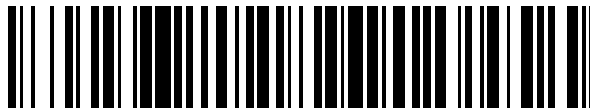


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 628 441**

51 Int. Cl.:

A61L 27/50 (2006.01)

A61L 27/36 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.09.2011 PCT/GB2011/051817**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.04.2012 WO12042250**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.09.2011 E 11764272 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.05.2017 EP 2621548**

54 Título: **Productos vasculares acelulares**

30 Prioridad:

09.12.2010 GB 201020846

27.09.2010 GB 201016150

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

02.08.2017

73 Titular/es:

**TISSUE REGENIX LIMITED (100.0%)
The Biocentre Innovation Way Heslington
York YO10 5NY, GB**

72 Inventor/es:

**INGHAM, EILEEN;
WILSHAW, STACY-PAUL y
FISHER, JOHN**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 628 441 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

Productos vasculares acelulares

5 Esta invención se refiere a matrices xenogénicas acelulares y en particular a productos vasculares de diámetro pequeño y medio tales como arterias acelulares que son físicamente compatibles y no inmunogénicas. La invención incluye, entre otros, los usos de los productos acelulares particularmente en la cirugía de derivación vascular y los métodos para la elaboración de las matrices vasculares acelulares.

10 Antecedentes

15 La activación del complemento es un potente mediador e indicador de diagnóstico de inflamación y rechazo en trasplantes de órganos sólidos. Mecánicamente, una serie de moléculas efectoras en la cascada del complemento median funciones proinflamatorias que pueden explicar la quimiotaxis y la activación de células del sistema inmune innato, tales como granulocitos y monocitos. Simultáneamente, muchos de estos mismos mediadores del complemento activan e interrumpen la interfaz de la célula endotelial entre el receptor y el trasplante, además, el complemento puede estimular los linfocitos B y T del sistema inmune adaptativo. El complemento también participa en la eliminación no inflamatoria de las células apoptóticas. Por lo tanto, la cascada del complemento puede ser activada por múltiples mecanismos y diversos componentes del complemento pueden modular la respuesta a los trasplantes en diferentes direcciones.

25 Hasta la fecha, ningún ensayo de xenotrasplante ha tenido un éxito completo debido a los muchos obstáculos que surgen de la respuesta del sistema inmune del receptor. Esta respuesta, que es generalmente más extrema que en los alotrasplantes, finalmente da como resultado el rechazo del xenoinjerto. Existen varios tipos de rechazo de un xenoinjerto: rechazo hiperagudo y rechazo vascular agudo que se deben a la respuesta del sistema inmune humoral y al rechazo celular, y al rechazo crónico que se basa en la inmunidad celular.

30 El rechazo hiperagudo está mediado por la unión de anticuerpos naturales xenorreactivos (XNA) al endotelio del donante que provoca la activación del sistema del complemento humano, el objetivo principal de los epítomos XNA es el epítomo α -gal (gal α 1-3gal β 1-(3)4glnac-r) que está abundantemente presente en glicolípidos y glicoproteínas de mamíferos no primates y monos del nuevo mundo debido a la glicosilación por la enzima α 1,3galactosiltransferasa (α 1,3gt). En humanos, simios y monos del viejo mundo, este epítomo está ausente porque el gen α 1,3gt se inactivó en primates ancestrales del viejo mundo. En cambio, los seres humanos, los simios y los monos del viejo mundo producen el anticuerpo anti-gal, que interactúa específicamente con los epítomos α -gal y que constituye el 1% de las inmunoglobulinas circulantes. La respuesta inmune debida a los epítomos α -gal es un factor importante en el fracaso de un trasplante xenogénico de órganos y tejidos. La eliminación de la interacción entre los anticuerpos anti-gal naturales y los epítomos α -gal en los xenoinjertos es un requisito previo para el éxito de los xenoinjertos en seres humanos. Anti-gal ha funcionado como una barrera inmunológica, que evita el trasplante de órganos de cerdo en los seres humanos, porque anti-gal se une a los epítomos α -gal expresados en las células de cerdo. Se conoce a partir de la técnica anterior cómo generar cerdos modificados genéticamente para inactivar α -1,3 que carecen de epítomos α -gal que ha dado como resultado la eliminación parcial de esta barrera inmunológica y por lo tanto vencer parcialmente el rechazo hiperagudo, sin embargo, la producción transgénica de cerdos es costosa y consume mucho tiempo. Además, todavía se expresan niveles bajos, pero potencialmente significativos de gal- α (1,3)gal en los tejidos de animales modificados genéticamente para inactivar α 1,3gt, lo que indica que está implicada otra glicosiltransferasa en la síntesis de este epítomo (Milland y colaboradores, Immunol. Cell Biol 2005, 83, 687-693). También se sabe de la técnica anterior que la α -galactosidasa de granos de café verde y la α -galactosidasa humana recombinante pueden eliminar epítomos α -gal de la superficie celular de tejidos tales como la válvula aórtica porcina y el tejido pericárdico, pero los tratamientos enzimáticos tienen limitaciones no sólo sobre la rentabilidad, sino que también puede afectar la histoarquitectura del tejido y dejar residuos enzimáticos indeseables. Con el fin de superar el rechazo hiperagudo también se sabe que se inhibe la cascada del complemento del receptor mediante el uso del factor de veneno cobra (que agota C3), el receptor del complemento soluble tipo 1, los anticuerpos anti-C5 o el inhibidor C1 (C1-INH). Las desventajas de este enfoque incluyen la toxicidad del factor de veneno de cobra, y lo más importante, estos tratamientos privarían al individuo de un sistema de complemento funcional. En cuanto al rechazo vascular agudo, este tipo de rechazo se produce en xenoinjertos discordantes dentro de 2 a 3 días, si se evita el rechazo hiperagudo. El proceso es mucho más complejo que el rechazo hiperagudo y actualmente no se entiende completamente, sin embargo, si se evita el rechazo vascular hiperagudo y agudo, es posible la supervivencia del xenoinjerto a pesar de la presencia de XNA circulantes. El injerto recibe una pausa del rechazo humoral cuando se interrumpe la cascada del complemento, se eliminan los anticuerpos circulantes, o se cambia su función o se produce un cambio en la expresión de los antígenos de superficie en el injerto. Esto permite que el xenoinjerto sobreexpone y eventualmente exprese genes protectores.

60 Por lo tanto, es deseable que las matrices vasculares xenogénicas acelulares no activen el complemento. También es deseable que las matrices vasculares xenogénicas acelulares estén desprovistas de componentes antigénicos y especialmente epítomos α -gal con el fin de mitigar las reacciones inflamatorias mediadas por anticuerpos. También es deseable proporcionar un método alternativo y más rentable de preparar productos vasculares de diámetro pequeño y medio para la cirugía de desviación. También es deseable proporcionar matrices vasculares xenogénicas acelulares para el trasplante que carezcan de residuos enzimáticos de α -galactosidasa residual.

Breve resumen de la divulgación

De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un producto como se define en la reivindicación 7, que comprende

5

una matriz de tejido vascular xenogénico acelular natural que tiene al menos una reducción del 80% en el contenido de ADN en comparación con una matriz de tejido vascular de control sin tratar, estando el producto sustancialmente libre de epítomos capaces de reaccionar con anticuerpos humanos preformados y también sin la capacidad de activar sustancialmente el complemento.

10

La referencia en la presente memoria descriptiva a "sin la capacidad de activar sustancialmente el complemento" indica que el producto de la invención tiene aproximadamente el mismo nivel de activación del complemento que las arterias femorales humanas frescas en un ensayo de activación del complemento.

15

El tejido vascular xenogénico acelular está sustancialmente exento de epítomos α -gal.

La referencia en la presente memoria a "sustancialmente libre de epítomos capaces de reaccionar con anticuerpos humanos preformados" indica que el producto de la presente invención tiene aproximadamente el mismo nivel de epítomos α -gal que las arterias femorales humanas frescas o acelulares.

20

Preferiblemente, la matriz de tejido vascular xenogénico acelular puede tener una reducción en el contenido de ADN en comparación con una matriz de tejido vascular no tratado o natural de control de por lo menos el 80% o más, es decir, puede tener una reducción de cualquier número entero mayor que 80% y como máximo del 100%.

25

Preferentemente, el tejido vascular es de origen porcino o bovino. Preferiblemente, el tejido vascular derivado de porcino es un vaso sanguíneo de diámetro pequeño o medio y más preferiblemente es o bien una arteria ilíaca externa porcina (EIA) o una arteria carótida interna porcina (ICA).

30

Se apreciará que el tejido vascular también puede derivarse de otras especies de mamíferos tales como, y sin limitación, ovinos o llamas, especies aviares grandes (por ejemplo, avestruz) y especies marsupiales grandes (por ejemplo, canguro).

35

Se apreciará que el tejido vascular puede ser también un vaso sanguíneo de gran diámetro, por ejemplo, aorta de porcino o de bovino.

40

La referencia aquí a vasos sanguíneos de "diámetro pequeño" es un término aceptado en la técnica y se refiere a vasos sanguíneos con un diámetro interior o interno de menos de 6 mm, mientras que "diámetro medio" se refiere a vasos sanguíneos que tienen un diámetro interior o interno de entre 6 a 15 mm y "diámetro grande" se refiere a vasos sanguíneos que tienen un diámetro interior o interno de alrededor de 25 mm.

45

En las realizaciones de la invención en las que la matriz de tejido vascular xenogénico acelular se deriva de bovinos, el tejido vascular se selecciona del grupo que comprende arteria carótida, arteria mamaria interna, arteria torácica interna, vena mesentérica y vena yugular.

50

Preferentemente, el tejido vascular xenogénico acelular tiene un contenido de colágeno, glicosaminoglicano y elastina equivalente o no sustancialmente diferente en comparación con tejido fresco o no tratado.

Los niveles de colágeno típicos de tejido de ICA no tratado fresco están en el intervalo de 400-1000 μ g/mg y más preferiblemente en el intervalo de 600-800 μ g/mg y para EIA están en el intervalo de 200-1000 μ g/mg y más preferiblemente en el intervalo de 450-650 μ g/mg. Típicamente, los niveles de glicosaminoglicanos de los tejidos frescos no tratados de ICA y EIA están en el intervalo de 25-200 μ g/mg y más preferiblemente en el intervalo de 50-100 μ g/mg.

55

Preferentemente, el tejido vascular xenogénico acelular tiene un valor equivalente o no significativamente diferente para los valores de la presión de rotura, retención de la sutura, resistencia a la tracción final, dilatación y fallo de baja velocidad de deformación en comparación con el tejido fresco o no tratado.

60

Típicamente, la presión de ruptura media del tejido de ICA y EIA no tratado fresco es superior a 3.000 mm de Hg, típicamente la retención de sutura de tejido de ICA y EIA no tratado fresco está en el intervalo de 1-5 N, típicamente el fallo de baja velocidad de deformación de ICA y EIA no tratada fresca es la dirección axial está en el intervalo de 2,5 a 6,5 MPa y más preferiblemente está en el intervalo de 3,5 a 5,5 MPa y en la dirección circunferencial está en el intervalo de 1 a 6 MPa y más preferiblemente está en el intervalo de 2 a 5 MPa, típicamente la resistencia a la tracción final media de los tejidos de ICA y EIA no tratados frescos está en el intervalo de 3 a 5 MPa.

65

Preferiblemente, una longitud típica de tejido vascular xenogénico acelular derivado de porcino es de hasta aproximadamente 30 cm y hasta aproximadamente 80 cm para tejido derivado de bovino.

