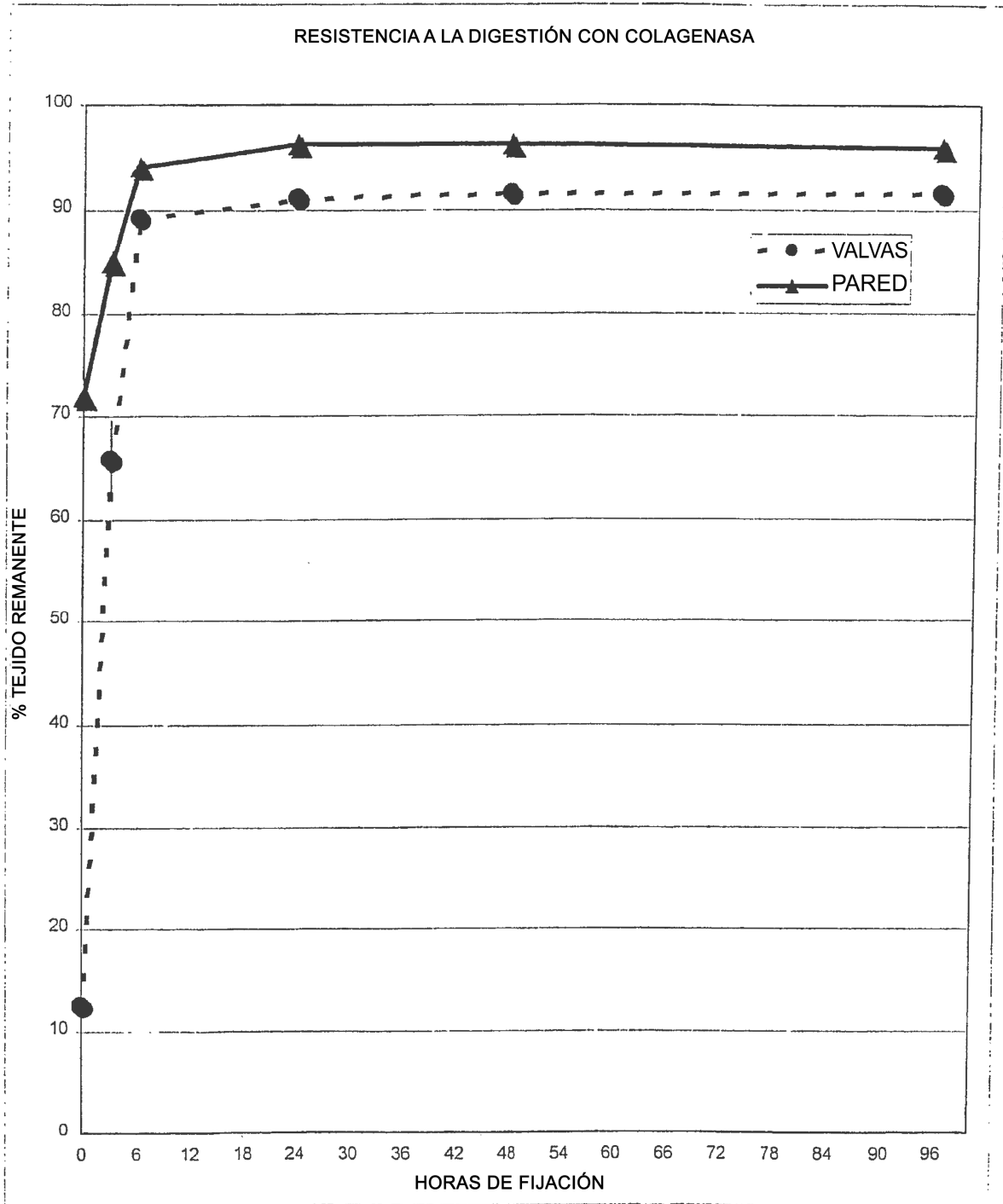


FIG. 4