

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 540 602**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/50** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.02.2013 E 13154536 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.03.2015 EP 2626701**

54 Título: **Método para detectar un xenoantígeno en tejidos fijados usados como sustituciones bioprotésicas**

30 Prioridad:

**09.02.2012 IT PD20120029**

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

**10.07.2015**

73 Titular/es:

**BIOCOMPATIBILITY INNOVATION S.R.L.S.  
(100.0%)**

**Via E. Petrella, 4  
35132 Padova, IT**

72 Inventor/es:

**NASO, FILIPPO;  
GANDAGLIA, ALESSANDRO;  
SPINA, MICHELE y  
GEROSA, GINO**

74 Agente/Representante:

**RUO, Alessandro**

**ES 2 540 602 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

Método para detectar un xenoantígeno en tejidos fijados usados como sustituciones bioprotéticas

5 **Campo de la invención**

[0001] La invención se refiere a un método para la detección de un xenoantígeno, en particular el epítotope  $\alpha$ -Gal, en tejidos xenógenos fijados, en particular tejidos fijados con glutaraldehído, que pueden emplearse para fabricar sustituciones bioprotéticas para su uso en el campo clínico humano.

10

**Antecedentes de la invención**

[0002] Avances recientes en la ingeniería del tejido en la bioprótesis proporcionaron un refuerzo sustancial en este sector, tanto comercialmente como clínicamente, para investigar nuevos escenarios con el fin de contribuir a la mejora mundial de las curas sanitarias.

15

[0003] En tal sentido, el área de interés cardiovascular debe considerarse simbólica, tanto en términos del impacto social como sanitario y del procedimiento establecido para la sustitución de válvulas del corazón.

20

[0004] De hecho, la disfunción de las válvulas del corazón tiene un alto impacto sobre la población en el mundo ya que hay varias causas etiológicas. Las modificaciones del aparato valvular inducidas por fenómenos inflamatorios (tales como enfermedades reumáticas), afecciones infecciosas (tales como endocarditis) o degenerativas (degeneración mixoide, distrofia cálcica) pueden inducir alteración funcional y morfológica (estenosis o insuficiencia) con alteración grave de la circulación sanguínea, frecuentemente incompatible con la propia vida. El impacto de estas valvulopatías sobre la salud pública también está ligado a la correlación entre la etiología degenerativa y el envejecimiento progresivo de la población. Las encuestas epidemiológicas más recientes llevadas a cabo en Europa y en EE.UU. [1] muestran una prevalencia de estenosis aórtica de moderada-grave en el 4,6 % de la población de edad >75 años, que alcanza el 8,1 % después de los 85 años de edad. Desde el momento en que se vuelve sintomática o determina disfunción ventricular izquierda, la estenosis aórtica es una enfermedad con mal pronóstico a corto plazo.

25

30

[0005] El descubrimiento de la "máquina corazón-pulmón" en los años 60 permitió a la función cardíaca ser bloqueada temporalmente mediante el uso de circulación extracorpórea, permitiendo así operaciones quirúrgicas sobre un músculo cardíaco sin movimiento. Por tanto, la tecnología biomédica ha sido capaz de desarrollarse y aplicarse quirúrgicamente para sustitutos de prótesis de válvulas adecuados para imitar la función natural de válvulas nativas y no patológicas. Actualmente, la sustitución de válvulas es la terapia por elección apta para mejorar el pronóstico de los pacientes y mejorar significativamente su calidad de vida.

35

[0006] La prótesis de válvula ideal debe permitir un flujo transvalvular comparable al de la válvula sana nativa correspondiente, con una larga vida útil y que no genere efectos hemolíticos o trombogénicos. Como estas características son generalmente difíciles de obtener cuando se condensan en un único dispositivo, las actuales prótesis de válvulas cardíacas comerciales resultan de modificaciones coherentes y mejoras constantes que están todavía en curso. Tales prótesis, disponibles para fines clínicos, se dividen en prótesis mecánicas, biológicas y de homoinjerto. Las prótesis mecánicas generalmente no encuentran ninguna degeneración con el tiempo, sin embargo requieren terapia anticoagulante. No pueden ser repobladas por células, ya que no proporcionan un soporte biológico que promueva la unión de células. Esto compromete la posibilidad de una remodelación estructural y así, por ejemplo, un aumento en el tamaño en relación con el crecimiento del cuerpo del paciente. Pueden durar durante hasta aproximadamente 20 años, a partir de entonces deben sustituirse debido a la formación de panículo fibroso, no compatible con la motilidad de las valvas.

40

45

50

[0007] Por otra parte, homoinjerto significa una prótesis de válvula no xenógena recogida durante autopsias de corazones no adecuados para el trasplante de órganos enteros, que pertenecen a individuos de edades entre 18 y 65. Incluyen una porción de aproximadamente 5-6 cm de la aorta ascendente o arteria pulmonar y el anillo fibroso de la propia válvula. Las ventajas de estas bioprótesis, una vez implantadas, son debidas a su excelente perfil hemodinámico y bajo riesgo tromboembólico y de infección. Además, los homoinjertos no requieren terapia de anticoagulación. Sin embargo, estos tipos de bioprótesis tienen duración limitada en el tiempo: la degeneración de homoinjertos resulta de fenómenos de distrofia cálcica de un modo que es inversamente proporcional a la edad del receptor (este aspecto es debido a una elevada movilización fisiológica del calcio, que en pacientes pediátricos y jóvenes está asociada al desarrollo del aparato esquelético). Además, el alto número de hospitalizaciones, que requieren cirugía de sustitución de la válvula, y la baja disponibilidad de tales prótesis biológicas (obtenidas de donantes fallecidos), las hace insuficientes en número para cumplir la demanda clínica.

55

60

[0008] Debido a estos inconvenientes, las válvulas más comúnmente usadas como sustitución están representadas por prótesis biológicas que se derivan de tejidos xenógenos, en particular que se derivan de válvulas de cerdo o de pericardio bovino o equino. Estas bioprótesis se producen tanto con un medio semirrígido que soporta el anillo fibroso y se usa como anclaje en procedimientos quirúrgicos (bioprótesis con endoprótesis) como sin tal

65

medio de soporte (bioprótesis sin endoprótesis). La circulación sanguínea a través de estas bioprótesis es fisiológicamente similar a la de las válvulas nativas y la terapia después de la sustitución de la válvula no requiere fármacos anticoagulantes o antiplaquetarios. Sin embargo, tienen la desventaja de encontrarse con procesos de distrofia cálcica degenerativa (bioprótesis de cerdo), degeneración con rotura de las valvas (prótesis pericárdica) y demuestran una mayor sensibilidad hacia infecciones endocárdicas. Estas bioprótesis se tratan normalmente con agentes químicos, tales como glutaraldehído, con el fin de mejorar las características mecánicas mientras que se reduce la antigenicidad del tejido intrínseco, permitiendo la preservación de las mismas.

**[0009]** También pueden tratarse con protocolos de descalcificación (que pretende disminuir el riesgo de deposición de cristales de hidroxiapatita tras el implante) o agentes detoxificantes, mediante la saturación de cualquier sitio aldehídico de glutaraldehído que todavía es reactivo. Las bioprótesis, de tanto origen porcino como bovino/equino, se han dividido en bioprótesis de 1ª generación (tejidos fijados con glutaraldehído a alta presión) y 2ª generación (glutaraldehído a baja presión con la adición de tensioactivos que bloquean los sitios de unión del calcio), teniendo ambas una duración promedio de 10-14 años.