- El tejido vascular xenogénico acelular de la presente invención es una estructura natural, es decir, no está alterado genéticamente y está sustancialmente exento de cualquier residuo de enzima α -galactosidasa. Además, tiene ventajosamente aproximadamente las mismas propiedades bioquímicas y mecánicas que el tejido fresco o no tratado de modo que actúa como un tejido fresco o no tratado mientras que sea eficazmente antigénicamente inerte. En consecuencia, es un producto candidato ideal para el trasplante y mediante cirugía de reemplazo de derivación.
- 5 Preferiblemente, el tejido vascular xenogénico acelular comprende además un recubrimiento, siendo proporcionado el recubrimiento por un material adecuado revestido sobre una o ambas de una superficie interna (lumen) o la superficie externa de la misma. Esta realización de la invención es de particular utilidad para injertos vasculares.
- 10 Preferentemente, se selecciona el material de recubrimiento para mejorar la permeabilidad del vaso, o para ayudar/ restablecer el lumen del vaso o el revestimiento endotelial en la superficie interior del lumen del vaso.
- Preferiblemente, el recubrimiento es un recubrimiento luminal y el material de recubrimiento se selecciona del grupo que comprende: anticoagulantes tales como heparina, inhibidores de pentasacáridos sintéticos, inhibidores directos de trombina, antagonistas de vitamina K, inhibidores del Factor Xa, plata, colágeno IV, elastina, glicoproteínas tales como laminina o fibronectina, glicosaminoglicanos tales como hialuronano, sulfato de condroitina y péptidos sintéticos o naturales o mezclas de los mismos.
- 15 Preferiblemente, el tejido vascular xenogénico acelular puede sembrarse con una población única o mixta de células sembradas sobre el mismo o en él, siendo seleccionada la población celular de acuerdo con un sitio de trasplante y siendo seleccionada del grupo que comprende células epiteliales tales como células endoteliales, mesoteliales o células de músculo liso, FIBROBLASTOS, células madre pluripotentes y multipotentes tales como células madre adultas autólogas y alogénicas, células madre hematopoyéticas, mesenquimales, neuronales, endoteliales y embrionarias.
- 20 De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona un método de preparación de un tejido vascular xenogénico acelular natural, comprendiendo el método la obtención de un vaso sanguíneo de reemplazo adecuado y someterlo a las siguientes etapas metodológicas:
- 25 (i) una incubación previa al tratamiento con ácido etilendiaminotetraacético 200 mM (EDTA) durante al menos 24 horas a aproximadamente 4 grados Celsius;
- 30 (ii) un lavado de desinfección;
- (iii) al menos dos ciclos de una incubación con un regulador hipotónico y un detergente aniónico;
- (iv) un tratamiento de nucleasa;
- (v) un lavado hipertónico; y
- 35 (vi) un proceso terminal de esterilización.
- Preferiblemente, las etapas (i) y (ii) pueden realizarse en orden inverso, de hecho, las etapas de la presente invención no están restringidas al orden dado anteriormente y no pretenden limitar el alcance de la invención.
- 40 La incubación previa al tratamiento con EDTA se realiza en una solución reguladora hipertónica tal como por ejemplo un TRIS 50 mM, NaCl 1,5 M y EDTA 200 mM en tal regulador hipertónico a alrededor de 4°C durante al menos 24 horas. La solución hipertónica tiene un pH aproximadamente fisiológico que es muy ligeramente alcalino y está aproximadamente a un pH de entre 7,2 a 7,4.
- 45 Preferentemente, el primer lavado desinfectante de la etapa (ii) comprende un lavado en una solución reguladora hipotónica que comprende vancomicina, gentamicina y polimixina, un período de lavado adecuado es de aproximadamente 30 minutos a una temperatura de aproximadamente 37°C.
- Preferiblemente, la etapa de incubación hipotónica de la etapa (iii) comprende una primera incubación con un regulador hipotónico que comprende típicamente TRIS 10 mM y posteriormente con un regulador hipotónico que comprende adicionalmente EDTA 2,7 mM, 10 KIU/mL de aprotinina. Las condiciones de incubación están típicamente entre 24 y 56 horas a aproximadamente 4°C. Para una incubación adicional, el regulador hipotónico comprende adicionalmente un detergente aniónico tal como SDS a aproximadamente una concentración de 0,1% (p/v), durante esta parte de la incubación la temperatura es de aproximadamente 37°C. Este ciclo de incubaciones puede repetirse una o más veces.
- 50 Preferiblemente, el tejido puede ser lavado repetidamente en solución salina regulada con fosfato de Dulbecco antes de someter el tejido al tratamiento con nucleasa de la etapa (iv). El tratamiento con nucleasa comprende típicamente una incubación durante aproximadamente 3 horas a 37°C en una solución de nucleasa que comprende TRIS 50 mM, 50 U/mL de ADNasa y 1 U/mL de ARNasa. El tejido se lava luego repetidamente antes de la etapa (v).
- 60 Preferiblemente, la incubación hipertónica de la etapa (v) comprende una incubación durante aproximadamente 24 horas a 37°C en TRIS 50 mM, NaCl 1,5 M. El tejido se lava repetidamente antes de la etapa (vi).
- 65 Preferiblemente, el procedimiento de esterilización terminal proporciona un aclaramiento viral y una reducción de la carga biológica para el tejido vascular xenogénico acelular antes del almacenamiento o trasplante en un receptor.

La etapa de esterilización terminal puede realizarse idealmente mediante uno o más de los siguientes procedimientos, por ejemplo: incorporación o recubrimiento de agentes antimicrobianos tales como antibióticos, defensinas y metales tales como Ag^{+2} ; tratamiento con un agente de entrecruzamiento tal como glutaraldehído, carbodiimidas; tratamiento con agentes esterilizantes tales como ácido peracético, óxido de etileno, óxido de propileno e hidróxido sódico, irradiación, por ejemplo, con radiación y o haces de electrones y tratamiento con CO_2 supercrítico.

La etapa de esterilización puede ser, por ejemplo, un segundo lavado de desinfección que comprende una etapa que comprende una incubación con ácido peracético a una concentración de aproximadamente 0,1% v/v durante aproximadamente 4 horas a 37°C. El tejido se puede lavar posteriormente con una solución de limpieza terminal adecuada tal como solución salina regulada con fosfato de Dulbecco.

Preferiblemente, el método incluye además la etapa de recubrir una superficie interna y/o externa de cualquier tejido vascular xenogénico acelular natural con un agente de recubrimiento como se ha descrito anteriormente en el presente documento.

Preferiblemente, el método incluye además la etapa de siembra del tejido vascular xenogénico acelular natural con una población de células única o mixta como se ha descrito anteriormente.

Los tejidos vasculares tales como las arterias son efectivamente tubulares y por lo tanto es muy difícil asegurar que las superficies internas del lumen arterial sean suficientemente tratadas para eliminar los epítomos capaces de reaccionar con anticuerpos humanos preformados y epítomos capaces de activar el complemento. En una realización de la invención, el tejido vascular puede ser perfundido con medios fluidos que se mueven continuamente. Además, o alternativamente, el tejido vascular también puede distenderse durante las etapas de preparación e incubación, con el fin de adelgazar las paredes del tejido vascular para favorecer la penetración de los diversos fluidos. Los inventores han demostrado que la metodología de la presente invención da como resultado un tratamiento exitoso incluso para superficies internas.

De acuerdo con aún un aspecto adicional de la invención, se proporciona un producto que comprende un producto de tejido de matriz de tejido vascular xenogénico acelular natural que puede ser obtenido por los métodos de la invención para su uso como tejido de trasplante.

Preferiblemente, el producto de tejido de trasplante es para uso en cirugía de derivación y especialmente cirugía de derivación coronaria y de extremidades, también es para uso de acceso vascular por ejemplo acceso AV.

Las realizaciones de la invención que utilizan tejido vascular derivado de bovinos son de particular utilidad en la cirugía de derivación de extremidades y como medio de acceso vascular debido a que la longitud del material vascular está en el intervalo de hasta 80 cm de longitud.

Breve descripción de los dibujos

A continuación, se describen adicionalmente realizaciones de la invención con referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

La Figura 1 muestra un diagrama de flujo del protocolo de descelerización para producir tejido acelular.

La Figura 2 muestra la carótida interna porcina (ICA) en las Figuras 2^a-H y las arterias ilíacas externas (EIA) en las Figuras I-L tratadas usando dos ciclos de regulador hipotónico y solución SDS ($1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) y luego teñidas usando hematoxilina y eosina.

La Figura 3 muestra ICA porcina (C-D) y EIA (E-F) tratada usando dos ciclos de regulador hipotónico y solución de SDS ($1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) y teñida usando DAPI. Se usaron ICA (A) y EIA (B) porcinas frescas como controles positivos.

La Figura 4 muestra EIA porcina fresca (C) y acelular tratada usando dos ciclos de regulador hipotónico y solución de SDS ($1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), las Figuras D y E se marcan usando un anticuerpo monoclonal contra el epítomo α -Gal o un control de isotipo (F). Se usó piel porcina fresca como control positivo (A, B).

La Figura 5 muestra ICA acelular tratada usando EDTA 200 mM a 4°C (E-) y un ciclo de regulador hipertónico a 37°C y marcada usando un anticuerpo monoclonal contra el epítomo α -Gal. Las Figuras 5A, B, E y F se marcan con anticuerpo crudo, las Figuras C y G con $0,39 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de anticuerpo purificado y las Figuras D y H con $0,16 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de anticuerpo puro.

La Figura 6 muestra EIA acelular preparada de acuerdo con el protocolo de la Figura 1 y marcada usando un anticuerpo monoclonal contra el epítomo α -Gal, purificado (A), adsorbido contra BSA (B) o adsorbido contra BSA con α -Gal (C) o un control de isotipo de IgM (D).

La Figura 7 muestra ICA acelular marcada utilizando un anticuerpo monoclonal contra el epítomo α -Gal, purificado (A),

adsorbido contra BSA (B) o adsorbido contra BSA con α -Gal (C) o un control de isotipo de IgM (D).

- 5 La Figura 8 muestra un ELISA para la detección de anticuerpos para el epítipo α -Gal después de la adsorción con vasos alogénicos frescos y acelulares, porcinos y humanos. Los datos se expresan como la media ($n = 6$) \pm 95% de los límites de confianza. * representa una diferencia significativa como la determinada por ANOVA unidireccional y prueba T post hoc. ICA porcina fresca ICA; ICA acelular porcina AICA; arteria femoral común CFA humana fresca; arteria femoral común humana acelular ACFA; arteria ilíaca externa porcina fresca EIA; arteria ilíaca externa porcina acelular AEIA; controles sin tejido NTC.
- 10 La Figura 9 muestra el contenido de colágeno, colágeno desnaturalizado y de proteoglicano sulfatado de EIA porcina fresca y acelular (Figura 9A) e ICA (Figura 9B). Los datos se expresan como la media ($n = 6$) \pm 95% de los límites de confianza.
- 15 La Figura 10 muestra células de riñón de hámster bebé cultivadas con adhesivo de contacto de cianoacrilato (A), gel de colágeno (B, E), o EIA porcina acelular (C, F) e ICA (D, G) durante 48 horas, observadas usando microscopía de contraste de fases y teñidas utilizando tinte de Giemsa.
- 20 La Figura 11 muestra células 3T3 murinas cultivadas con adhesivo de contacto de cianoacrilato (A), gel de colágeno (B, E) o EIA porcina acelular (C, F) e ICA (D, G) durante 48 horas, observadas usando microscopía de contraste de fases y teñidas utilizando tinte de Giemsa.
- 25 La Figura 12 muestra el contenido relativo de ATP de células 3T3 de ratón incubadas con muestras de extracto de EIA porcina fresca o acelular (Figura 12B) e ICA (Figura 12A) o células de riñón de hámster bebé incubadas con muestras de extracto de EIA porcina fresca o acelular (Figura 12D) e ICA (Figura 12C) siendo cada muestra incubada con DMSO al 40% (v/v), que se utilizó como un control positivo para la citotoxicidad y DMEM como un control negativo para la citotoxicidad. Los datos se expresan como la media ($n = 6$) \pm 95% de los límites de confianza. * representa una diferencia significativa con el control de DMEM según se determina mediante ANOVA unidireccional y prueba T post hoc.
- 30 La Figura 13 muestra la cuantificación de ADN extraído de EIA y ICA porcina fresca y acelular, de arterias femorales comunes humanas frescas y acelulares (CFA), Surgisis, Permacol y CollaMend usando absorbancia a 260 nm. Los datos se expresan como la media ($n = 3$) \pm 95% de los límites de confianza.
- 35 La Figura 14 muestra ensayos de retención de sutura de EIA e ICA porcina fresca y acelular. Los datos se expresan como la media ($n = 6$) \pm 95% de los límites de confianza.
- 40 La Figura 15 muestra la prueba de dilatación de ICA (A, B) y EIA (C, D) porcina fresca y acelular, los datos representan un cambio porcentual en el diámetro de la raíz en función de la presión interna creciente. Eje X (A, C) o eje Y (C, D). Los datos se expresan como la media ($n = 3$) \pm 95% de los límites de confianza, los datos han sido transformados con arcoseno para realizar un análisis estadístico prospectivo y retrospectivo.
- La Figura 16 muestra la resistencia a la tracción final circunferencial y axial de EIA (A) e ICA (B) porcina fresca y acelular. Los datos se expresan como la media ($n = 6$) \pm 95% de los límites de confianza.
- 45 La Figura 17 muestra la pendiente de la fase circunferencial y axial del colágeno de EIA (A) e ICA (B) porcina fresca y acelular. Los datos se expresan como la media ($n = 6$) \pm 95% de los límites de confianza.
- 50 La Figura 18 muestra la pendiente de la fase de elastina circunferencial y axial de EIA (A) e ICA (B) porcina fresca y acelular. Los datos se expresan como la media ($n = 6$) \pm 95% de los límites de confianza.
- 55 La Figura 19 muestra ELISA para la detección de (a) C3a o (b) C5a después de la reacción de suero humano normal con plástico de cultivo de tejido, PBS, BSA, BSA con α -Gal o zimosano. Los datos se expresan como la media ($n = 6$) \pm 95% de los límites de confianza, * representa una diferencia significativa [en comparación con el poliestireno], según se determina mediante ANOVA unidireccional y la prueba T post hoc.
- 60 La Figura 20 muestra ELISA para la detección de (a) C3a o (b) C5a después de la reacción de suero humano normal con plástico de cultivo de tejido, PBS, BSA, BSA con α -Gal o zimosano o una gama de estructuras biológicas acelulares comercialmente disponibles (Surgisis, CollaMend, Permacol). Los datos se expresan como la media ($n = 6$) \pm 95% de los límites de confianza, * representa una diferencia significativa [en comparación con el poliestireno], según se determina mediante ANOVA unidireccional y la prueba T post hoc. Pericardio, pericardio fresco porcino; uréter, uréter porcino fresco, ICA, ICA porcina fresca, EIA, arteria ilíaca externa porcina fresca, AICA, ICA porcina acelular, CFA, arterias femorales comunes humanas frescas, AP, pericardio acelular porcino, AU, uréter porcino acelular, AICA, arteria carótida interna acelular porcina, AEIA, arteria ilíaca externa porcina acelular, ACFA, arteria femoral común humana acelular.
- 65 Descripción detallada

5 A lo largo de la descripción y reivindicaciones de esta memoria descriptiva, las palabras "comprende" y "contiene" y sus variaciones significan "incluyendo, pero no limitado a", y no pretenden (y no) excluyen otras fracciones, aditivos, componentes, números enteros o etapas. A lo largo de la descripción y reivindicaciones de esta memoria descriptiva, el singular abarca el plural a menos que el contexto lo requiera de otro modo. En particular, cuando se utiliza el artículo indefinido, la memoria descriptiva debe ser entendida contemplando tanto la pluralidad como la singularidad, a menos que el contexto lo exija de otro modo.

10 Los rasgos, números enteros, características, compuestos, fracciones químicas o grupos descritos junto con un aspecto particular, realización o ejemplo de la invención deben ser entendidos como aplicables a cualquier otro aspecto, realización o ejemplo descrito en la presente memoria, a menos que sean incompatibles con la misma. Todas las características descritas en esta memoria descriptiva (incluyendo cualquiera de las reivindicaciones adjuntas, resumen y dibujos), y/o todas las etapas de cualquier método o procedimiento así divulgado, se pueden combinar en cualquier combinación, excepto las combinaciones donde al menos algunas de tales características y/o las etapas sean mutuamente excluyentes. La invención no se limita a los detalles de ninguna de las realizaciones anteriores. La invención se extiende a cualquier fresca combinación, o cualquier combinación novedosa, de las características descritas en esta memoria descriptiva (incluyendo cualquiera de las reivindicaciones, resumen y dibujos adjuntos), o a cualquier fresca combinación o cualquier combinación novedosa de las etapas de cualquier método o procedimiento así divulgado.

20 La atención del lector está dirigida a todos los artículos y documentos que se presentan al mismo tiempo que o con anterioridad a esta memoria descriptiva en relación con esta solicitud y que están abiertos a inspección pública con esta especificación y se incorporan el contenido de todos estos artículos y documentos en la presente memoria por referencia.

25 La presente invención proporciona productos acelulares y métodos para su producción. Se identificaron dos vasos particularmente adecuados, la arteria ilíaca interna y la arteria carótida interna porcinas y los estudios iniciales establecieron un protocolo capaz de eliminar todas las células y > 80% del ADN de los vasos, basándose en el uso de dos ciclos de regulador hipotónico a 4°C y 1 mg.ml⁻¹ de SDS a 37°C, respectivamente. Los vasos descelularizados usando un único ciclo de regulador hipotónico y solución de SDS demostraron la presencia de células residuales y restos celulares cuando se tiñeron usando hematoxilina y eosina y DAPI. Por lo tanto, se eligieron dos ciclos de regulador hipotónico y SDS como procedimiento óptimo de descelularización, ya que era capaz de producir en forma confiable vasos acelulares.

30 La marcación de anticuerpos utilizando un anticuerpo monoclonal contra el epítipo α -Gal demostró que estaba presente dentro de las arterias ilíacas externas acelulares y de las arterias carótidas internas. La marcación de anticuerpos se llevó a cabo utilizando muestras de tejido crioincluido, inclusión en cera de parafina fija con zinc y muestras incluidas en cera de parafina fijada con formalina. Comercialmente existe solamente un único clon de anticuerpo de una sola fuente; este se suministra como una preparación sin purificar. La preparación sin purificar produjo consistentemente alta tinción de fondo en comparación con el anticuerpo de control negativo de IgM. El anticuerpo se purificó usando una columna de unión a IgM. El anticuerpo se dializó luego y se concentró utilizando dispositivos de filtro centrífugo. La marcación utilizando el anticuerpo purificado demostró niveles de fondo significativamente reducidos en comparación con la preparación sin purificar. Las muestras crioincluidas produjeron la marcación más sensible y las muestras fijadas con formalina la marcación más débil. Por lo tanto, las muestras fijadas en parafina fijada con zinc se utilizaron como una técnica estándar, ya que esto produjo una histología superior en comparación con las muestras crioincluidas y un aumento de la sensibilidad sobre las muestras fijadas con formalina. Los niveles de α -Gal en toda la matriz eran sustancialmente más bajos en comparación con los tejidos de control frescos. Sin embargo, el epítipo era detectable. Se hicieron intentos para eliminar el epítipo α -Gal usando ciclos crecientes de regulador hipotónico y solución de SDS. La marcación con anticuerpos monoclonales demostró que no había una reducción sustancial en los niveles de α -Gal cuando se usaron dos ciclos en comparación con un solo ciclo.

55 El regulador hipotónico de dos ciclos y la solución de SDS fallaron en la eliminación de α -Gal de las matrices acelulares. Se planteó la hipótesis de que una etapa inicial para eliminar las células endoteliales de la superficie del lumen del vaso reduciría la cantidad de α -Gal dentro de las matrices acelulares. Para ello, se utilizaron Verseno y diversas concentraciones de EDTA antes del proceso de descelularización para quelar cualquier ión metálico para ayudar a la liberación de las células endoteliales del lumen del vaso. El tratamiento previo usando EDTA 200 mM a 4°C durante 25 horas resultó ser exitoso en la reducción de los niveles de α -Gal con vasos acelulares; esto se incorporó en el proceso de descelularización de la presente invención.

60 Se ha utilizado un tratamiento con regulador hipertónico (Tris 10 mM, cloruro de sodio 1,5 M, pH 7,4) después de la descelularización, durante el proceso de descelularización para reducir aún más los niveles de α -Gal presentes en los tejidos cardiovasculares acelulares. La marcación adicional de anticuerpos demostró que un único ciclo de regulador hipertónico a 37°C durante 24 horas en combinación con tratamiento previo usando EDTA 200 mM a 4°C durante 24 horas con agitación fue exitoso en la reducción de los niveles de α -Gal con los vasos acelulares. También mostró que no había mejoría obvia en la reducción de α -Gal con ciclos crecientes (hasta tres) de tratamiento con regulador hipertónico a 37°C.

Con el fin de determinar si había α -Gal residual en las matrices acelulares, era fundamental determinar la especificidad del anticuerpo. Esto se consiguió adsorbiendo el anticuerpo purificado usando BSA con α -Gal. La BSA también se incluyó como control. Después de la adsorción, el anticuerpo α -Gal se habría unido a la BSA con α -Gal y por lo tanto cortando su capacidad para unirse a cualquier epítipo α -Gal dentro del tejido que estaba siendo marcado. Por lo tanto, cualquier tinción utilizando esto podría considerarse como de fondo. La adsorción usando BSA solo demostró que las interacciones proteína:proteína no afectarían la capacidad del anticuerpo para detectar el epítipo α -Gal. La comparación de los datos obtenidos usando el anticuerpo absorbido con BSA y el anticuerpo absorbido con BSA con α -Gal con los tejidos descelularizados y los tejidos descelularizados tratados con α -galactosidasa indicó que: la EIA acelular parecía tener α -Gal residual que podría reducirse más por el uso de la enzima. Esta tinción estaba en la matriz y no en la superficie de la íntima. La ICA acelular tenía algunas tinciones muy débiles que no se podían eliminar mediante el uso de α -galactosidasa. Los datos en general indicaron que había un mínimo de α -Gal en los vasos acelulares.

El ensayo de adsorción de anticuerpos utilizó el mismo anticuerpo monoclonal. La ventaja de este ensayo es que se puede ensayar un volumen mucho mayor de material en comparación con la inmunocitoquímica que está limitada a secciones muy delgadas. Además, el ensayo de adsorción de anticuerpos produjo una evaluación semicuantitativa de los niveles de α -Gal presentes en las diferentes muestras de tejido. Las muestras de vasos frescos demostraron los niveles más altos de expresión de α -Gal. Se demostró que la EIA y la ICA porcinas frescas tratadas con α -galactosidasa estaban desprovistas de α -Gal (no diferente del control sin tejido), lo que indica que el ensayo fue exitoso. Las muestras de EIA e ICA acelulares demostraron niveles de α -Gal que no eran significativamente diferentes a los de la arteria femoral común humana fresca y acelular, así como tampoco al control sin tejido.

La evaluación histológica demostró que la arquitectura de la matriz y la composición de las muestras acelulares eran similares a las de los controles frescos. Las matrices acelulares mostraron una estructura abierta más relajada en comparación con los vasos porcinos frescos. No parecía haber diferencias cualitativas en el contenido de GAG, colágeno o de elastina de la EIA o ICA acelular en comparación con los vasos frescos. Los resultados de los ensayos de hidroxiprolina, colágeno desnaturalizado y glicosaminoglicano indicaron que el proceso de descelularización no condujo a la pérdida de colágeno o glicosaminoglicanos del tejido. Aunque el análisis bioquímico cuantitativo proporcionó información sobre el contenido de colágeno y glicosaminoglicano de la matriz acelular, era limitado en cuanto que no fue posible evaluar la integridad estructural de los componentes. Por lo tanto, los niveles de colágeno desnaturalizado se determinaron después del tratamiento con α -quimotripsina, que es capaz de digerir el colágeno degradado sin afectar al colágeno nativo (Banket y colaboradores, 1997). Después de la digestión, se ensayó el sobrenadante de tejido (que contenía cualquier colágeno degradado) para detectar la presencia de hidroxiprolina. Los resultados indicaron que no hubo un aumento significativo en la cantidad total de colágeno desnaturalizado presente en EIA o ICA acelular en comparación con los vasos frescos.

Las preocupaciones relativas a la presencia de SDS residual se abordaron mediante la cuantificación de la concentración de SDS dentro de cada una de las soluciones de descelularización utilizadas para producir EIA e ICA acelulares. El uso de SDS marcado en forma radiactiva (C^{14}) demostró que había niveles extremadamente bajos de SDS presentes en las soluciones de lavado finales usadas en el proceso de descelularización.

La biocompatibilidad de las matrices acelulares se demostró utilizando los ensayos de citotoxicidad del extracto y de contacto. Cada ensayo utilizó dos líneas celulares diferentes, células de riñón de hámster bebé y células 3T3 de ratón. Los datos anteriores han demostrado la biocompatibilidad in vivo de las matrices tratadas con SDS y no fue necesario repetir esto usando EIA o ICA acelulares.

La cuantificación de ADN usando una serie de ensayos diferentes indicó que había una reducción de más del 90% en los niveles de ADN después de la descelularización y estos valores eran significativamente más bajos que la cantidad de ADN aislado de Surgisis. Los niveles de ADN aislados de EIA e ICA porcinas acelulares fueron comparables a los de Permacol y CollaMend. EIA e ICA acelulares contenían $0,014 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ y $0,019 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ respectivamente de ADN. Surgisis contenía $0,119 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$, Permacol $0,028 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ y CollaMend $0,017 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ de ADN. La PCR demostró que cualquier ADN residual era de piezas fragmentadas pequeñas de ADN que no podían ser amplificadas o ADN no codificante de 'basura'. La presencia de retrovirus endógenos porcinos es una preocupación para cualquier injerto xenogénico derivado de porcino. A pesar de esto, prácticamente no hay información sobre los efectos de tales virus en los seres humanos, el potencial de transmisión o los niveles mínimos de seguridad. El número de copias de PERV se determinó usando PCR cuantitativa usando una sonda TaqMan. Los datos indicaron que el ADN de PERV estaba presente en todas las muestras de EIA e ICA porcinas acelulares, así como fibroblastos dérmicos humanos. Hubo una reducción de seis unidades logarítmicas en el número de copias en CFA acelular en comparación con la fresca y una reducción de siete unidades logarítmicas para ICA acelular. El número de copias presente dentro de ICA y EIA acelulares era significativamente más bajo que cualquiera de los productos comercialmente disponibles, ya que no hay niveles mínimos seguros establecidos de retrovirus endógenos porcinos comparado con productos comercialmente disponibles que es crítico. El ensayo no determina si el genoma completo de PERV está presente o si es transcripcionalmente activo. Las propiedades biomecánicas y el cumplimiento de EIA y ICA porcino acelular se evaluaron mediante pruebas de presión de ruptura, pruebas de retención de la sutura, prueba de dilatación y prueba de falla de baja velocidad de deformación. Es esencial que cualquier material de injerto tenga características biomecánicas

similares a las arterias que están reemplazando. No hubo cambios importantes en las propiedades de los vasos acelulares porcinos en comparación con el tejido porcino fresco. No se observaron diferencias significativas entre las presiones de rotura de la EIA o ICA acelulares en comparación con los vasos frescos. Los valores de presión de rotura fueron mucho más altos que las presiones fisiológicas normales experimentadas en las arterias que están en la región de 120 mm de Hg. Los resultados obtenidos para las arterias acelulares fueron comparables a las presiones de ruptura máximas de las arterias humanas (2.031-4.225 mm de Hg) y de la vena safena humana (1.680-2.273 mm de Hg), L'Heureux, N. y colaboradores, 2006).

En cuanto a la activación y detección del complemento de C3a o C5a (Figura 20), los vasos acelulares producidos por los métodos de la presente invención muestran una activación insignificante en comparación con los productos comercialmente disponibles y también de forma muy interesante, comparables con el uréter porcino preparado por los mismos métodos. Esto indica que ha habido un corte exitoso de epítomos antigénicos de los dos tejidos de vasos acelulares.

Los datos recogidos hasta la fecha demuestran que dos vasos acelulares estériles pueden ser producidos en forma confiable usando un fresco protocolo de descelularización que da como resultado un vaso biocompatible que demuestra una reducción > 90% (p/p) en el ADN, niveles mínimos de α -Gal y no es bioquímica o biomecánicamente distinto de los vasos frescos. Además, los datos mostraron que el contenido de PERV de EIA e ICA acelulares era significativamente menor que los productos comercialmente disponibles que tienen un historial clínico probado de uso en pacientes.

Descelularización de las arterias ilíacas externas (EIA) y de las arterias carótidas internas (ICA) porcinas

Se prepararon vasos de EIA y ICA congelados de hasta 200 mm de longitud como se describe en la Figura 1 usando 200 mL de cada solución, en donde cada solución se precalienta a la temperatura apropiada antes del uso. Los vasos se colocan en recipientes estériles individuales de 250 mL y todas las incubaciones se llevan a cabo con agitación a 240 rpm con la excepción de la etapa de la nucleasa que está a 80 rpm. Como en la primera etapa, si la EIA y la ICA están congeladas, el tejido se descongela a 37°C durante 20 minutos, después se lava utilizando una solución de desinfección que comprende vancomicina, sulfato de gentamicina y polimixina B durante 30 minutos a 37°C. La primera etapa de incubación es un lavado usando EDTA 200 mM a 4°C durante 24 horas, seguido de un lavado usando regulador hipotónico (TRIS 10 mM, EDTA 2,7 mM, aprotinina 10KIU/ ml) a 4°C durante 24 horas y un lavado usando SDS al 0,1% (p/v) en regulador hipotónico a 37°C durante 24 horas. Un lavado adicional usando regulador hipotónico a 4°C durante 24 horas es seguido por un lavado usando EDTA en DPBSa que contiene aprotinina durante entre 48-56 horas a 4°C y un lavado usando SDS al 0,1% (p/v) en regulador hipotónico a 37°C durante 24 horas. El tejido se lava luego tres veces usando DPBSa a 37°C durante 30 minutos cada vez y una solución de nucleasa (TRIS 5 mM, 50 μ g/mL de BSA, 50 U/ mL de ADNasa, 1 U/mL de ARNasa) a 37°C durante tres horas. El tejido se lava tres luego veces usando EDTA en DPBSa que contiene aprotinina a 37°C durante 30 minutos cada uno y un lavado adicional de incubación usando solución hipertónica durante 24 horas a 37°C y tres lavados adicionales usando EDTA en DPBSa que contiene aprotinina a 37°C durante 30 minutos cada vez. El tejido se esteriliza a continuación utilizando una solución de ácido peracético al 0,1% (v/v) durante cuatro horas a 27°C. A continuación, se llevan a cabo las siguientes etapas en forma aséptica dentro de una cabina de seguridad de clase II, (i) se lavan tres veces usando EDTA en DPBSa que contiene aprotinina a 37°C durante 30 minutos cada vez (ii) se lavan con DPBSa a 4°C durante 24 horas. El tejido se almacena a continuación en DPBSa a 4°C hasta que sea necesario.