**[0010]** Como se ha mencionado previamente, todas las prótesis de válvula biológicas (con la excepción de homoinjertos) son de origen xenógeno. El tejido xenógeno pertenece a un organismo de una especie distinta del hombre; estos materiales poseen antígenos de superficie específicos tolerables exclusivamente dentro de las mismas especies de origen, pero incompatibles en el caso de una implantación humana en la que, si no se tratan adecuadamente, desencadenarían la cascada de activación del complemento con agregación de plaquetas, generando una situación similar a la que se produce en el caso de incompatibilidad de grupos sanguíneos. Esta reacción se conoce como rechazo hiperagudo y se produce en aproximadamente treinta minutos. El principal factor responsable de este impresionante mecanismo de rechazo es el xenoantígeno  $\alpha$ -Gal. Este epítipo es un digalactósido (galactosa-alfa 1,3-galactosa) presente sobre glucoproteínas y glucolípidos de la membrana, principalmente de células endoteliales, aunque también se encontró sobre tipos de células tales como monocitos, granulocitos [2] y glóbulos rojos [3] y en distritos de tejido importantes tales como las regiones miocárdicas [4] y de hueso [5]. El epítipo alfa-Gal se expresa constitutivamente en todos los mamíferos, con la excepción de primates superiores y seres humanos [6] que, debido a mutaciones que se producen durante el proceso evolutivo, son incapaces de sintetizar la enzima  $\alpha$ -1,3-galactosil-transferasa, responsables de enlazar el epítipo a las glucoproteínas y glucolípidos de la membrana de los componentes celulares. Además, los seres humanos expresan anticuerpos dirigidos contra este antígeno desde el nacimiento como resultado de una estimulación continua inducida por la flora bacteriana intestinal (principalmente *Escherichia coli*, pero también *Klebsiella pneumoniae* y *Serratia marcescens*) [6]. El 1-3 % de todas las inmunoglobulinas circulantes en el ser humano (isotipos IgG, IgA e IgM) están específicamente dirigidos hacia el xenoantígeno  $\alpha$ -Gal.

**[0011]** Actualmente, la biocompatibilidad de los tejidos xenógenos previstos para su uso en la fabricación de bioprótesis de válvula se obtiene tratando dispositivos con el glutaraldehído anteriormente mencionado. Más específicamente, este agente químico es un aldehído bifuncional, que incluye 5 átomos de carbono, introducido en la práctica biomédica al final de los años 60; el glutaraldehído reacciona con los grupos  $\epsilon$ -amino de residuos de lisina induciendo la formación de una red de enlaces químicos que pretenden estabilizar los tejidos, previniendo la degradación enzimática de los mismos y enmascarando antígenos de superficie celular del sistema inmunitario del receptor.

**[0012]** A pesar de este tratamiento, se ha mostrado que el epítipo  $\alpha$ -Gal (solo cualitativamente y solo con referencia al componente celular individual) sigue siendo sensible en bioprótesis de válvula comercializadas [7], causando después del implante un aumento en el título de anticuerpos anti- $\alpha$ -Gal tanto en pacientes pediátricos como adultos [8]. Además, parece que el complejo antígeno-anticuerpo participa directamente en promover la deposición de sales de calcio [9].

**[0013]** Recientemente, los inventores desarrollaron una prueba de ELISA (enzimoinmunoanálisis de adsorción) que pretende determinar la cantidad de epítopos  $\alpha$ -Gal en tanto tejidos xenógenos frescos como después del tratamiento de descelularización, e identificar un procedimiento que pueda eliminar cualquier xenoantígeno  $\alpha$ -Gal presente en el tejido nativo [10].

**[0014]** El problema para detectar xenoantígenos  $\alpha$ -Gal en tejido fijado ya se ha afrontado en la bibliografía científica.

**[0015]** Konakci KZ et al. [7] desvelan un método para la determinación de los xenoantígenos  $\alpha$ -Gal que comprende una incubación con conjugados de vimentina/lectina IB4 y detección inmunohistoquímica de los conjugados unidos.

**[0016]** McGregor CG et al. [11] también desvelan un método para la determinación de los xenoantígenos  $\alpha$ -Gal que comprende una incubación con conjugados de *Griffonia simplicifolia*-lectina IB4, pero reconocen el problema de unir anticuerpos anti- $\alpha$ -Gal a tejidos fijados con glutaraldehído en ratones GTKO.

**[0017]** Simionescu DT [12] y EP075337 [13] desvelan que los grupos reactivos con aldehído de tejidos fijados con

glutaraldehído podrían neutralizarse con aminos reactivas, tales como, por ejemplo, glutamina, glicina, ácido homocistéico y lisina.

5 [0018] Sin embargo, sigue sin resolverse el problema de determinar cuantitativamente este epítotope en tejidos fijados, en particular con glutaraldehído, y principalmente usados para la fabricación de bioprótesis.

[0019] Por tanto, es un fin de la presente invención el desarrollo de un método para detectar el xenoantígeno  $\alpha$ -Gal en tejidos fijados, de manera que tengan una herramienta de control capaz de asegurar y validar la producción de tejidos "libres de  $\alpha$ -Gal" previstos para la producción de bioprótesis para uso clínico.

10 **Resumen**

[0020] Para el fin anteriormente mencionado, los inventores han desarrollado un nuevo método para la cuantificación del epítotope  $\alpha$ -Gal en tejidos fijados, haciendo cambios al método para determinar este antígeno por medio del uso de un anticuerpo monoclonal (producido por ratón) desarrollado sobre tejidos no fijados frescos.

[0021] Para permitir la detección de  $\alpha$ -Gal en tejidos fijados, es de hecho necesario inactivar los grupos reactivos libres del glutaraldehído que podrían interaccionar con el anticuerpo monoclonal anti- $\alpha$ -Gal, generando positivos falsos. Esta inactivación puede garantizarse tratando el tejido que va a analizarse con ácido homocistéico.

20 [0022] En un primer aspecto, un método para determinar el xenoantígeno alfa-Gal en tejidos fijados, es, por tanto, el objetivo de la presente invención, comprendiendo dicho método al menos las etapas de:

- someter una muestra de un tejido fijado a tratamiento de inactivación con ácido homocistéico;
- 25 - detectar el epítotope  $\alpha$ -Gal por medio de un inmunoensayo de ELISA con un anticuerpo monoclonal anti- $\alpha$ -Gal primario;

cuantificar el epítotope  $\alpha$ -Gal por medio de detección por absorbancia a 450 nm de la señal generada por la cantidad libre residual de dicho anticuerpo monoclonal y hacer reaccionar con un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa y comparación con una línea de calibración.

30 [0023] Aún, es otro objetivo de la invención el kit para llevar a cabo el método para la determinación de la cantidad de xenoantígeno  $\alpha$ -Gal en tejidos fijados que van a usarse como sustituciones bioprotésicas.

35 [0024] El método, las posibles realizaciones y las ventajas del mismo, también, se aclararán por descripción detallada de la invención que sigue y con la ayuda de realizaciones de ejemplo de la misma proporcionadas a modo de un ejemplo no limitante de la invención.

40 **Breve descripción de los dibujos**

[0025]

45 Figura 1: Línea de calibración que correlaciona los diferentes  $\mu$ g de anticuerpo monoclonal anti- $\alpha$ -Gal primario reactivo durante el periodo de incubación (el eje y) con el logaritmo de las diferentes concentraciones correspondientes de glóbulos rojos de conejo (abscisa). Cada glóbulo rojo, como se indica por la bibliografía, expresa  $2 \times 10^6$  epítotoses  $\alpha$ -Gal sobre su superficie.