Preparación de tejido/histología

Las muestras de tejido se fijaron en formalina regulada neutra al 10% (v/v) y luego se deshidrataron y se incluyeron en cera de parafina. Se tomaron secciones seriadas y se usó tinción estándar de hematoxilina y eosina (H&E) (Bios Europe Ltd, Skelmersdale, RU) para evaluar la histoarquitectura del tejido y se usó tinción de elastina de Miller para evaluar el contenido de elastina. Los ácidos nucleicos se tiñeron usando tinción DAPI (Sigma-Aldrich) y Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich). Los anticuerpos monoclonales IgM contra el epítomo α -Gal se obtuvieron a través de Alexis Biochemicals, San Diego, EE.UU. y se purificaron antes de su uso.

Ensayo de adsorción de anticuerpo para α -Gal

Se utilizó ELISA para determinar los niveles de anticuerpo α -Gal no unido después de la incubación con muestras de tejido. Las muestras se incubaron con 500 μ l de BSA al 5% (p/v) en DPBS durante la noche a 4°C, se dispuso entonces el BSA y cada tubo se lavó tres veces durante dos minutos usando 500 μ l de DPBS. Se pesaron exactamente 100 mg de tejido y se maceraron finamente y se colocaron en microtubos bloqueados con 1 ml de anticuerpo monoclonal anti- α -gal en diluyente de anticuerpo (0,37 μ g.mL⁻¹) y se dejó durante la noche a 4°C en una centrifuga. Los microtubos que contienen tejido se centrifugaron a 600 x g durante 15 minutos (o 13.000 rpm en microcentrifuga) y se extrajeron 750 μ L de sobrenadante a microtubos bloqueados frescos a los que se añadieron 750 μ L de BSA en TBS-azida y luego se mezclaron y centrifugaron a 600 x g durante 15 minutos. Se extrajo otros 750 μ L de sobrenadante y se analizó el sobrenadante para anticuerpo para α -Gal mediante ELISA añadiendo 50 μ L de BSA con α -Gal a 10 μ g.mL⁻¹ en DPBS a los pozos de la placa de microtitulación Maxisorb durante la noche a 4°C. Estos se lavaron 3 veces durante 10 min utilizando 300 μ L de Tween en DPBS con agitación y cada pozo de la placa de microtitulación Maxisorb recubierta se bloqueó con 250 μ L de BSA al 5% (p/v) en DPBS durante una noche a 4°C. Posteriormente, se lavó cada pozo 3 veces

durante 30 min utilizando 300 μ L de Tween de DPBS con agitación y se transfirieron 100 μ L de las muestras a los pozos relevantes de la placa de microtitulación recubierta y bloqueada. Esto se incubó entonces a temperatura ambiente durante tres horas y se lavó adicionalmente antes de la adición de 50 μ L de anticuerpo secundario anti-ratón de conejo conjugado con peroxidasa de rábano picante (dilución 1:1000). Esto se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente y se lavó adicionalmente antes de añadir 100 μ L de solución de OPD e incubación durante 10 min a temperatura ambiente, en la oscuridad. Se añadieron 50 μ L de ácido sulfúrico 3 M a cada pozo y se midieron las densidades ópticas usando un espectrofotómetro de microplacas a 492 nm con un filtro de referencia a 630 nm. Los valores de cada muestra se graficaron como la media \pm 95% de los límites de confianza y se determinó cualquier diferencia significativa.

10 Ensayo de hidroxiprolina.

Antes de realizar el ensayo de hidroxiprolina, las muestras se liofilizaron hasta un peso constante antes de ser hidrolizadas mediante incubación con ácido clorhídrico 6 M (HCl) durante 4 h a 120°C y se neutralizaron usando hidróxido de sodio (NaOH). El procedimiento adoptado se basó en el método descrito por Edwards y O'Brien [29]. Se prepararon soluciones de calibración estándar utilizando trans-4-hidroxi-L-prolina (Sigma). Se añadió solución de ensayo (50 μ L) a los pozos de una placa de 96 pozos de fondo plano a la que se añadieron 100 μ L de solución oxidante (hidrato de cloramina T, Sigma) y se dejó durante 5 min con agitación suave. Se añadió entonces reactivo de Ehrlich (100 μ L) a cada pozo. La placa se cubrió entonces y se incubó a 60°C en un baño de agua durante 45 min antes de leer la absorbancia a 570 nm. La concentración de hidroxiprolina se determinó después por interpolación a partir de una curva patrón de hidroxiprolina.

Ensayo de glicosaminoglicano

La cantidad de azúcares sulfatados (GAG) se determinó mediante unión a azul de dimetilmetileno (Enobakhare y colaboradores, Anal. Biochem, 243, 189, 1996, Farndale y colaboradores, Biochim, Biophys, Acta., 883, 173, 1986). En resumen, las soluciones de ensayo se incubaron con la solución de azul de dimetilmetileno y se leyó la absorbancia a 525 nm. La cantidad de GAG se calculó por interpolación a partir de una curva estándar preparada usando sulfato de condroitina y regulador de ensayo de fosfato (ortofosfato dihidrógeno de sodio 0,1 M, ortofosfato hidrógeno disódico 0,1 M, pH 6,8) en un intervalo de concentraciones.

30 Ejemplo 1

La ICA y la EIA porcinas tratadas fijadas con formalina se seccionaron hasta 5 μ m y se tiñeron usando hematoxilina y eosina (Figura 2). Cuando se utilizaron dos ciclos de regulador hipotónico y SDS no hubo evidencia de células residuales o restos celulares (Figura 2). Además, la histoarquitectura de la matriz parecía haber permanecido intacta después del tratamiento. Las secciones de ICA y EIA de porcino tratadas fijadas con formalina se tiñeron para la presencia de ADN bicatenario usando DAPI, se utilizaron ICA y EIA porcinas frescas como controles positivos (Figura 3). La tinción demostró la falta de ADN bicatenario y de células dentro de la matriz en comparación con el fresco tejido de control (Figura 3). Cuando el tiempo de exposición se incrementó en un factor de diez, no se observó fluorescencia como resultado de la presencia de ADN bicatenario y por lo tanto de células.

Ejemplo 2

Es deseable que las matrices xenogénicas acelulares estén desprovistas del epítipo α -Gal si se van a utilizar clínicamente para mitigar las reacciones inflamatorias mediadas por anticuerpos. Por lo tanto, es necesario desarrollar un método confiable para detectar su presencia dentro de los vasos acelulares. Las muestras de EIA porcina fresca y acelular (dos ciclos de SDS) se fijaron con formalina, se incluyeron en parafina y se cortaron en secciones de 5 μ m. Las secciones de EIA porcina fresca y acelular se marcaron para la presencia del epítipo α -Gal usando un anticuerpo monoclonal IgM (Alexis 801-090, clon M86, dilución 1:10). Se utilizó el kit Dako Envision para visualizar el anticuerpo primario (Figura 4). Los resultados demostraron la presencia del epítipo α -Gal después de la descelerización. También había un alto grado de tinción de fondo; esto estaba ausente cuando se utilizó un anticuerpo de control del isotipo IgM para marcar las muestras. Otros experimentos mostraron que el tejido fresco demostró una buena marcación positiva con el anticuerpo monoclonal IgM (datos no mostrados) y que el anticuerpo purificado parecía producir una mayor especificidad de marcación en comparación con la preparación sin purificar (datos no mostrados). La marcación demostró una reducción en el contenido de α -Gal cuando se usó regulador hipertónico junto con un lavado con EDTA 200 mM llevado a cabo a 4°C durante 24 horas (Figuras 5). No hubo diferencias en los niveles de contenido de α -Gal cuando se usaron ciclos crecientes de regulador hipertónico. Por lo tanto, se adoptó una incubación de 24 horas en regulador hipertónico a 37°C para separar el epítipo α -Gal de matrices acelulares junto con un lavado inicial de EDTA 200 mM llevado a cabo a 4°C durante 24 horas. Para la posterior descelerización tisular, se adoptó el protocolo en la Figura 1.

Ejemplo 3

Con el fin de determinar si había α -Gal residual presente dentro de los vasos acelulares era importante determinar la especificidad de la marcación del anticuerpo. Se marcaron muestras de EIA y ICA frescas y acelulares junto con EIA y ICA tratadas con α -galactosidasa, frescas y acelulares, para la presencia del epítipo α -Gal usando un clon M86 de

anticuerpo monoclonal IgM (Alexis ALX - 801 - 090) y se visualizaron usando el Kit Dako Envision. Se usaron tres preparaciones diferentes del anticuerpo: (i) anticuerpo purificado (dilución 1:4 - 0,39 mg.mL⁻¹) (ii) anticuerpo purificado adsorbido usando BSA y (iii) anticuerpo purificado adsorbido usando BSA con α -Gal. La Figura 6 muestra la EIA acelarar marcada usando un anticuerpo monoclonal contra el epítipo α -Gal, purificada (A), adsorbida contra BSA (B) o adsorbida contra BSA con α -Gal (C) o un control de isotipo de IgM (D) con un aumento original x 100. La Figura 7 muestra lo mismo, pero para ICA acelarar

La marcación de anticuerpos de tejido fresco demostró una fuerte marcación positiva definida en toda la matriz; esto podría reducirse significativamente con el tratamiento con α -galactosidasa. Los resultados indicaron que el anticuerpo purificado fue "limpiado" adicionalmente por absorción con BSA. El anticuerpo "purificado" absorbido con BSA es específico para α -Gal ya que la absorción con BSA con α -Gal cortó totalmente la unión a tejido fresco. Además, había un mínimo de α -Gal presente dentro de ICA y EIA acelulares, la superficie luminal estaba totalmente despejada. Una inspección cercana de las secciones por microscopía reveló que cualquier marcación de fondo con el anticuerpo absorbido por BSA era mínima. El estudio demostró además que la marcación de fondo no puede eliminarse mediante tratamiento con α -galactosidasa.

Ejemplo 4

Se usó un ensayo semicuantitativo de adsorción de anticuerpos para estimar la cantidad de α -Gal presente en tejidos porcinos. Se utilizó un ELISA para cuantificar el anticuerpo anti- α -Gal no ligado presente después de la incubación con muestras de tejido macerado. El control negativo utilizado fue un control sin tejido y los datos indicaron que había una diferencia significativa entre el control sin tejido, los vasos acelulares y la piel humana. Se usaron arterias femorales comunes alogénicas frescas y acelulares como controles para este ensayo (Figura 8). El ensayo mostró que las arterias femorales comunes frescas y acelulares estaban libres del epítipo α -Gal. No hubo diferencias significativas en la unión del anticuerpo α -Gal a EIA o ICA porcinas acelulares en comparación con el control sin tejido, o las arterias femorales comunes alogénicas frescas y acelulares (Figura 8). Sin embargo, hubo una diferencia significativa entre el anticuerpo unido a EIA e ICA acelarar comparado con fresco (Figura 8, ANOVA unidireccional y prueba T post hoc).

Ejemplo 5

Para evaluar completamente los efectos del protocolo de descelarización en las matrices, se ensayaron muestras de EIA y ICA frescas y acelulares (n = 6) para determinar sus componentes principales. Para cuantificar las muestras de tejido hidrolizadas con ácido de colágeno, se analizó el contenido de hidroxiprolina siguiendo el método de Edwars & O' Biran (1980). El ensayo generó una relación lineal entre una curva estándar producida usando Trans-4-HIDROXIL-L-PROLINA y absorbancia a 570 nm. Los valores del ensayo se convirtieron en $\mu\text{g}.\text{mg}^{-1}$ y los valores de hidroxiprolina se convirtieron en colágeno mediante multiplicación por 7,46. Se encontró que el contenido de colágeno de la ICA fresca y acelarar era de 795,2 $\mu\text{g}.\text{mg}^{-1}$ y 700,6 $\mu\text{g}.\text{mg}^{-1}$ respectivamente. El contenido de colágeno de EIA fresco y acelarar fue de 572,3 $\mu\text{g}.\text{mg}^{-1}$ y 547,3 $\mu\text{g}.\text{mg}^{-1}$, respectivamente. Los valores no fueron significativamente diferentes (ANOVA unidireccional y prueba T post hoc).

Para cuantificar el contenido de GAG, se ensayaron muestras de tejido hidrolizado con ácido para determinar el contenido de azúcar carboxilado sulfatado utilizando colorante azul de dimetileno (Farndale y colaboradores, 1986). El ensayo generó una relación lineal entre una curva estándar producida utilizando sulfato de condroitina B y absorbancia a 525 nm, los valores del ensayo se normalizaron para la masa de la muestra y se expresaron como $\mu\text{g}.\text{mg}^{-1}$. Se determinó que el contenido de GAG sulfatado de ICA fresca era 63,8 $\mu\text{g}.\text{mg}^{-1}$ en comparación con el ICA acelarar que era de 57,0 $\mu\text{g}.\text{mg}^{-1}$. Se encontró que el contenido de GAG de EIA fresca y acelarar era de 64,5 $\mu\text{g}.\text{mg}^{-1}$ y 54,7 $\mu\text{g}.\text{mg}^{-1}$ respectivamente. Los valores no fueron significativamente diferentes (ANOVA unidireccional y prueba T post hoc, Figuras 9A y 9B).