50 Figura 2: Evaluación del grado de saturación del fondo de la placa obtenido mediante recubrimiento hecho con tres tampones diferentes. El eje x muestra diferentes diluciones del anticuerpo monoclonal anti- $\alpha$ -Gal primario original: [1:100] - [1:50] - [1:30] - [1:20], el eje y muestra la absorbancia relativa para cada concentración previamente mencionada obtenida por lectura a 450 nm. PBS: solución salina tamponada con fosfato, CBC: tampón carbonato/bicarbonato, TBS: tampón Tris/NaCl.

**Descripción detallada de la invención**

55 [0026] El método para determinar el epítotope alfa-Gal según la invención es aplicable a un amplio intervalo de sustitutos tales como dispositivos bioprotésicos útiles en el campo clínico humano, y en particular a sustitutos tales como dispositivos bioprotésicos derivados de tejidos de origen pericárdico porcino y bovino o equino, fijados con glutaraldehído según los procedimientos de cada fabricante.

60 [0027] El método de la invención, que comprende al menos las etapas de:

- someter una muestra de un tejido fijado a un tratamiento de inactivación con ácido homocistéico;
- detectar el epítotope  $\alpha$ -Gal por medio de un inmunoensayo de ELISA con un anticuerpo monoclonal anti- $\alpha$ -Gal primario;
- 65 - cuantificar el epítotope  $\alpha$ -Gal por medio de detección por absorbancia a 450 nm de la señal generada por el

anticuerpo monoclonal anti- $\alpha$ -Gal libre residual y comparación con una línea de calibración,

puede comprender opcionalmente, antes de determinar el epítotope  $\alpha$ -Gal, la etapa adicional de:

- 5 - producir una línea de calibración usando glóbulos rojos de conejo para la determinación cuantitativa del epítotope  $\alpha$ -Gal tras la detección por absorbancia a 450 nm de la señal de la señal del anticuerpo monoclonal anti- $\alpha$ -Gal libre residual.

10 **[0028]** El método puede llevarse a cabo en una realización del mismo según el protocolo cuyas condiciones esenciales se describen a continuación:

- 15 - preparar una muestra de un tejido fijado con glutaraldehído y tratar la misma para inactivación con una disolución de ácido homocistéico en solución salina tamponada con fosfato (PBS) a un pH de entre 6,0 - 8,0 y a una concentración de entre 50 mM y 200 mM (límite de saturación); la concentración de ácido homocistéico es preferentemente 100 mM;
- 20 - inmunoen ensayo por ELISA sobre la muestra inactivada tras la incubación con un anticuerpo monoclonal anti- $\alpha$ -Gal primario.

20 **[0029]** El anticuerpo monoclonal anti- $\alpha$ -Gal primario para el ensayo de ELISA es un anticuerpo monoclonal que puede obtenerse, por ejemplo, en ratones por inmunización con glóbulos rojos de conejo. Este anticuerpo, que pertenece a la familia IgM, tiene una estructura pentámera característica que permite la creación de inmunocomplejos de gran dimensión que pueden separarse por centrifugación. Los términos "anticuerpo monoclonal" y "anticuerpo anti- $\alpha$ -Gal" usados en el presente documento identifican en cualquier caso un anticuerpo monoclonal dirigido exclusivamente contra el epítotope  $\alpha$ -Gal útil para el método de la invención como anticuerpo primario en la etapa del ensayo de ELISA. Preferentemente, para la etapa del inmunoen ensayo de ELISA, el anticuerpo monoclonal anti- $\alpha$ -Gal primario es un anticuerpo de ratón, mientras que el anticuerpo secundario es un anticuerpo policlonal conjugado con la enzima peroxidasa y dicho anticuerpo policlonal es preferentemente un anticuerpo de conejo anti-ratón.

30 **[0030]** El método, objetivo de la invención, se desarrolló con el anticuerpo monoclonal anti- $\alpha$ -Gal comercializado por Axxora (Nottingham, RU) y se identificó como M86, que es preferible, aunque el propio método no puede ni restringirse ni limitarse al producto comercial anterior que contiene este anticuerpo monoclonal anti- $\alpha$ -Gal en la implementación del mismo.

35 **[0031]** En la realización del método para la determinación del epítotope  $\alpha$ -Gal es preferible realizar un recubrimiento de la placa (recubrir significa cubrir el fondo de los pocillos) con 50  $\mu$ l por pocillo de epítotope  $\alpha$ -Gal/albumina de suero humano (HSA) o con epítotope  $\alpha$ -Gal/albumina de suero bovino (BSA). El uso de albumina de suero humano es, sin embargo, preferible ya que su alternativa bovina, que contiene constitutivamente epítotope  $\alpha$ -Gal, aumenta el ruido de fondo observado en el momento de la lectura espectrofotométrica. Estas disoluciones (epítotope  $\alpha$ -Gal/HSA o epítotope  $\alpha$ -Gal/BSA) se usan a una concentración comprendida entre 2,5 - 15  $\mu$ g/ml. Se usa preferentemente la concentración de 5  $\mu$ g/ml.

40 **[0032]** Pueden usarse los siguientes tampones para la disolución de recubrimiento: solución salina tamponada con fosfato (PBS) [NaCl 136 mM, KCl 2 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 4 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 mM], pH 7,0-8,0; tampón carbonato/bicarbonato (CBC) [NaHCO<sub>3</sub> 35 mM, NaCO<sub>3</sub> 15 mM] a pH 9,0-10,0; tampón Tris/NaCl (TBS) [Tris 50 mM, 0,9 % de NaCl], pH 7,0-8,0. Sin embargo, se obtiene saturación mejorada de la placa con el uso de los tampones CBC y TBS, que son, por tanto, preferibles al tampón PBS. Se logra saturación óptima con el tampón TBS, que así debe usarse preferentemente como una alternativa a CBC.

50 **[0033]** La cuantificación del epítotope  $\alpha$ -Gal no está preferentemente dirigida y se obtiene calculando los anticuerpos monoclonales anti- $\alpha$ -Gal que quedan en el sobrenadante y que no han reaccionado con el epítotope  $\alpha$ -Gal del tejido fijado. Estos anticuerpos monoclonales anti- $\alpha$ -Gal libres se hacen reaccionar con anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa y se lee la absorbancia a 450 nm de los inmunocomplejos así formados por un espectrómetro. Las expresiones "señal de anticuerpo monoclonal libre" o "señal de cantidad libre de anticuerpo monoclonal anti- $\alpha$ -Gal" se usan en el presente documento con referencia a la señal que se deriva de estos inmunocomplejos.

60 **[0034]** En una realización preferida, el método objetivo de la invención proporciona que las diferentes etapas se llevan a cabo en las condiciones descritas en detalle a continuación.

#### Preparación de muestras de tejido fijado y tratamiento con ácido homocistéico

**[0035]** Se lavan rápidamente muestras de tejido recogido de las bioprótesis con tampón fosfato (PBS) estéril, para eliminar el exceso de glutaraldehído presente en la disolución de preservación de la bioprótesis, y se incuban con

ácido homocistéico 100 mM en PBS estéril (pH 6,0 - 8,0). Esta incubación se realiza con dos etapas, cada una de 12 horas (con sustitución del tampón con una disolución nueva después de las primeras 12 horas) bajo agitación constante, en la oscuridad a temperatura ambiente, preferentemente comprendida entre 15 y 20 °C.

5 **[0036]** A continuación, la muestra se lava dos veces, cada vez durante 15 minutos, en PBS estéril (pH 7,0 - 8,0) a temperatura ambiente. Se seca rápidamente sobre papel de filtro especial y se pesa en balanzas analíticas.