El contenido de colágeno desnaturalizado o dañado se evaluó usando digestión enzimática de tejidos usando α -quimotripsina seguido de hidrólisis ácida. Los niveles de hidroxiprolina se determinaron y se convirtieron en colágeno. El ensayo generó una relación lineal entre una curva estándar producida usando Trans-4-HIDROXIL-L-PROLINA y absorbancia a 570 nm. Se encontró que el contenido de colágeno desnaturalizado de ICA fresca y acelarar era de 30,8 $\mu\text{g}.\text{mg}^{-1}$ y 26,6 $\mu\text{g}.\text{mg}^{-1}$ respectivamente. El contenido de colágeno desnaturalizado de EIA fresco y acelarar fue de 30,8 y 21,5 $\mu\text{g}.\text{mg}^{-1}$ respectivamente. Los valores no fueron significativamente diferentes (ANOVA unidireccional y prueba T post hoc, Figuras 9A y 9B).

Ejemplo 6

El ensayo de citotoxicidad de contacto se usó para determinar el efecto de las matrices acelulares sobre el crecimiento celular; esto se utilizó como una evaluación preliminar de la biocompatibilidad. Se disecaron asépticamente muestras pequeñas de EIA e ICA porcinas acelulares (n = 3) y se adhirieron al centro de los pozos de placas de cultivo de tejidos utilizando gel de colágeno, se añadió una suspensión de células de ratón 3T3 libre o de riñón de hámster bebé libres de micoplasma a cada pozo y se cultivaron durante 48 horas. Cada pozo se observó usando microscopía de contraste de fases y después de fijación con formalina y tinción usando tinción de Giemsa. El examen microscópico de las placas de citotoxicidad de contacto mostró que los fibroblastos 3T3 de ratón (Figura 11) y las células de riñón de hámster bebé

(Figura 10) crecieron y en contacto con material acelular. No se observaron cambios evidentes en la morfología celular ni en la lisis celular. El pegamento de cianoacrilato (control positivo) demostró causar lisis celular. El colágeno solo (control negativo) no mostró signos de citotoxicidad.

5 Ejemplo 7

Se maceraron muestras de EIA e ICA porcinas frescas y descelerizadas y se incubaron a una concentración de 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ en DMEM a 37°C con agitación durante 72 horas con el fin de extraer cualquier componente soluble. Este extracto se incubó junto con monocapas de células de riñón de ratón 3T3 libres de micoplasma y células de riñón de hámster bebé durante 48 horas, después de lo cual se determinaron los niveles de ATP utilizando el ensayo ATP-Lite-M comercialmente disponible (Perkin Elmer). Se usaron dos líneas celulares diferentes; células de ratón 3T3, una línea celular fibroblástica y células de riñón de hámster bebé, una línea de células epiteliales. Los resultados no demostraron una diferencia significativa entre el contenido relativo de ATP y, por lo tanto, la viabilidad de las células 3T3 de ratón incubadas con DMEM y las muestras extraídas de ICA porcina acelular (Figuras 12A y 12B). Hubo un aumento significativo en la viabilidad celular cuando las células 3T3 de ratón se incubaron con extractos de EIA porcina acelular (Figura 12B). Hubo una diferencia significativa entre el contenido de ATP de células 3T3 incubadas con DMEM o extractos acelulares en comparación con extractos de tejido fresco (Figura 12A). Los niveles de ATP presentes en las células 3T3 cultivadas en presencia de DMSO al 40% (v/v) fueron significativamente más bajos que cualquiera de las otras muestras ensayadas (Figura 12A y 12B). Hubo un aumento significativo en los niveles de ATP de células de riñón de hámster bebé cultivadas con extractos de EIA o ICA porcinas acelulares en comparación con DMEM (Figuras 12C y 12D). No hubo diferencia significativa entre el contenido de ATP de células de riñón de hámster bebé incubadas con DMEM o extractos acelulares en comparación con extractos de tejido fresco (Figura 12C y 12D). Los niveles de ATP presentes en las células de riñón de hámster bebé cultivadas en presencia de DMSO al 40% (v/v) fueron significativamente más bajos que cualquiera de las otras muestras probadas (Figura 12C y 12D).

25 Ejemplo 8

El ADN se aisló a partir de muestras (n = 3) de EIA e ICA porcinas frescas y acelulares usando un kit comercialmente disponible (Qiagen) y se cuantificó usando absorbancia a 260 nm. También se incluyeron en el análisis una serie de productos comercialmente disponibles: Surgisis, Permacol y CollaMend. Los datos indicaron que había una reducción de más del 90% en los niveles de ADN después de la descelerización. La EIA y la ICA acelular contenían 0,014 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ y 0,019 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ respectivamente de ADN (Figura 13). Surgisis contenía 0,119 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$, Permacol 0,028 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ y CollaMend 0,017 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ de ADN (Figura 13). La EIA y la ICA acelulares contenían una cantidad significativamente menor de ADN que Surgisis (Figura 13).

35 Ejemplo 9

Se llevó a cabo una PCR y una RT-PCR usando ADN extraído y ARN total. Se utilizaron cebadores contra GAPDH y TNF α para amplificar el ADN extraído de EIA e ICA frescas y acelulares. El colorante verde fluorescente se utilizó para detectar cualquier producto de PCR. La reacción de PCR no detectó ningún producto GAPDH o TNF α en muestras de ADN extraído de EIA o ICA acelulares (Tabla 1). Por lo tanto, cualquier ADN presente era probable que fuera de fragmentos y ADN no codificante y, por lo tanto, no funcional, meramente para actividades de "mantenimiento".

La Tabla 1 muestra el número de ciclos en los que se detectaron productos de PCR cuando se usaron cebadores contra GAPDH y TNF α contra DNA aislado en una PCR verde syber.

Muestra	Cebador	Valor de umbral	Valor de Ct
EIA fresca	GAPDH	0,210	33,75
EIA acelular	GAPDH	0,210	Sin valor de ct
ICA acelular	GAPDH	0,210	Sin valor de ct
EIA fresca	NPC	0,210	Sin valor de ct
EIA acelular	NPC	0,210	Sin valor de ct
ICA acelular	NPC	0,210	Sin valor de ct
EIA fresca	TNF α	0,210	29,99
EIA acelular	TNF α	0,210	Sin valor de ct
ICA acelular	TNF α	0,210	Sin valor de ct
Control sin plantilla	GAPDH	0,210	Sin valor de ct
Control sin plantilla	TNF α	0,210	Sin valor de ct

Se llevó a cabo la detección de GAPDH (Tabla 2) y TNF α (Tabla 3) usando una reacción de RT-PCR de dos etapas de ARN total extraído de EIA e ICA frescas y acelulares. El colorante fluorescente verde syber se utilizó para detectar cualquier producto de PCR. La reacción de RT-PCR no detectó ningún producto de GAPDH o TNF α en muestras de ARN total extraído de EIA o ICA acelulares cuando se comparó con muestras frescas.

La Tabla 2 muestra el número de ciclos en los que se detectaron productos de PCR cuando se usaron cebadores contra GAPDH contra ARN aislado en una RT-PCR de dos etapas.

Muestra	Cebador	Valor de umbral	Valor de Ct
EIA fresca	GAPDH	0,212	47,03
EIA acelular	GAPDH	0,212	Sin valor de ct
ICA fresca	GAPDH	0,212	49,14
ICA acelular	GAPDH	0,212	Sin valor de ct
Control sin plantilla	GAPDH	0,212	Sin valor de ct
EIA fresca	Control sin cebador	0,212	Sin valor de ct
EIA acelular	Control sin cebador	0,212	Sin valor de ct
ICA fresca	Control sin cebador	0,212	Sin valor de ct
ICA acelular	Control sin cebador	0,212	Sin valor de ct

La Tabla 3 muestra el número de ciclos en los que se detectaron productos de PCR cuando se usaron cebadores contra TNF α contra ARN aislado en una RT-PCR de dos etapas.

Muestra	Cebador	Valor de umbral	Valor de Ct
EIA fresca	TNF α	0,123	37,52
EIA acelular	TNF α	0,123	Sin valor de ct
ICA fresca	TNF α	0,123	36,78
ICA acelular	TNF α	0,123	Sin valor de ct
Control sin plantilla	TNF α	0,123	Sin valor de ct
EIA fresca	Control sin cebador	0,123	Sin valor de ct
EIA acelular	Control sin cebador	0,123	Sin valor de ct
ICA fresca	Control sin cebador	0,123	Sin valor de ct
ICA acelular	Control sin cebador	0,123	Sin valor de ct

5 Ejemplo 10

La detección y cuantificación de retrovirus endógenos porcinos se llevó a cabo utilizando PCR cuantitativa en tiempo real utilizando una sonda TaqMan. El ADN se aisló a partir de muestras (n = 3) de EIA e ICA porcinas frescas y acelulares usando un kit comercialmente disponible (Qiagen) y se cuantificó usando absorbancia a 260 nm. También se incluyeron en el análisis una serie de productos comercialmente disponibles: Surgisis, Permacol y CollaMend. También se aisló ADN a partir de fibroblastos dérmicos humanos primarios obtenidos a partir de una fuente comercial.

La Tabla 4 muestra el número de copias del genoma de PERV presente en el suero, EIA, ICA, Permacol, CollaMend, Surgisis y fibroblastos humanos primarios. Los datos representan la media (n = 3).

Muestra	Valor de Ct	Copia No.
EIA fresca	22,54	4,52E+05
EIA acelular	36,76	2,54E-01
ICA fresca	23,94	2,61E+05
ICA acelular	38,21	8,32E-02
Permacol	32,14	5,92
CollaMend	35,21	13,46
Surgisis	31,02	2,54E+01
Fibroblastos	18,44	2,30E+01
NTC	Sin valor de ct	N/A

Los datos indicaron que el ADN de PERV estaba presente en todas las muestras ensayadas (Tabla 4). Hubo una reducción de seis unidades logarítmicas en el número de copias en CFA acelular en comparación con ICA fresca y una reducción de siete unidades logarítmicas de ICA acelular. El número de copias presentes dentro de ICA y EIA acelulares fue significativamente menor que cualquiera de los productos comercialmente disponibles (ANOVA unidireccional y prueba T post hoc). El ensayo no determina si está presente el genoma completo de PERV o si es transcripcionalmente activo.

Ejemplo 11

Se ensayaron muestras de EIA e ICA porcinas frescas y acelulares (15 cm de longitud) para determinar su capacidad para soportar una presión creciente usando un aparato de presión de ruptura diseñado a la medida. La presión interna se aumentó hasta un máximo de 3.750 mm de Hg para cada vaso. Se analizó la EIA porcina acelular que se había tratado usando ácido peracético al 0,1% (v/v) durante tres o cuatro horas para determinar si esta etapa tenía un efecto perjudicial sobre la biomecánica de la matriz. Los resultados demostraron que no hay diferencia significativa entre las presiones máximas capaces de ser soportadas por EIA o ICA porcinas frescas o acelulares (datos no mostrados). Dos de las muestras frescas fallaron en la región de ligadura usando suturas y ninguna de las muestras acelulares fracasó como resultado de la colocación o en los sitios de ligación o unión. La presión de ruptura media de la ICA acelular fue de 3.624 mm de HG en comparación con 3.750 mm de HG para EIA acelular. No hubo diferencia significativa entre EIA acelular que se había tratado con ácido peracético al 0,1% (v/v) durante tres o cuatro horas.

Ejemplo 12

Se realizaron pruebas de retención de sutura en EIA e ICA porcinas acelulares, se compararon los datos con muestras frescas. Se colocó una sola sutura en la muestra de tejido usando Proleno 4-0 y se aseguró usando un nudo triple. El ensayo se llevó a cabo utilizando sistemas de ensayo de modelos de mesa de la serie Instron 5860 a una velocidad de 10 mm.min⁻¹. Los datos se presentaron como la fuerza máxima en Newtons; cada tejido fue capaz de soportar antes de retirar la sutura. No hubo diferencias significativas entre la máxima resistencia a la retención de la sutura de EIA o ICA frescas en comparación con las muestras acelulares (Figura 14).

Ejemplo 13

La intención de este estudio fue cuantificar la expansión circunferencial y axial de EIA e ICA porcinas frescas y acelulares (n = 3). Los datos adquiridos durante la prueba de dilatación incluyeron imágenes fijas de EIA e ICA porcinas frescas y acelulares en los intervalos de presión aplicados incrementalmente (n = 3). Todas las imágenes fueron analizadas en el software Image Pro Plus V 5.41. Se determinó la dilatación tanto en el eje X como en el Y. Los resultados se presentaron como un cambio porcentual en el diámetro de la raíz como una función del aumento de la presión interna (Figuras 15A-D). Los datos demostraron dos resultados estadísticamente significativos; la dilatación de ICA acelular en el eje X (Figura 15A) fue significativamente mayor que la dilatación de ICA fresca. Adicionalmente, la dilatación de ICA porcina acelular fue mayor que la de ICA fresca en el eje Y (Figura 15B). Cada una de las otras curvas de dilatación fue similar y no demostró diferencias significativas entre los tejidos frescos y acelulares (Figuras 15A-D).

Ejemplo 14

Las muestras de EIA e ICA porcinas frescas y acelulares se ensayaron utilizando sistemas de ensayo de un modelo de mesa de la serie Instron 5860 a una velocidad de 10 mm.min⁻¹. Durante la baja tasa de deformación para medir el fallo de la carrera del cabezal en mm, se registraron la respuesta del transductor de carga y el tiempo en ms durante la duración de cada prueba. Las dimensiones de cada muestra de tejido se normalizaron y se registró el grosor usando un calibre de espesor antes del montaje en el equipo de ensayo. Cada ensayo se llevó a cabo tanto en las direcciones axial y circunferencial (n = 6). Los datos se analizaron utilizando Microsoft Excel y GraphPad Prisma y curvas de deformación por esfuerzo producidas para cada muestra. Los siguientes parámetros se determinaron usando los datos y las curvas de tensión de deformación: resistencia final a la tracción (N), colágeno y módulo de elasticidad (MPa, Figuras 16, 17 y 18).

Los datos no demostraron diferencias significativas en las propiedades mecánicas de EIA o ICA acelulares cuando se compararon con tejidos frescos. Se encontró que la resistencia final media a la tracción de la ICA fresca era de 3,90 ± 0,64 MPa y 4,13 ± 1,00 MPa para las direcciones axial y circunferencial respectivamente. Los valores correspondientes para la ICA acelular fueron 3,92 ± 0,87 MPa y 4,82 ± 0,87 MPa. Los valores medios del resto de los parámetros biomecánicos se enumeran en la Tabla 5. Los datos biomecánicos indicaron que el procedimiento de descelerización no provocó cambios significativos en el tejido.