**[0037]** El tratamiento de material biológico con ácido homocistéico, antes del ensayo de ELISA, se define como la etapa de inactivación que pretende saturar los residuos químicos del glutaraldehído sin conjugar todavía reactivo. Así, este procedimiento permite la interacción entre grupos  $\alpha$ -Gal con el anticuerpo monoclonal anti- $\alpha$ -Gal, evitando la generación de falsos positivos.

Ensayo de ELISA: Incubación con anticuerpo monoclonal anti- $\alpha$ -Gal

15 **[0038]** Cada muestra se marca y se corta en pequeños trozos que pesan entre 30 y 50 mg; se añade a la misma muestra de anticuerpo monoclonal anti- $\alpha$ -Gal primario en PBS estéril [1:50] v/v y se deja incubar bajo agitación moderada a 37 °C durante 2 horas (volumen final entre 1,5 y 2,5 ml). A continuación, la muestra se centrifuga a 14.340 rpm durante 30 minutos a +4 °C.

20 Ensayo de ELISA: Preparación de pocillos de placa

**[0039]** Se hace un recubrimiento con 50  $\mu$ l por pocillo de epítipo  $\alpha$ -Gal/albumina de suero humano (HSA) a 5  $\mu$ g/ml en tampón TBS (pH 7,0 - 8,0) sobre una placa de 96 pocillos. La placa se cubre posteriormente con película protectora para prevenir cualquier fenómeno de evaporación, y se incuba durante 90 minutos a 37 °C en la oscuridad. A continuación se realizaron 3 lavados con 250  $\mu$ l por pocillo de PBS estéril (pH 7,4) a temperatura ambiente. El primer lavado se dejó reposar durante 5 minutos, los dos lavados posteriores durante 3 minutos.

**[0040]** Se lleva a cabo el procedimiento de bloqueo (etapa esencial en ensayos de ELISA para hacer el plástico inerte a micro-áreas más específicas del fondo del pocillo que pueden haber quedado libres del procedimiento de recubrimiento saturado) con 250  $\mu$ l por pocillo de 1,5 % de HSA en peso/volumen en PBS estéril, seguido de cubrir la placa con película protectora e incubación durante 2 horas a temperatura ambiente, en la oscuridad. A continuación se llevan a cabo 3 lavados adicionales con PBS estéril como se ha explicado anteriormente.

Preparación de la curva de calibración con diferentes concentraciones de eritrocitos de conejo

35 **[0041]** Se aíslan los eritrocitos de sangre de conejo completa por el método clásico, se resuspenden en disolución isotónica estéril (pH 7,4) a 4 °C y se cuentan mediante una cámara Bürker. La línea de calibración se desarrolla con once concentraciones diferentes (expresadas como nº de glóbulos rojos/2 ml) de glóbulos rojos;  $30,5 \times 10^6$ ,  $16 \times 10^6$ ,  $8 \times 10^6$ ,  $4 \times 10^6$ ,  $2 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $0,4 \times 10^6$ ,  $0,2 \times 10^6$ ,  $0,1 \times 10^6$ ,  $0,05 \times 10^6$  y  $0,025 \times 10^6$ . A continuación se preparan once tubos de ensayo que contienen las diferentes concentraciones (2 ml finales) y se incuban con la preparación de anticuerpo monoclonal anti- $\alpha$ -Gal diluida original [1:50] v/v en PBS estéril durante 2 horas a 37 °C bajo agitación constante. A continuación, las muestras se centrifugaron a 14.340 rpm durante 30 minutos a +4 °C.

Ensayo de ELISA: Determinación del antígeno  $\alpha$ -Gal

45 **[0042]** Se añadieron 100  $\mu$ l del sobrenadante, recogidos de cada muestra que va a analizarse previamente incubado con el anticuerpo monoclonal anti- $\alpha$ -Gal y de cada disolución de glóbulos rojos a diferentes concentraciones, a cada pocillo. La placa se carga ocupando los pocillos de una columna entera para cada muestra y a continuación la placa se cubre con película protectora y se incuba durante la noche a 4 °C en la oscuridad. A continuación se llevan a cabo 3 lavados con PBS estéril como se ha explicado anteriormente. Se añaden 100  $\mu$ l por pocillo de una disolución de anticuerpo secundario (policlonal de conejo anti-ratón) conjugado con la enzima peroxidasa [1:500] v/v en PBS estéril; a continuación, la placa se cubre con película protectora y se incuba a 37 °C en la oscuridad durante 2 horas. Se llevan a cabo 3 lavados con PBS estéril como antes. Se añaden 100  $\mu$ l por pocillo de una disolución de revelador para la enzima peroxidasa (o-fenilendiamina 200  $\mu$ moles en tampón fosfato-citrato y perborato de sodio); la adición va seguida de la cubrición de la placa con película protectora, y por la incubación durante 30 minutos en la oscuridad. A continuación, la placa se lee en un lector de placas a 450 nm para detectar la cantidad de anticuerpo libre.

60 **[0043]** El ensayo desarrollado es del tipo indirecto: la muestra que va a analizarse se incuba con una cantidad conocida de anticuerpo monoclonal anti- $\alpha$ -Gal primario (anticuerpo monoclonal dirigido exclusivamente contra el epítipo  $\alpha$ -Gal). Los inmunocomplejos creados se separaron por centrifugación. A continuación se realiza la dosificación de los anticuerpos monoclonales anti- $\alpha$ -Gal primarios que quedan libres en disolución (concretamente, que no han reaccionado con el epítipo  $\alpha$ -Gal del tejido fijado) y han reaccionado con los anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa. La diferencia permite calcular la cantidad de anticuerpo unido al epítipo  $\alpha$ -Gal del antígeno. La determinación cuantitativa de los epítopos  $\alpha$ -Gal se realiza por comparación de una cantidad conocida

## ES 2 540 602 T3

de epítopes  $\alpha$ -Gal que se derivan de una fuente estándar que consiste en glóbulos rojos de conejo ( $2 \times 10^6$  epítopes/glóbulo rojo) y la cantidad detectada en la bioprótesis.

5 **[0044]** La fórmula de conversión para el cálculo del número de epítopes  $\alpha$ -Gal a partir del análisis de una muestra biológica se extrapoló de los promedios obtenidos de la construcción de 3 curvas de calibración con once concentraciones de glóbulos rojos de conejo diferentes llevadas a cabo por triplicado.

**[0045]** La fórmula matemática resultante es:

10 número de epítopes =  $10^{\left(\frac{\mu\text{g Abl} + 0,2071}{0,1496}\right)} * 2 * 10^9$

en la que:

15 -  $\mu\text{g Abl}$  se corresponde con microgramos de anticuerpo monoclonal primario (ABI) que se han unido a la muestra durante 2 horas de incubación a 37 °C en la oscuridad. Esta cantidad puede determinarse mediante una comparación entre la absorbancia generada por una cantidad conocida de anticuerpo monoclonal anti- $\alpha$ -Gal antes y después de la incubación con la muestra sabiendo que cada  $\mu\text{l}$  de disolución madre de anticuerpo contiene 0,015  $\mu\text{l}$  de anticuerpo monoclonal. La fórmula se extrapoló de la línea de calibración proporcionada en la Figura 1, obtenida como se ha descrito previamente, y va a considerarse aplicable a cantidades de anticuerpo que oscilan de 0,005  $\mu\text{g}$  a 0,47  $\mu\text{g}$ . Por tanto, en una realización, el método de la presente invención puede comprender las etapas de:

- 20
- tratar una muestra de tejido incubando con disolución de ácido homocistéico en un tampón durante 12 horas x 2, bajo agitación en la oscuridad y a temperatura ambiente;
  - 25 - incubar la muestra previamente tratada con un anticuerpo monoclonal anti- $\alpha$ -Gal primario durante 2 horas a 37 °C;
  - centrifugar la muestra a 14.340 rpm durante 30 minutos a 4 °C y separar el sobrenadante;
  - tratar una placa de pocillos para recubrimiento con una disolución tamponada de epítope  $\alpha$ -Gal/albumina de suero;
  - 30 - lavar los pocillos con un tampón y tratarlos para bloquear con una disolución tamponada de 1,5 % en peso/volumen de albumina de suero durante 2 horas a temperatura ambiente;
  - lavar los pocillos con el tampón, cargar el sobrenadante de la muestra previamente centrifugada e incubar durante la noche a 4 °C;
  - 35 - lavar los pocillos con tampón y cargar el anticuerpo anti-ratón policlonal secundario conjugado con la enzima peroxidasa e incubar durante la noche a 4 °C;
  - lavar con tampón, cargar los pocillos con la disolución de revelador e incubar en la oscuridad durante 30 minutos;
  - leer la placa con un lector de placas a 450 nm para la detección por absorbancia de la señal de anticuerpo monoclonal libre.
- 40

**[0046]** En una realización preferida de la misma, este método para determinar el xenoantígeno  $\alpha$ -Gal en tejidos fijados con glutaraldehído comprende las siguientes etapas:

- 45
- tratar la muestra de tejido que va a analizarse incubando con disolución de ácido homocistéico preferencialmente a la concentración de 100 mM, pH 6,0-8,0, en un tampón fosfato durante 12 horas x 2, bajo agitación, en la oscuridad y a temperatura ambiente;
  - incubar la muestra previamente tratada con un anticuerpo monoclonal anti- $\alpha$ -Gal primario durante 2 horas a 37 °C;
  - centrifugar la muestra a 14.340 rpm durante 30 minutos a 4 °C y separar el sobrenadante;
  - 50 - recubrir una placa de pocillos con 50  $\mu\text{l}$  por pocillo de epítope  $\alpha$ -Gal/albumina de suero humano (HSA) a 5  $\mu\text{g/ml}$  en tampón TBS (pH 7,0 - 8,0);
  - lavar los pocillos con PBS y bloquear con 1,5 % de HSA en PBS durante 2 horas a temperatura ambiente;
  - lavar los pocillos con PBS y 100  $\mu\text{l}$  de carga del sobrenadante de la muestra previamente centrifugada por pocillo e incubar durante la noche a 4 °C;
  - 55 - lavar los pocillos con tampón y cargar el anticuerpo anti-ratón policlonal secundario conjugado con la enzima peroxidasa e incubar durante la noche a 4 °C;
  - lavar con PBS y 100  $\mu\text{l}$  de carga de la disolución de revelador e incubación en la oscuridad durante 30 minutos;
  - leer la placa con un lector de placas a 450 nm para la detección por absorbancia de la señal de anticuerpo monoclonal libre.
- 60

**[0047]** La realización del método para determinar el epítope alfa-Gal para los tejidos fijados con glutaraldehído, que puede asegurar y validar la producción de tejidos "libres de  $\alpha$ -Gal" prevista para la producción de bioprótesis

para uso clínico, requiere la identificación de condiciones que no producirán falsos positivos/negativos. Con respecto al método aplicable a tejidos frescos las diferencias sustanciales son:

- 5 - el desarrollo de un nuevo método que prevé el uso de ácido homocistéico a una concentración preferible de 100 mM y a pH 6,0 - 8,0, para saturación de los grupos glutaraldehído que pueden generar falsos positivos tras la interacción con un anticuerpo monoclonal anti- $\alpha$ -Gal primario;
- el uso del epítotope  $\alpha$ -Gal /HSA para la disolución de recubrimiento para aumentar la sensibilidad de detección de epítotope mediante la eliminación de ruido de fondo;
- 10 - el uso de una nueva disolución de recubrimiento que consiste en tampón TBS puede aumentar la eficiencia del epítotope  $\alpha$ -Gal /HSA en el fondo de la placa a cualquier concentración de anticuerpo primario monoclonal anti- $\alpha$ -Gal (véase Figura 2);
- el uso de una nueva disolución de recubrimiento que consiste en tampón CBC puede aumentar la eficiencia del epítotope  $\alpha$ -Gal /HSA en el fondo de la placa a concentraciones de anticuerpo de anticuerpo primario monoclonal anti- $\alpha$ -Gal hasta [1:50] v/v (véase la Figura 2).

15 **[0048]** En un segundo aspecto, la invención se refiere a un kit que pretende realizar el método para la determinación del epítotope  $\alpha$ -Gal en tejidos fijados con glutaraldehído que comprende al menos:

- 20 - al menos un primer recipiente para una disolución de ácido homocistéico;
- al menos un segundo recipiente para un anticuerpo monoclonal anti- $\alpha$ -Gal primario;
- al menos un recipiente adicional para un anticuerpo policlonal secundario conjugado con peroxidasa, preferentemente un anticuerpo de conejo anti-ratón;
- prospecto que detalla la línea de calibración dispuesta con concentraciones conocidas de glóbulos rojos de conejo y la fórmula de conversión para calcular el número de epítotope  $\alpha$ -Gal en el tejido analizado basándose en la absorbancia de la muestra leída a 450 nm.

25 **[0049]** El kit puede comprender preferentemente además:

- 30 - al menos un recipiente con un tampón de recubrimiento que consiste en una disolución de epítotope  $\alpha$ -Gal/albumina de suero en un tampón;
- al menos un recipiente con un tampón de bloqueo que consiste en una disolución de albumina de suero en un tampón;
- al menos un recipiente con una disolución para el desarrollo de enzima peroxidasa.

35 **[0050]** El uso previsto del kit es el control de calidad de todos aquellos tejidos biológicos fijados (por ejemplo, con glutaraldehído) que puede usarse para la fabricación de prótesis aplicables a uso clínico humano.

40 **[0051]** Como será evidente en los ejemplos informados más adelante para evaluar la acción eficaz del tratamiento con ácido homocistéico, se usó tejido porcino inactivado para el antígeno  $\alpha$ -Gal (el gen responsable de la expresión de epítotope se silencia mediante una modificación genética). Este tejido no fijado, incubado con el anticuerpo monoclonal anti- $\alpha$ -Gal, no genera ninguna señal ya que falta el antígeno.

45 **[0052]** Realizando el ensayo sobre el mismo tejido tras la fijación con glutaraldehído se generan resultados positivos y extremadamente variables (falsos positivos). Tras el tratamiento con ácido homocistéico, los resultados obtenidos del tejido fijado con glutaraldehído inactivado son comparables a aquellos del tejido no fijado original, específicamente no hay señal sobre la parte del anticuerpo monoclonal anti- $\alpha$ -Gal.

50 **[0053]** La oportunidad de aplicar este ensayo a sustituciones protésicas biológicas fijadas proporciona una herramienta de cribado que da preferencia a productos que pueden demostrar o que demostrarán el logro de un bloqueo o inactivación completa del xenoantígeno  $\alpha$ -Gal. Estas bioprótesis pueden garantizar una mejor biocompatibilidad y una disminución de la tendencia a la aparición de fenómenos de inflamación y de distrofia cálcica.