La Tabla 5 muestra los parámetros biomecánicos de la baja tasa de deformación para medir el fallo de EIA e ICA porcinas frescas y acelulares. Los datos se expresan como la media (n = 6) ± 95% de los límites de confianza.

	EI-E (GPa)	Coll-E (GPa)	σUTS (MPa)	Espesor (mm)
EIA fresca				
Circunferencial				
Media	6,95	15,73	4,44	0,56
95% (L. de C.)	2,53	3,73	0,77	0,05
Axial				
Media	2,99	9,39	3,30	0,46
95% (L. de C.)	0,70	2,19	0,94	0,06
EIA acelular				
Circunferencial				
Media	6,52	10,94	4,13	0,55
95% (L. de C.)	2,03	1,36	1,00	0,08
Axial				
Media	2,34	9,05	2,95	0,48
95% (L. de C.)	0,25	2,3	1,04	0,07
ICA fresca				
Circunferencial				
Media	5,91	17,44	4,77	1,03
95% (L. de C.)	1,67	3,78	0,76	0,08
Axial				
Media	3,30	11,95	3,90	1,11
95% (L. de C.)	1,46	3,08	0,64	0,04

ICA acelular				
Circunferencial				
Media	5,36	13,97	4,82	1,03
95% (L. de C.)	0,46	3,09	0,87	0,13
Axial				
Media	3,12	12,55	3,92	1,01
95% (L. de C.)	0,71	2,43	0,87	0,10

Ejemplo 15

5 Dado que extensas investigaciones han demostrado que los procedimientos desarrollados en esta invención eliminan α -Gal medido por inmunocitoquímica y ELISA semicuantitativa, se decidió someter el tejido a una prueba funcional adicional para determinar si los injertos arteriales porcinos acelulares activarán el complemento en suero humano. Los injertos arteriales generados por el proceso de descelularización se compararon con productos competidores comercialmente disponibles. Las muestras de cada biomaterial se incubaron en presencia de suero humano normal durante una hora a 37°C. El suero fue recogido y sometido a ELISA para determinar la presencia de C3a o C5a. Los resultados iniciales demostraron que zimosano [un control positivo] causó la activación del complemento de suero humano normal cuando se comparó con un control negativo de PBS (Figura 20). Los resultados demostraron que α -Gal conjugado con BSA era capaz de iniciar la activación del complemento en suero humano normal (Figura 19).

10 Los resultados de ELISA demostraron la producción de C3a y C5a en suero humano normal en respuesta a tejidos porcinos frescos (Figura 20). Esto no se observó con suero que reaccionó con tejidos humanos frescos o humanos acelulares porcinos. Cuando se hizo reaccionar el suero humano con Surgisis, se generaron C3a y C5a. Cuando se hizo reaccionar el suero humano con Permacol^{MR} o CollaMend^{MR}, no se observó aumento en C3a o C5a (Figura 21). Estos estudios proporcionan una fuerte evidencia de que las estructuras acelulares porcinas no contienen epítomos capaces de reaccionar con anticuerpos humanos preformados y complemento activador.

20

25

30

35

40

45

50

55

Reivindicaciones

- 5 1. Un método de preparación de un tejido vascular xenogénico acelular natural, comprendiendo el método la obtención de un vaso sanguíneo donante adecuado y sometiénolo a las siguientes etapas metodológicas:
- (i) una incubación previa al tratamiento con ácido etilendiaminotetraacético 200 mM (EDTA) durante al menos 24 horas a aproximadamente 4°C;
- 10 (ii) un lavado de desinfección;
- (iii) al menos dos ciclos de una incubación con un regulador hipotónico y un detergente aniónico;
- (iv) un tratamiento de nucleasa;
- (v) un lavado hipertónico; y
- (vi) un proceso terminal de esterilización.
- 15 2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que las etapas (i) y (ii) pueden invertirse antes de la etapa (iii).
3. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el detergente aniónico es dodecilsulfato de sodio (SDS).
- 20 4. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el procedimiento de esterilización terminal proporciona un aclaramiento viral y una reducción de la carga biológica.
5. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 que incluye además una etapa de recubrir una superficie interna y/o externa del tejido vascular xenogénico acelular natural con un material seleccionado del grupo que comprende anticoagulantes, inhibidores sintéticos de pentasacáridos, inhibidores directos de trombina, antagonistas de la vitamina K, inhibidores del Factor Xa, plata, colágeno IV, elastina, glicoproteínas, glicosaminoglicanos y péptidos sintéticos o naturales o mezclas de los mismos.
- 25 6. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que incluye además una etapa de siembra del tejido vascular xenogénico acelular natural con una población única o mixta de células seleccionadas del grupo que comprende células epiteliales, células de músculo liso, células madre pluripotentes y multipotentes y fibroblastos.
- 30 7. Un producto obtenido por el método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6 que comprende una matriz de tejido vascular xenogénico acelular natural que tiene al menos una reducción del 80% en el contenido de ADN en comparación con una matriz de tejido vascular de control sin tratar, estando el producto sustancialmente libre de epítomos capaces de reaccionar con anticuerpos humanos preformados y también sin la capacidad de activar sustancialmente el complemento.
- 35 8. Un producto de acuerdo con la reivindicación 7 que es o bien (i) arteria ilíaca externa de porcino (EIA) o una arteria carótida interna de porcino (ICA), o (ii) bovina y se selecciona del grupo que comprende el grupo que comprende arteria carótida, arteria mamaria interna, arteria torácica interna, vena mesentérica y vena yugular.
- 40 9. Un producto de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 7 u 8, en el que el vaso sanguíneo donante porcino tiene una longitud de hasta 30 cm y el vaso sanguíneo del donante bovino tiene una longitud de hasta 80 cm.
- 45 10. Un producto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9 que tiene una propiedad bioquímica o biomecánica equivalente o no sustancialmente diferente seleccionada del grupo que comprende colágeno, glicosaminoglicano, contenido de elastina, presión de ruptura, retención de sutura, resistencia a la tracción final y baja tasa de deformación en comparación con los tejidos frescos o sin tratar.
- 50 11. Un producto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, que comprende además un recubrimiento, estando el recubrimiento provisto de un material adecuado revestido sobre una o ambas de una superficie interna (lumen) o su superficie externa, opcionalmente en el que el material de recubrimiento se selecciona del grupo que comprende anticoagulantes, inhibidores de pentasacáridos sintéticos, inhibidores directos de trombina, antagonistas de la vitamina K, inhibidores del Factor Xa, plata, colágeno IV, elastina, glicoproteínas, glicosaminoglicanos y péptidos sintéticos o naturales o mezclas de los mismos.
- 55 12. Un producto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11 que se siembra sobre el mismo o en el mismo con una población única o mixta de células, opcionalmente en el que la población celular se selecciona de acuerdo con un sitio de trasplante y se selecciona del grupo que comprende células epiteliales, células de músculo liso, células madre pluripotentes y multipotentes y fibroblastos.
- 60 13. Un producto que comprende un producto de tejido de matriz de tejido vascular xenogénico acelular natural obtenido por el método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para uso como tejido de trasplante.
- 65 14. Un producto de acuerdo con la reivindicación 13 que es para uso en cirugía de derivación o en acceso vascular.

FIGURA 1

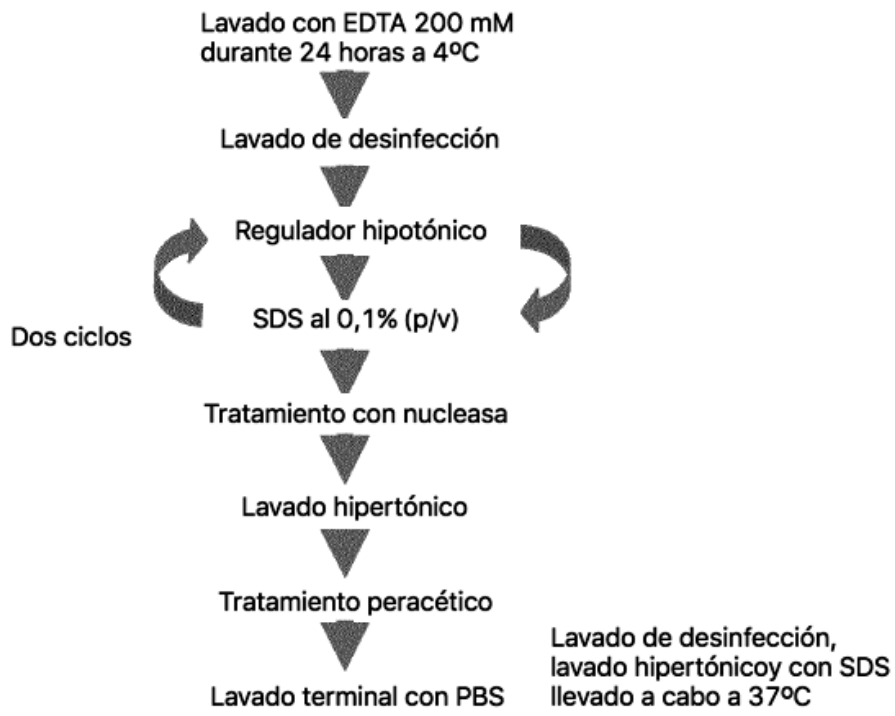


FIGURA 3

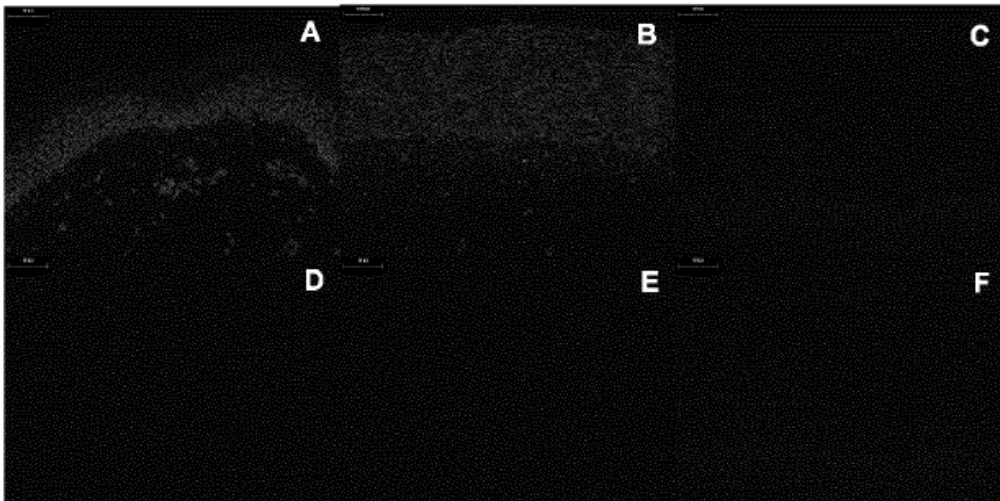


FIGURA 2

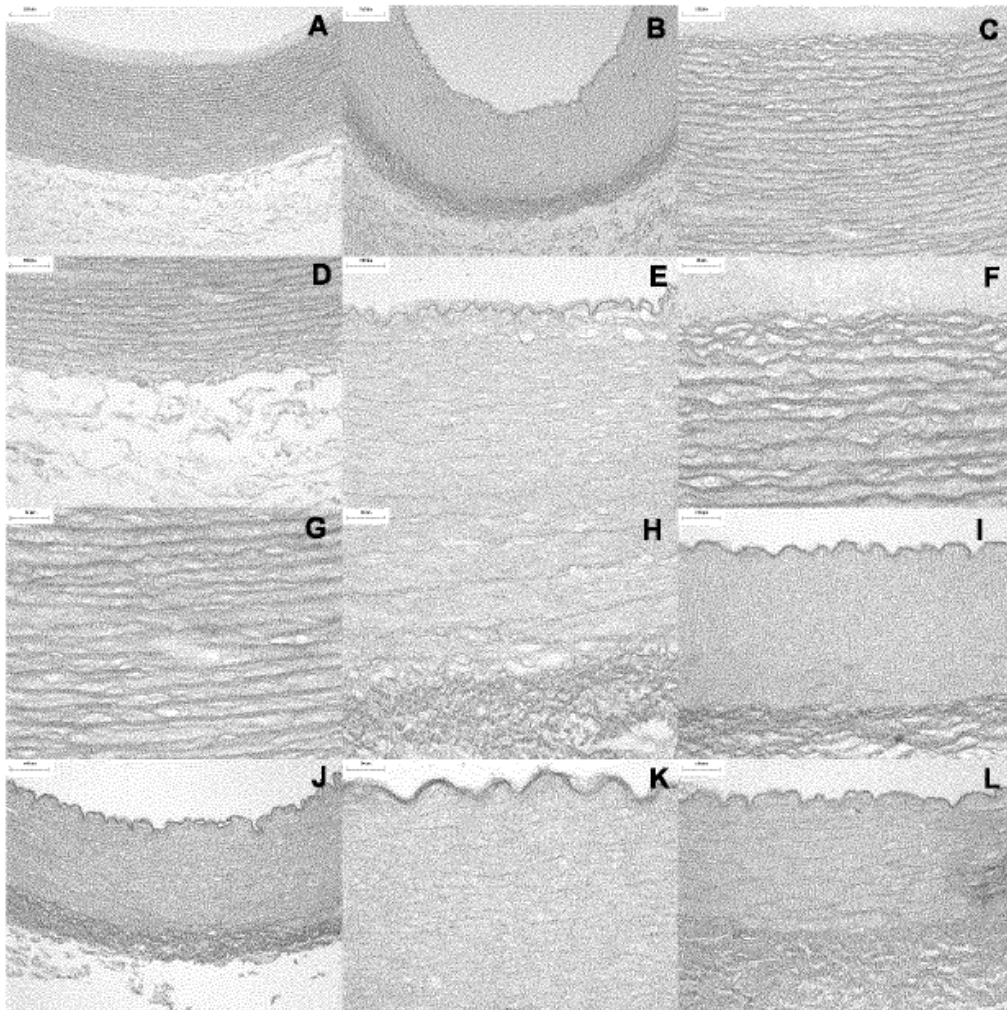


FIGURA 4

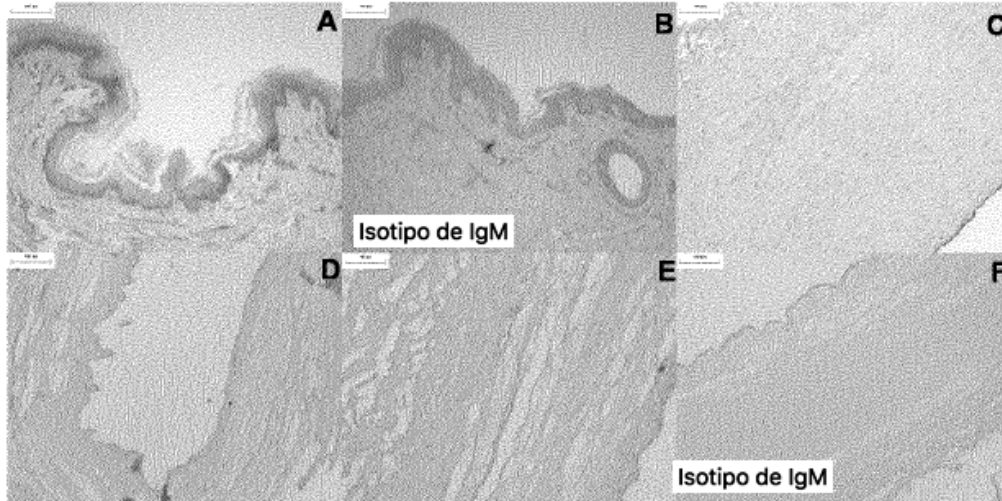


FIGURA 5

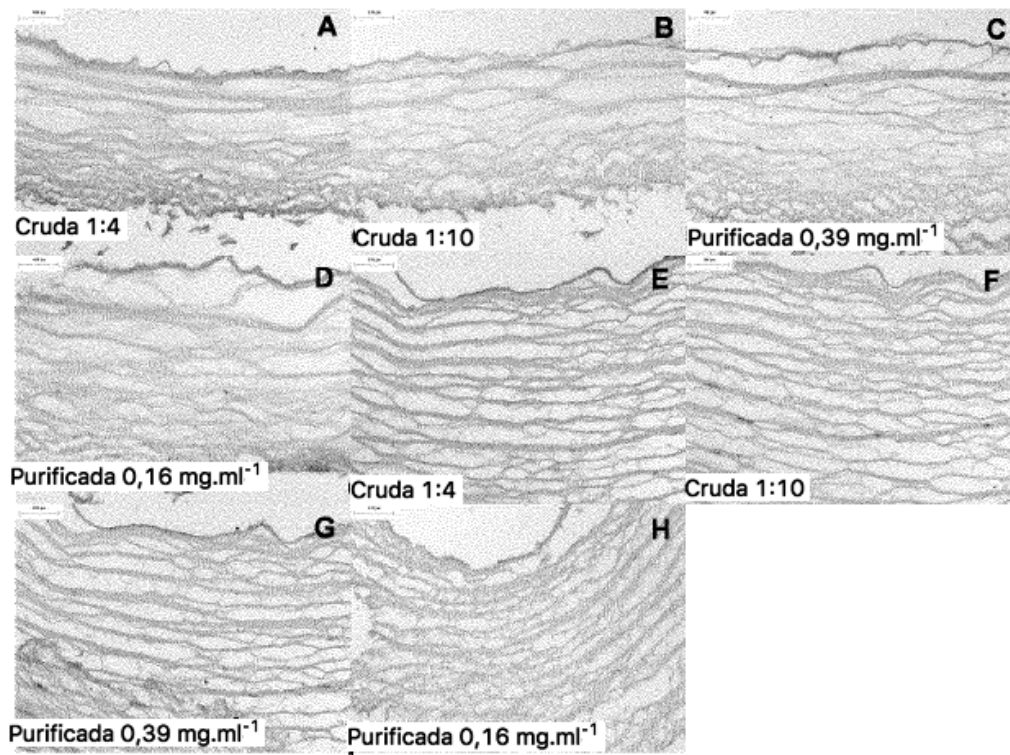


FIGURA 6

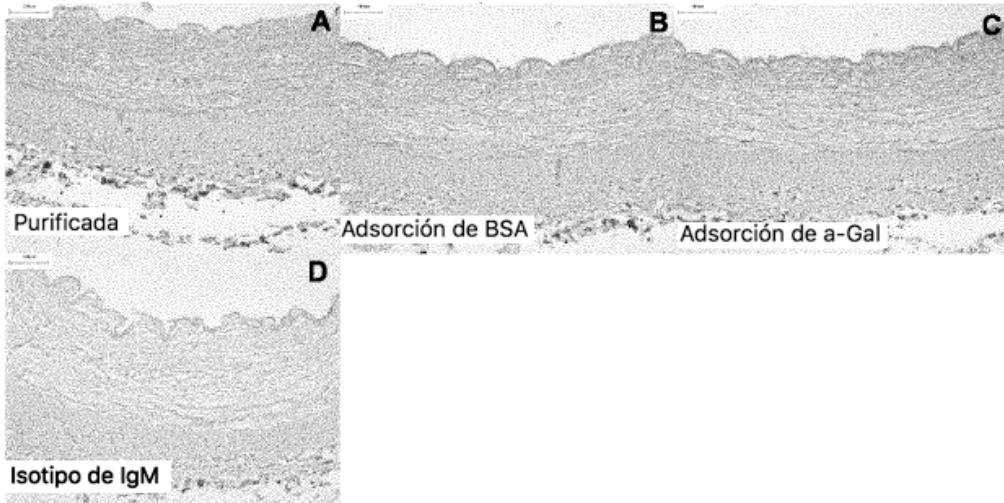


FIGURA 7

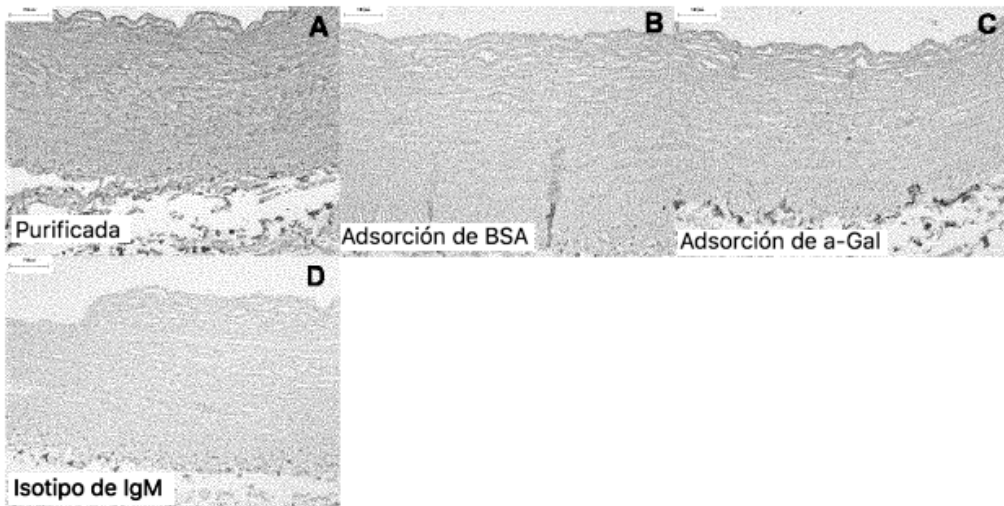


FIGURA 8

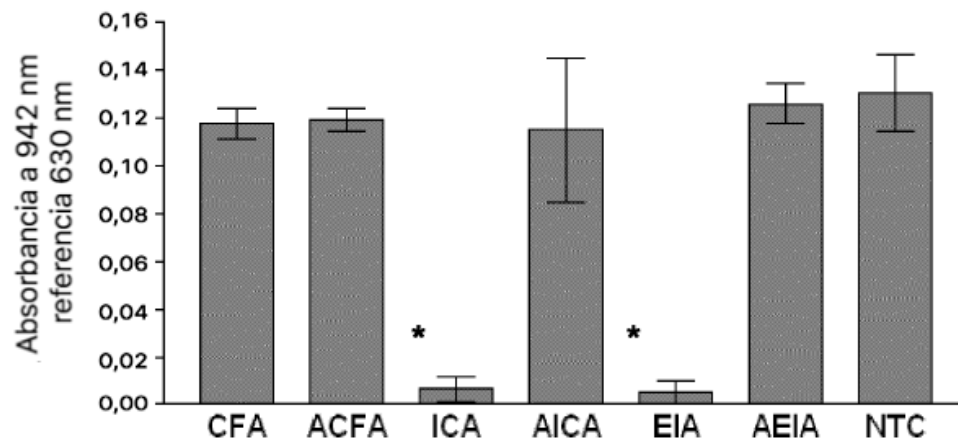


FIGURA 13

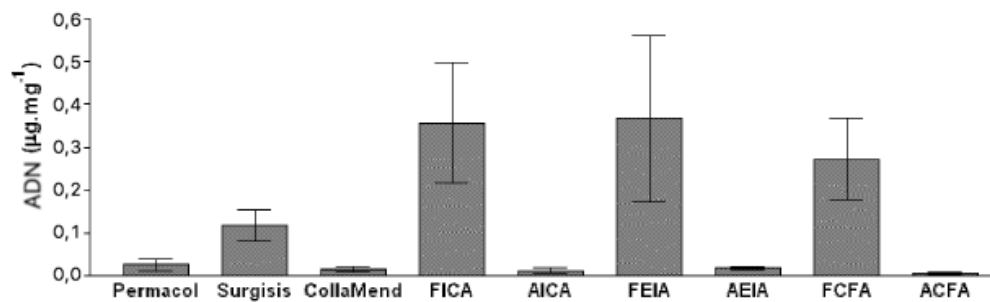


FIGURA 9A

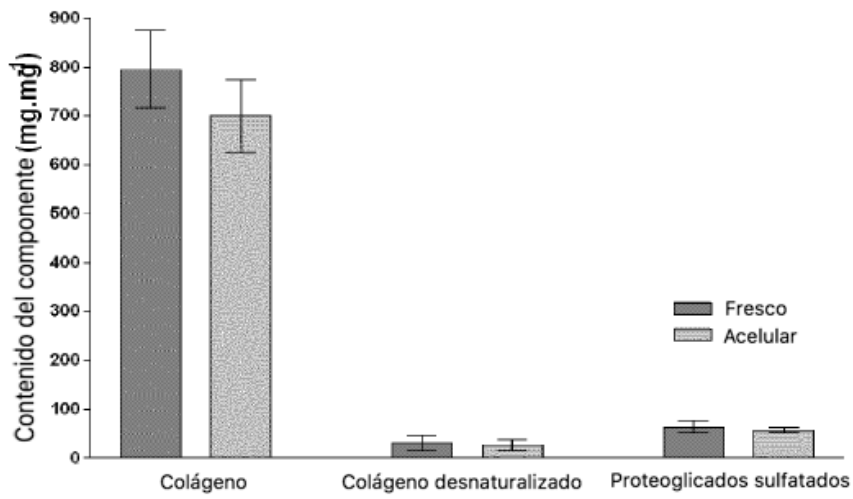


FIGURA 9B

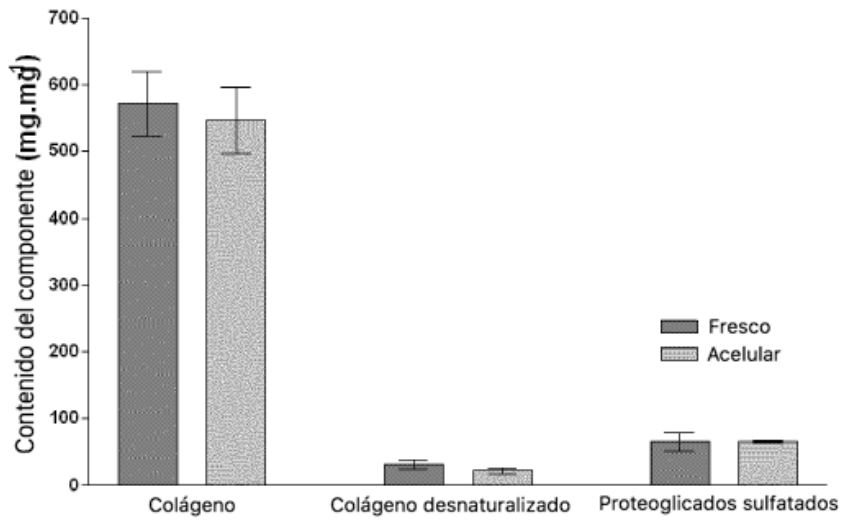


FIGURA 10

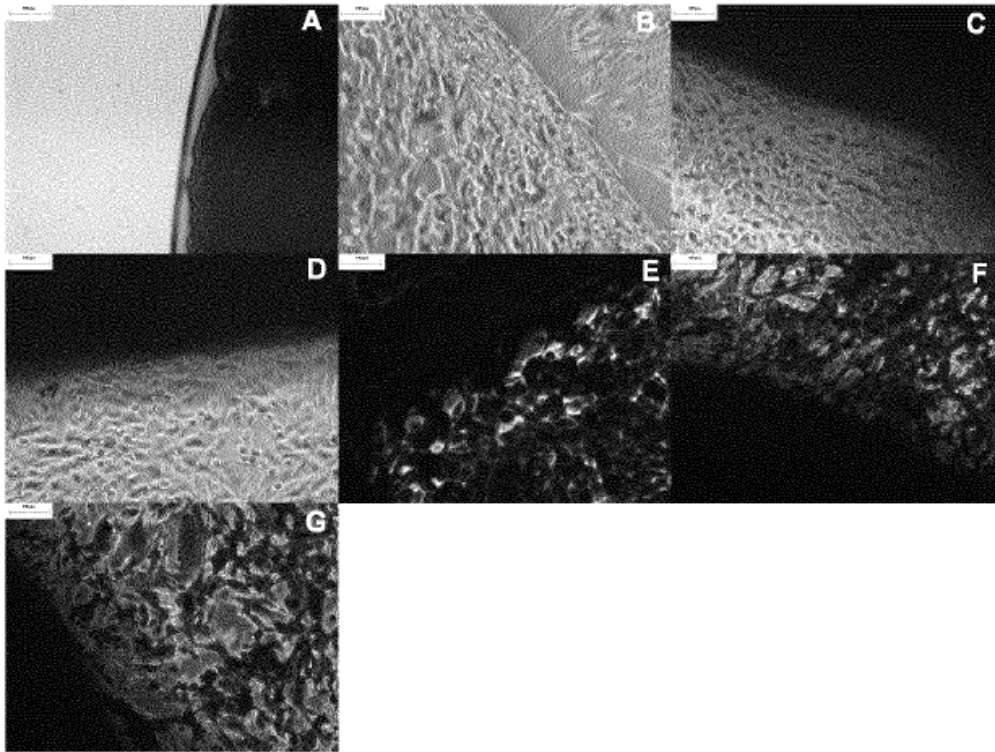


FIGURA 11

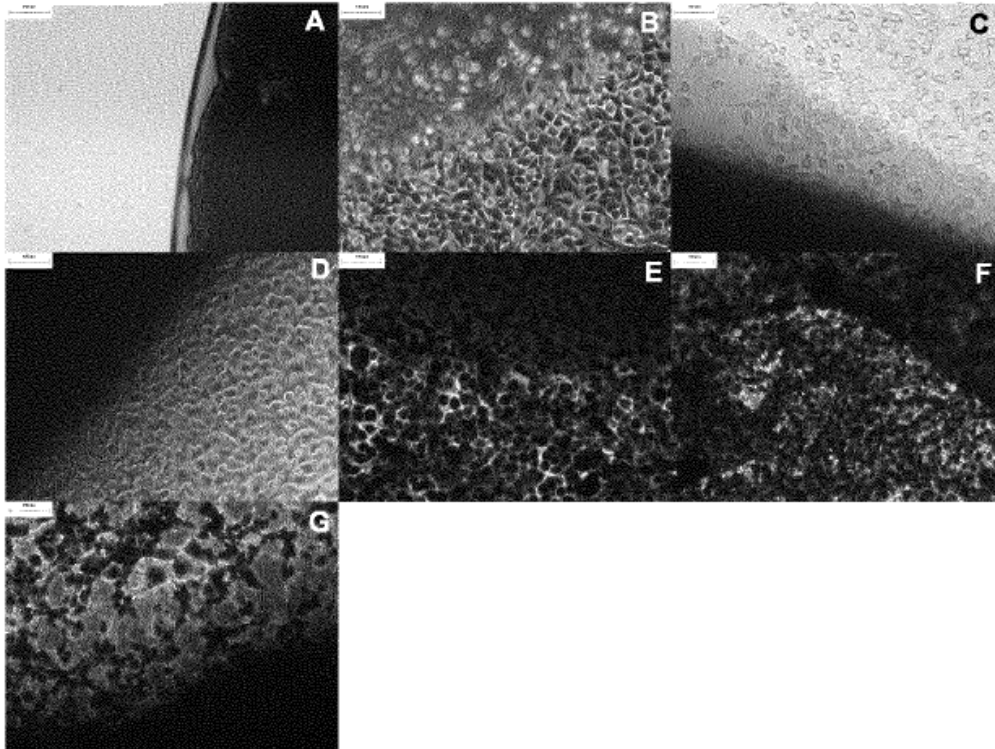