55 **[0054]** Actualmente, se usan parches de tejido xenógeno para la reconstrucción y reparación de distritos de tejido no limitados al alcance de válvulas cardíacas; para este fin, es útil citar CorMatrix<sup>®</sup> (parche para intervenciones y reconstrucciones en el campo cardiovascular), Dynamatrix<sup>®</sup> (para intervenciones en el campo dental), SurgiSIS<sup>®</sup> Oftalmics (usado en el contexto de cirugía ocular), AxoGuard<sup>®</sup> Nerve Connector (usado en el contexto de conexión quirúrgica de nervios), Matristem<sup>®</sup> (usado en la reparación de úlcera). El método objetivo de la invención puede así encontrar aplicación como control de calidad para todos los tejidos xenógenos usados en el contexto de la ingeniería de tejidos y no solo en el campo de las válvulas cardíacas como sustituciones de válvulas.

#### EJEMPLOS

65 **[0055]** En todos los ejemplos a continuación, el ensayo de ELISA se realizó con el anticuerpo monoclonal  $\alpha$ -Gal primario comercializado por Axxora (Nottingham, RU) identificado como M86.

*Ejemplo 1: Detección cuantitativa del epítotope  $\alpha$ -Gal en un tejido porcino inactivado en  $\alpha$ -Gal fresco.*

[0056] Se transportó el pericardio inactivado a un laboratorio en una disolución isotónica fría (PBS, 4 °C a pH 7,4) añadida con 1 % de antibióticos (penicilina y estreptomycin). Todas las operaciones realizadas sobre la muestra se llevaron a cabo mientras que se aseguraban las condiciones de esterilidad. En el laboratorio, el saco pericárdico se puso sobre un plano y el componente de lípido se separó mecánicamente de la superficie epipericárdica, a continuación el tejido se sometió a un corto lavado en solución salina tamponada con fosfato estéril (PBS, 4 °C a pH 7,0 - 8,0). El saco pericárdico se cortó en muestras más pequeñas que pesaban aproximadamente 40 mg, que se sometieron cada una a dos lavados de 15 minutos en PBS para eliminar cualquier residuo de sangre.

[0057] A continuación, cada muestra (n= 6) se sometió a una transferencia en papel de filtro y se pesó con exactitud, antes de someterse a la prueba de ELISA. Esta muestra se designó "pericardio porcino KO".

[0058] Los resultados alcanzados se registran en la siguiente Tabla 1.

*Ejemplo 2: Detección cuantitativa del epítotope  $\alpha$ -Gal en un tejido porcino fijado con glutaraldehído inactivado en  $\alpha$ -Gal.*

[0059] Se transportó el pericardio inactivado al laboratorio en una disolución isotónica fría (PBS, 4 °C a pH 7,0 - 8,0) añadida con 1 % de antibióticos (penicilina y estreptomycin). Todas las operaciones realizadas sobre la muestra se llevaron a cabo mientras que se aseguraba la esterilidad. En el laboratorio, el saco pericárdico se puso sobre un plano y el componente de lípido se separó mecánicamente de la superficie epipericárdica, a continuación el tejido se sometió a un corto lavado con PBS. El saco pericárdico se cortó en muestras más pequeñas que pesaban aproximadamente 40 mg, que se sometieron cada una a dos etapas de lavado durante 15 minutos cada una en PBS con el fin de eliminar cualquier residuo de sangre.

[0060] La fijación con glutaraldehído tuvo lugar según el procedimiento ilustrado por Stacchino C. y colaboradores [14], que prevé incubaciones que tienen cada una una duración de tres días en una concentración creciente de glutaraldehído hasta 0,5 % (3 días de incubación para cada etapa de concentración 0,1 %, 0,2 %, 0,3 %, 0,4 %, 0,5 %). Cada muestra (n= 6) se sometió posteriormente a una transferencia en papel de filtro y se pesó con exactitud, antes de someterse a la prueba de ELISA. Esta muestra se designó "pericardio porcino KO F".

[0061] Tras el procedimiento de fijación con glutaraldehído, algunas de las muestras fijadas se sometieron a tratamiento de inactivación. A continuación, se incubaron con ácido homocistéico a una concentración de 100 mM en tampón fosfato durante 12 horas x 2 con agitación, en la oscuridad a temperatura ambiente. Cada muestra (n= 6) se sometió posteriormente a una transferencia en papel de filtro y se pesó con exactitud, antes de someterse a la prueba de ELISA. Esta muestra se designó "pericardio porcino KO F-DETOX".

[0062] Los resultados obtenidos de la determinación del epítotope  $\alpha$ -Gal en los Ejemplos 1 y 2 se muestran en la Tabla 1, expresados como el número de epítotoses  $\alpha$ -Gal  $\times 10^{10}$  /10 mg de tejido húmedo en pericardio porcino inactivado en  $\alpha$ -Gal (KO, n=6), pericardio porcino inactivado en  $\alpha$ -Gal tras solo fijación con glutaraldehído (KO F, n= 6) y pericardio porcino inactivado en  $\alpha$ -Gal tras la fijación con glutaraldehído e inactivación (KO F-DETOX, n= 6).

	Número de epítotoses $\times 10^{10}$ cada 10 mg de tejido húmedo
Pericardio porcino KO	0,0001 $\pm$ 0,15
Pericardio KO F	1,56 $\pm$ 0,95
Pericardio KO F-DETOX	0,001 $\pm$ 0,4

[0063] Los resultados muestran que el tratamiento de inactivación con ácido homocistéico en las condiciones indicadas es una etapa crucial con el fin de llevar a cabo una encuesta fidedigna y reproducible que pretende determinar el epítotope  $\alpha$ -Gal sobre muestras de tejido previamente fijadas con glutaraldehído.

*Ejemplo 3: Detección cuantitativa del epítotope  $\alpha$ -Gal en bioprótesis de válvula aórtica comercial obtenida de tejido porcino o bovino fijado con glutaraldehído.*

[0064] Toda la manipulación de materiales bioprotésicos tuvo lugar mientras que se mantenía la esterilidad. Cada bioprótesis se extrajo del envase relevante y se sometió a 3 lavados en solución salina tamponada con fosfato (PBS, 20 °C a pH 7,0 - 8,0) como se ha indicado expresamente por el Manual de Instrucción de Pre-implantación proporcionado por el fabricante. A continuación, las valvas se aislaron y se sometieron a tratamiento de inactivación por medio de incubación con ácido homocistéico a una concentración de 100 mM en tampón fosfato durante 12 horas x 2 con agitación, en la oscuridad a temperatura ambiente. A continuación, cada muestra se sometió a una transferencia sobre papel de filtro y se pesó con exactitud, antes de someterse a la prueba de ELISA.

[0065] Los resultados expresados como media  $\pm$  desviación estándar del número de epítotoses  $\times 10^{10}$ /10 mg de

tejido húmedo se informan en la Tabla 2. La significancia estadística entre muestras se determinó por medio de la prueba de ANOVA unilateral. Las diferencias se consideraron significativas con  $p < 0,05$ .

Tabla 2

BIOPRÓTESIS	ORIGEN	NÚMERO DE EPITOPES
modelo 1 n=6	pericardio bovino	$6,62 \cdot 10^{10} \pm 0,43$
modelo 2 n=3	pericardio bovino	$5,9 \cdot 10^{10} \pm 0,7$
modelo 3 (TAVI*) n=3	pericardio bovino	$6,3 \cdot 10^{10} \pm 0,7$
modelo 4 n=3	pericardio bovino	$5,2 \cdot 10^{10} \pm 0,67$
modelo 5 n=9	válvula porcina	$5,02 \cdot 10^{10} \pm 0,68$

\*TAVI (implantación transcatóter de válvula aórtica) prótesis aórtica percutánea o transapicalmente implantable.

5

**Ejemplo 4:** Evaluación del tampón de recubrimiento en garantizar la unión mejorada de la proteína del suero al fondo de la placa.