FIGURA 12A

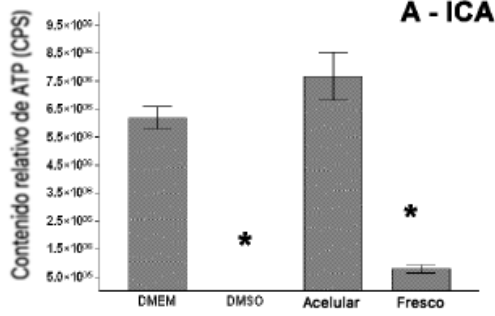


FIGURA 12B

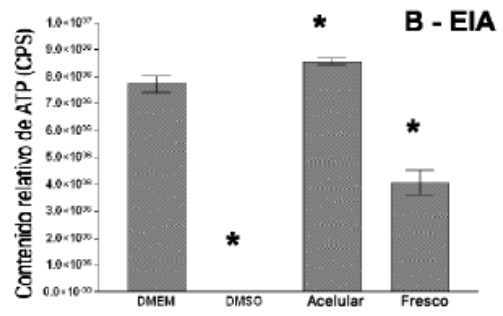


FIGURA 12C

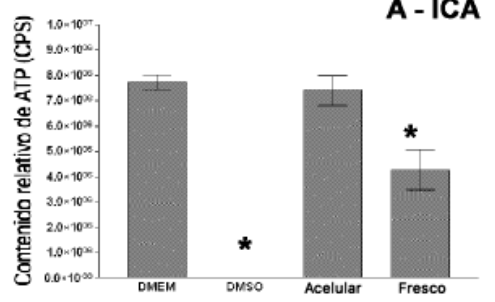


FIGURA 12D

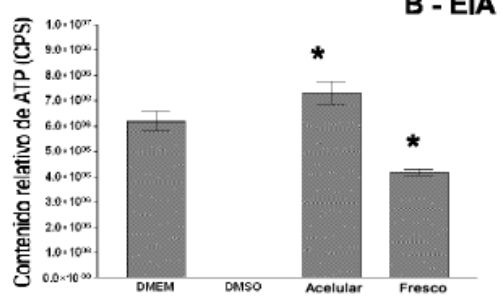


FIGURA 14

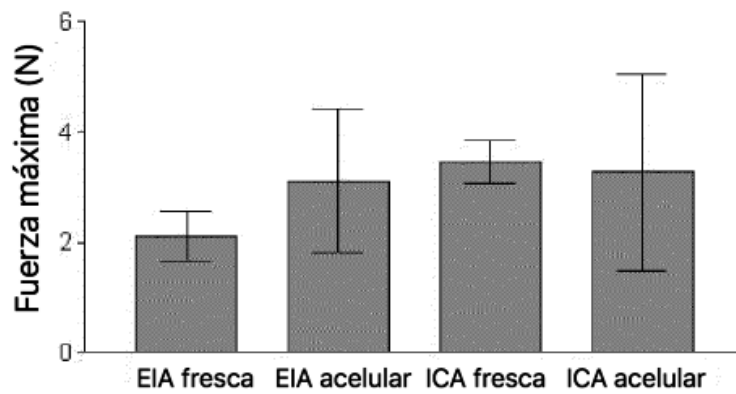


FIGURA 15

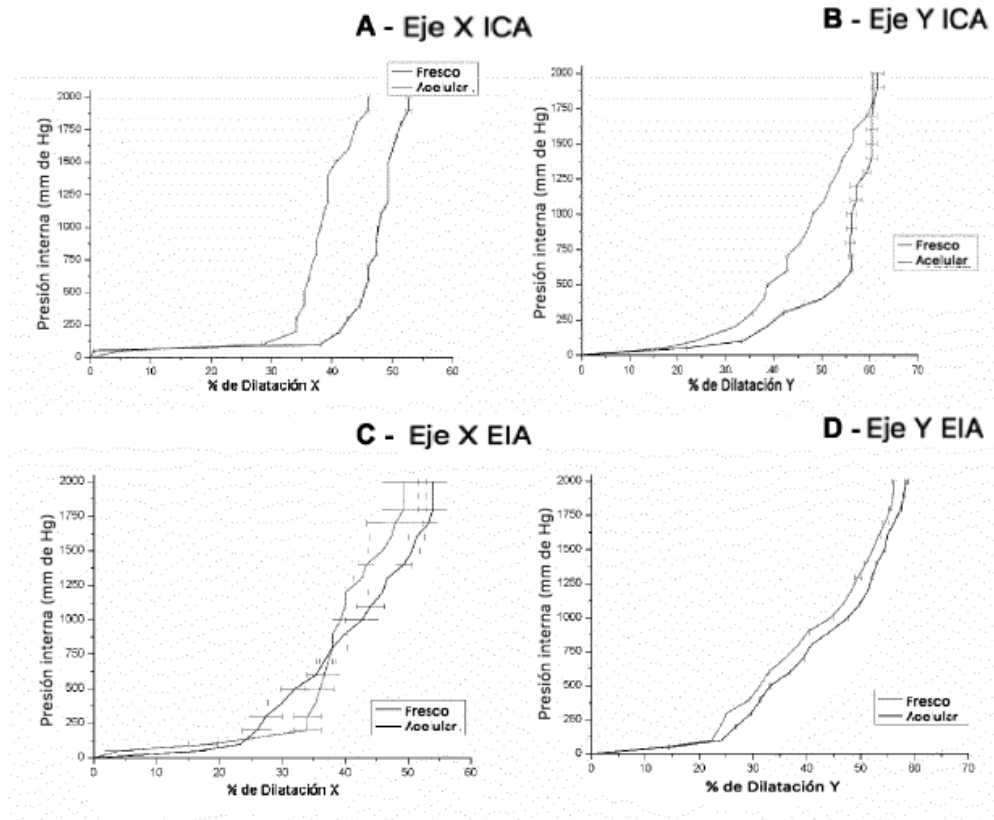


FIGURA 16

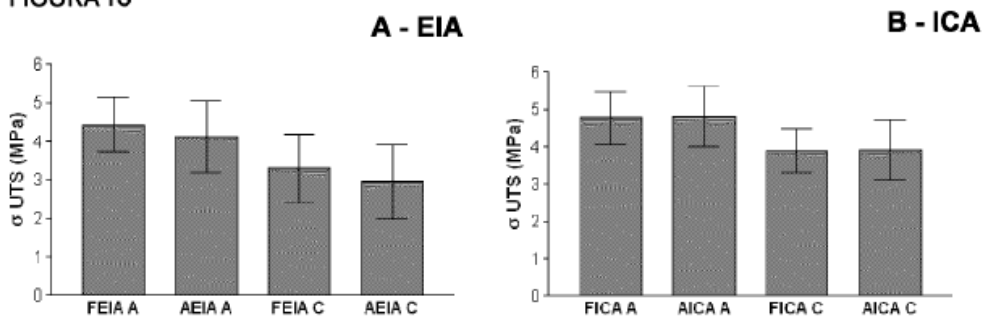


FIGURA 17A

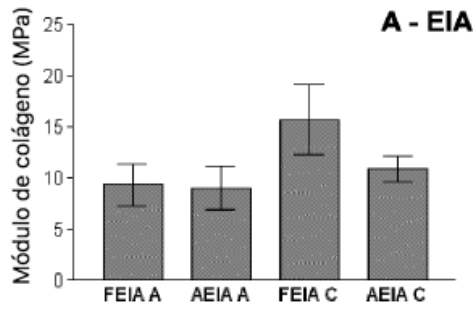


FIGURA 17B

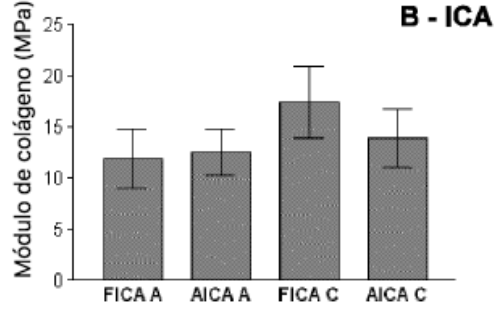


FIGURA 18A

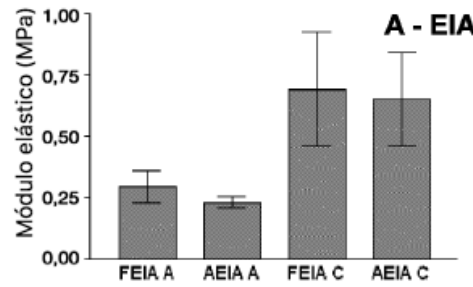


FIGURA 18B

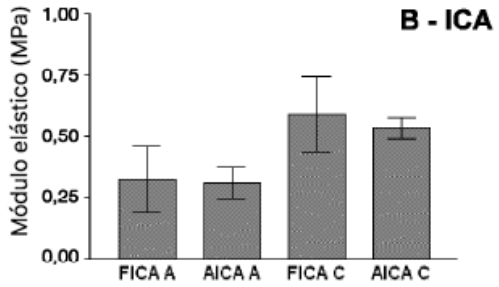


FIGURA 19

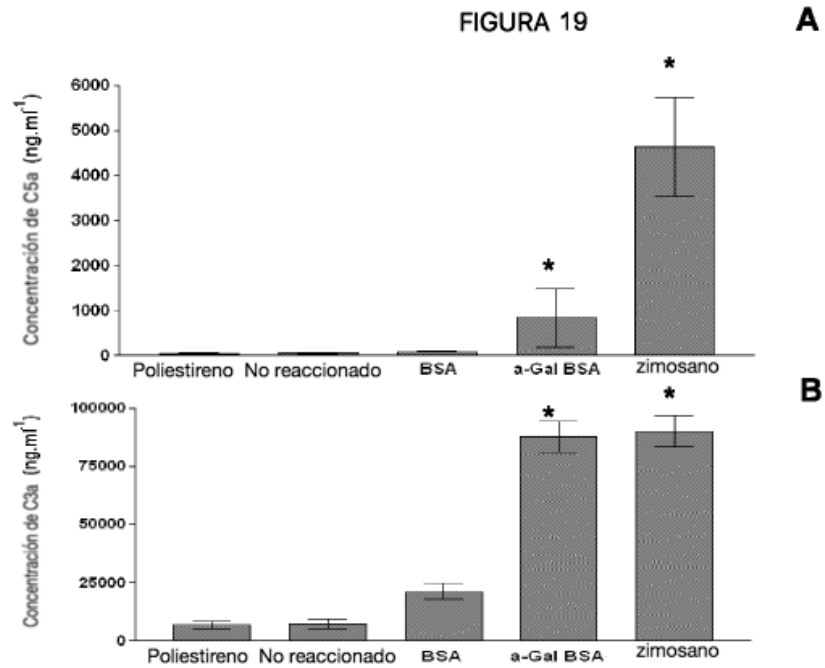


FIGURA 20