10 **[0066]** La molécula responsable de la unión entre el plástico que forma el fondo de los pocillos y el residuo  $\alpha$ -Gal del epítoto es la albúmina de suero (tanto humana como bovina). La unión se produce mediante interacciones de carga entre el plástico y la propia proteína. El tampón en el que se disuelve la disolución de recubrimiento puede influir en la carga de la proteína.

15 **[0067]** Por tanto, se llevó a cabo una evaluación de 3 tampones diferentes con el fin de seleccionar cuál de los tampones era más adecuado en hacer que la proteína del suero se uniera a la placa. Se disolvieron el epítoto  $\alpha$ -Gal /HSA y el epítoto  $\alpha$ -Gal /BSA a una concentración de 5  $\mu$ g/ml en los tres tampones diferentes:

- 20 a) tampón fosfato (PBS) [NaCl 136 mM, KCl 2 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  4 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2 mM] a pH 7,0 - 8,0;  
 b) tampón carbonato/bicarbonato (CBC) [ $\text{NaHCO}_3$  35 mM,  $\text{NaCO}_3$  15 mM] a pH 9,0 - 10,0;  
 c) tampón Tris/NaCl (TBS) [Tris 50 mM, 0,9 % de NaCl] a pH 7,0 - 8,0.

25 **[0068]** Una mejor disposición de la proteína del suero se traduce en una mayor presencia de residuos  $\alpha$ -Gal sobre el fondo de la placa. Puede observarse un aumento en el número de estos residuos mediante concentraciones crecientes del anticuerpo monoclonal anti- $\alpha$ -Gal primario M86.

**[0069]** Así, se llevó a cabo un recubrimiento (según los procedimientos anteriormente descritos) de tres placas cada una con un tampón diferente. Cada placa se cubrió posteriormente con película protectora para prevenir cualquier fenómeno de evaporación, y se incubó durante 90 minutos a 37 °C en la oscuridad.

30 **[0070]** Se llevaron a cabo 3 lavados con 250  $\mu$ l por pocillo de PBS estéril a temperatura ambiente. El primer lavado se dejó reposar durante 5 minutos, los dos siguientes durante 3 minutos.

35 **[0071]** El bloqueo se llevó a cabo con 250  $\mu$ l por pocillo de 1,5 % de HSA en PBS estéril (pH 7,4), seguido de cubrir la placa con película protectora e incubación durante 2 horas a temperatura ambiente, en la oscuridad. Posteriormente se llevaron a cabo 3 lavados con PBS estéril como antes.

40 **[0072]** Se añadieron 100  $\mu$ l por pocillo de cuatro concentraciones diferentes de anticuerpo primario M86 en PBS dividido por columnas a cada placa que contenía un tampón diferente: [1:100], [1:50], [1:30], [1:20] v/v. A continuación, las placas se incubaron durante la noche a +4 °C en la oscuridad. A continuación se llevaron a cabo 3 lavados con PBS estéril como se ha explicado anteriormente.

45 **[0073]** Se añadieron 100  $\mu$ l de disolución de anticuerpo secundario (policlonal de conejo anti-ratón) conjugado con la enzima peroxidasa a una concentración de [1:500] v/v en PBS estéril a cada pocillo. A continuación, la placa se cubrió con película protectora y se incubó a 37 °C en la oscuridad durante 2 horas. Se llevaron a cabo 3 lavados con PBS estéril como se ha explicado anteriormente.

**[0074]** Se realizaron adición de 100  $\mu$ l por pocillo de la disolución de revelador a la enzima peroxidasa (o-fenilendiamina 200  $\mu$ moles en tampón fosfato-citrato y perborato de sodio), cubrición de la placa con película protectora e incubación durante 30 minutos en la oscuridad.

50

**[0075]** La lectura de la placa se llevó a cabo en un lector de placas a 450 nm.

**[0076]** Los resultados se muestran en la Figura 2. La figura anteriormente muestra cómo el tampón CBC garantiza un rendimiento de unión de la proteína del suero y, por tanto, la presencia de residuos  $\alpha$ -Gal del epítipo sobre el fondo de la mejor placa de PBS para concentraciones de anticuerpo que oscilan de 1:100 a 1:50. A mayores concentraciones, las acciones de los tampones CBC y PBS son superponibles.

5 **[0077]** Por otra parte, se ha demostrado que el tampón TBS prepara a la proteína del suero a una unión óptima y de larga duración con el fondo de los pocillos incluso para altas concentraciones de anticuerpo tales como [1:30] y [1:20] v/v.

10 **[0078]** Todos los tampones son satisfactorios usando sustancialmente la concentración de anticuerpo M86 igual a [1:50] v/v para la realización del método según la invención. Sin embargo, es preferible usar el tampón TBS para las propiedades de adyuvante señaladas del enlace entre la proteína del suero y el plástico de las placas usadas.

### Referencias

- 15
1. Nkomo VT, Gardin JM, Skeleton TN, Gottdiener JS, Scott CG, Enriquez-Sarano M. Burden of valvular heart diseases: a population-based study. *Lancet* 2006; 368: 1005-1011.
  2. Zeng LY et al. A prompt method to quantitative assay of alpha-Gal on pig cell surface without injury. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. 2005; 36(3): 419-421.
  - 20 3. Galili U et al. A sensitive assay for measuring alpha Gal epitope expression on cells by a monoclonal anti-Gal antibody. 2005; 1998(65): 1129-1132.
  4. Chen RH, Kadner A, Mitchell RN, Santerre DH, Adams DH. alpha-Gal and beta-Gal are preferentially expressed on porcine cardiac microvascular endothelium. *Transplant Proc* 2000; 32 877-878.
  5. Feng W et al. Distribution of the Alpha-Gal epitope on adult porcine bone tissue. *Transplant. Proceed.* 200638. 2247-2251.
  - 25 6. Galili U. The alpha Gal epitope and the anti-Gal antibody in xenotransplantation and in cancer immunotherapy. *Immun. Cell Biol.* 2005; 83: 674-686.
  7. Konakci KZ, Bohle B, Blumer R, Hoetzenecker W, Roth G, Moser B, Boltz-Nitulescu G, Gorlitzer M, Klepetko W, Wolner E, Ankersmit HJ. Alpha-Gal on bioprostheses: xenograft immune response in cardiac surgery. *Eur J Clin Invest.* 2005 Jan; 35(1): 17-23.
  - 30 8. Park CS, Park SS, Choi SY, Yoon SH, Kim WH, Kim YJ. Anti alpha-gal immune response following porcine bioprosthesis implantation in children. *J Heart Valve Dis.* 2010 Jan; 19(1): 124-130.
  9. Lila N, McGregor CG, Carpentier S, Rancic J, Byrne GW, Carpentier A. Gal knock-out pig pericardium: new source of material for heart valve bioprostheses. *J Heart Lung Transplant.* 2010 May; 29(5): 538-543. Epub 2009 Dec 29.
  - 35 10. Naso F, Gandaglia A, Iop L, Spina M, Gerosa G. First quantitative assay of alpha-Gal in soft tissues: presence and distribution of the epitope before and after cell removal from xenogeneic heart valves. *Acta Biomater.* 2011 Apr; 7(4): 1728-1734. Epub 2010 Nov 29.
  11. Mc Gregor CGA, Carpentier A, Lila N, Logan JS and Byrne GW. Cardiac xenotransplantation technology provides materials for improve bioprosthetic heart valves. *J. Thos. Card. Surg.*, 2011, 141 (1), 269-275.
  - 40 12. Simionescu DT. Artificial Heart Valves, Wiley Encyclopedia of Biomedical Engineering, John Wiley & Sons Inc., 2006, 1-10.
  13. Sorin Biomedica Cardio SPA, A method of preparing biological implantation material, EP 0 795 337, 17 September 1997.
  - 45 14. Stacchino C, Bona G, Bonetti F, Rinaldi S, Della Ciana L, Grignani A., Detoxification process for glutaraldehyde-treated bovine pericardium: biological, chimica and mechanical characterization. *J Heart Vale Dis.* 1998 Mar; 7(2): 190-194.

## REIVINDICACIONES

1. Un método para determinar xenoantígeno  $\alpha$ -Gal en tejidos fijados con glutaraldehído que comprende al menos las etapas de:
- 5
- someter una muestra de un tejido fijado a un tratamiento de inactivación con ácido homocistéico;
  - detectar epítotope  $\alpha$ -Gal por medio de un inmunoensayo de ELISA con un anticuerpo monoclonal anti- $\alpha$ -Gal primario;
  - cuantificar el epítotope  $\alpha$ -Gal por medio de detección por absorbancia a 450 nm de la señal generada por la cantidad libre de dicho anticuerpo monoclonal anti- $\alpha$ -Gal reaccionado con un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa y comparación con una línea de calibración.
- 10
2. El método para determinar xenoantígeno  $\alpha$ -Gal en tejidos fijados con glutaraldehído según la reivindicación 1, que comprende además la etapa de:
- 15
- producir la línea de calibración usando glóbulos rojos de conejo para la determinación cuantitativa del epítotope  $\alpha$ -Gal tras la detección por absorbancia a 450 nm de la señal de cantidad libre de dicho anticuerpo monoclonal anti- $\alpha$ -Gal.
- 20
3. El método para determinar xenoantígeno  $\alpha$ -Gal en tejidos fijados con glutaraldehído según la reivindicación 1, en el que para el tratamiento de inactivación el ácido homocistéico está en un tampón fosfato con un pH entre 6,0 y 8,0 a una concentración comprendida de 50 mM a 200 mM.
- 25
4. El método para determinar xenoantígeno  $\alpha$ -Gal en tejidos fijados con glutaraldehído según la reivindicación 3, en el que el ácido homocistéico está a la concentración de 100 mM.
5. El método para determinar xenoantígeno  $\alpha$ -Gal en tejidos fijados con glutaraldehído según la reivindicación 1, en el que para el ensayo de ELISA el recubrimiento de placa se realiza con disoluciones de epítotope  $\alpha$ -Gal/albumina de suero a una concentración comprendida de 2,5 a 15  $\mu$ g/ml en un tampón seleccionado de tampones fosfato pH 7,0 - 8,0, carbonato/bicarbonato pH 9,0 - 1,0 y Tris/NaCl pH 7,0 - 8,0.
- 30
6. El método para determinar xenoantígeno  $\alpha$ -Gal en tejidos fijados con glutaraldehído según la reivindicación 5, en el que el recubrimiento de placa se lleva a cabo con disoluciones de epítotope  $\alpha$ -Gal/albumina de suero humano en una concentración de 5  $\mu$ g/ml en tampón Tris/NaCl.
- 35
7. El método para determinar xenoantígeno  $\alpha$ -Gal en tejidos fijados con glutaraldehído según la reivindicación 1, que comprende las etapas de:
- 40
- tratar una muestra de tejido por incubación de la misma dos veces con una disolución de ácido homocistéico tamponada durante 12 horas, con agitación, en la oscuridad y a temperatura ambiente;
  - incubar la muestra previamente tratada con un anticuerpo monoclonal anti- $\alpha$ -Gal primario durante 2 horas a 37 °C;
  - centrifugar la muestra a 14.340 rpm durante 30 minutos a 4 °C y separar el sobrenadante;
  - tratar una placa de pocillos para recubrimiento con una disolución tamponada de epítotope  $\alpha$ -Gal/albumina de suero;
  - lavar los pocillos con tampón y tratar para bloquear con una disolución tamponada al 1,5 % en peso/volumen de albumina de suero durante 2 horas a temperatura ambiente;
  - lavar los pocillos con tampón, cargar el sobrenadante de la muestra previamente centrifugada e incubar durante la noche a 4 °C;
  - lavar los pocillos con tampón, cargar un anticuerpo policlonal secundario conjugado con peroxidasa e incubar durante la noche a 4 °C;
  - lavar con tampón, cargar los pocillos con una disolución de revelador e incubar en la oscuridad durante 30 minutos;
  - leer la placa con un lector de placas para la detección de dicha señal de anticuerpo monoclonal anti- $\alpha$ -Gal libre por absorbancia a 450 nm.
- 45
- 50
- 55
8. Un kit para llevar a cabo el método según una de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende al menos:
- 60
- al menos un primer recipiente que contiene una disolución de ácido homocistéico tamponada;
  - al menos un segundo recipiente que contiene un anticuerpo monoclonal para  $\alpha$ -Gal primario;
  - al menos un recipiente adicional que contiene un anticuerpo policlonal secundario conjugado con la enzima peroxidasa;
  - un prospecto que muestra una línea de calibración dispuesta con concentraciones conocidas de glóbulos rojos de conejo y la fórmula de conversión para calcular el número de epítotope  $\alpha$ -Gal en el tejido analizado basándose en la absorbancia de la muestra leída en una placa a 450 nm.
- 65

9. El kit según la reivindicación 8, que comprende además:

- al menos un recipiente con un tampón de recubrimiento que consiste en una disolución tamponada de epítotope  $\alpha$ -Gal/albúmina de suero;
- al menos un recipiente con un tampón de bloqueo que consiste en una disolución tamponada de albúmina de suero;
- al menos un recipiente con una disolución para el desarrollo de enzima peroxidasa.

5

10. Uso del método según una de las reivindicaciones 1 a 7 para el control de calidad de los tejidos fijados biológicos  
10 útiles para la fabricación de bioprótesis de uso clínico humano.

Figura 1

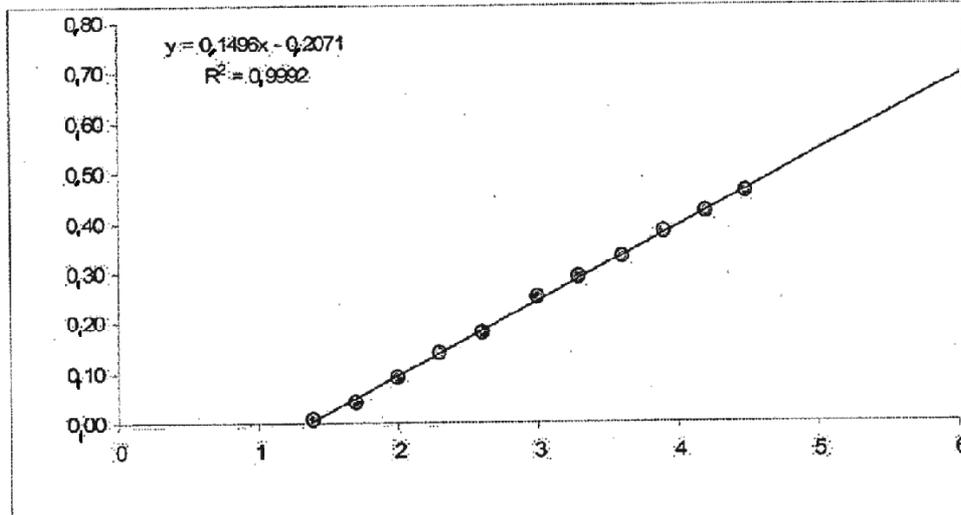


Figura 2

