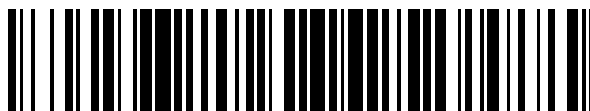


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 649 904**

51 Int. Cl.:

A61L 27/00 (2006.01)

A01N 1/02 (2006.01)

A61L 27/36 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.04.2013** **PCT/JP2013/059842**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.10.2013** **WO13147299**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.04.2013** **E 13768017 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.09.2017** **EP 2832376**

54 Título: **Procedimiento de tratamiento de tejido biológico y tejido biológico**

30 Prioridad:

31.03.2012 JP 2012083367

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

16.01.2018

73 Titular/es:

WASEDA UNIVERSITY (100.0%)
104, Totsukamachi 1-chome Shinjuku-ku
Tokyo 169-8050, JP

72 Inventor/es:

IWASAKI, KIYOTAKA y
UMEZU, MITSUO

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 649 904 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de tratamiento de tejido biológico y tejido biológico

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para tratar tejido biológico y al tejido biológico, y más específicamente a un procedimiento para tratar tejido biológico para suprimir la degeneración y la reducción de la resistencia del tejido debido a esterilización, y un tejido biológico obtenido por el procedimiento de tratamiento.

Antecedentes técnicos

10 Los presentes solicitantes ya han propuesto un procedimiento para descelularizar un tejido animal, tal como pericardio o tendón, recogido de un animal, tal como una vaca o un cerdo, para trasplantar el tejido animal en un organismo humano (véase el documento de patente 1 y similares). En esta ocasión, el tejido biológico recogido de un animal y descelularizado (a partir de ahora en el presente documento mencionado como "tejido descelularizado") no puede usarse inmediatamente después de la descelularización, sino que se esteriliza para su almacenamiento provisionalmente. Para poner dicho tejido descelularizado de origen animal en uso práctico, es esencial el tratamiento para esterilizar el tejido descelularizado. El documento de patente 2 describe un procedimiento para procesar tejidos basados en colágeno.

Lista de citas

Documentos de patente

Documento de patente 1: Publicación internacional n.º WO 2011/142407

Documento de patente 2: Solicitud europea n.º EP 0 564 786

Sumario de la invención**Problema técnico**

25 Sin embargo, la aplicación de esterilización a un tejido que consiste en componentes biológicos (a partir de ahora en el presente documento mencionado como "tejido biológico") y similares da lugar a daño significativo del tejido biológico y reduce la resistencia del tejido en comparación con antes del tratamiento. Como resultado de los trabajos experimentales intensivos, los presentes inventores han descubierto que la liofilización y la esterilización de tejido biológico seguido por rehidratación causa degeneración tisular en que el tejido tiene un contenido de humedad inferior y queda más duro que el tejido biológico antes del tratamiento. Por consiguiente, los presentes inventores han impregnado tejido biológico con una solución de trehalosa antes de la esterilización del tejido biológico. Como resultado, se ha descubierto que la impregnación puede suprimir la reducción de la resistencia y la degeneración tisular en tejido biológico esterilizado.

La presente invención se ha elaborado basándose en estos hallazgos, y un objetivo de la misma es proporcionar un procedimiento para tratar tejido biológico que pueda suprimir la reducción de la resistencia y la degeneración tisular en el tejido esterilizado que comprende componentes biológicos y similares, y un tejido biológico obtenido por el procedimiento de tratamiento.

Solución al problema

35 En la presente invención, un tejido que consiste en pericardio bovino o tendón bovino (a partir de ahora en el presente documento mencionado como "tejido biológico") se sumerge en una solución de trehalosa y se agita durante aproximadamente 24 horas para impregnar el tejido biológico con la solución de trehalosa. La solución de trehalosa usada en esta ocasión es una obtenida disolviendo trehalosa en una solución salina tamponada con fosfato, estando la concentración de trehalosa en el intervalo de un 20 % en peso a un 35 % en peso.

Después de ello, el tejido biológico se seca para eliminar la humedad en el tejido biológico. El secado en esta ocasión no está particularmente limitado; sin embargo, se realiza a una temperatura de aproximadamente -45 °C durante aproximadamente 24 horas.

45 Entonces, el tejido se esteriliza con gas de óxido de etileno. Las condiciones de la esterilización en esta ocasión no están particularmente limitadas, y se establecen a una temperatura de aproximadamente 30 °C para suprimir la degeneración del colágeno, un tiempo de exposición de aproximadamente 12 horas y una aireación de aproximadamente 20 horas. También es posible adoptar otros procedimientos de esterilización, tales como esterilización con plasma de baja temperatura de peróxido de hidrógeno. En la presente divulgación, puede usarse otro oligosacárido de disacárido, tal como sacarosa, lactosa o maltosa en el lugar de la trehalosa. En otras palabras, 50 pueden adoptarse diversas realizaciones siempre que el secado y la esterilización se realicen después de la impregnación del tejido biológico con una solución de oligosacárido de un disacárido como se describe anteriormente.

Efecto ventajoso de la invención

De acuerdo con la presente invención, la degeneración tisular y la reducción de la resistencia pueden suprimirse en tejidos biológicos esterilizados.

- 5 Además, cuando la concentración de trehalosa en la solución de trehalosa puede establecerse de un 20 % en peso hasta un 35 % en peso, la estructura tisular y la resistencia en el tejido biológico antes del tratamiento pueden mantenerse a casi el mismo grado.

Descripción de las realizaciones

(Ejemplo 1)

- 10 En primer lugar, se preparó un pericardio bovino recogido en forma de lámina rectangular de 5 cm por 7 cm de aproximadamente 300 µm de grosor y 1,5 g de masa y se lavó con una solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contiene un antibiótico.

Entonces, el pericardio bovino lavado se sometió a descclularización por un procedimiento ya propuesto por los presentes inventores (véase la patente japonesa abierta a inspección pública n.º 2011-05043).

- 15 A continuación, se proporcionaron 40 ml de una solución de trehalosa obtenida añadiendo trehalosa a PBS, y el pericardio bovino después de la descclularización (tejido descclularizado) se colocó junto con la solución de trehalosa en un tubo de centrifuga de 50 ml, el tubo se agita con el pericardio bovino impregnado con la solución de trehalosa. En este ejemplo, la concentración de trehalosa en la solución de trehalosa se estableció a un 1 % en peso. El tratamiento de agitación se realizó a una revolución de 180 rpm durante 24 horas usando un bioagitador calentado a 37 °C.

- 20 Después de ello, usando un liofilizador, el pericardio bovino se dejó reposar a aproximadamente -45 °C durante aproximadamente 24 horas para eliminar la humedad del pericardio bovino.

Entonces, en un esterilizador de gas de óxido de etileno, el pericardio bovino se esterilizó con gas de óxido de etileno para proporcionar un tejido secado esterilizado del pericardio bovino. En esta ocasión, la temperatura de exposición se estableció a 30 °C; el tiempo de exposición, a 12 horas; y la aireación, a 20 horas.

- 25 **(Ejemplos 2 a 9)**

- Se obtuvo un tejido secado esterilizado de pericardio bovino como en el ejemplo 1 excepto en que se cambió la concentración de trehalosa en una solución de la misma. Específicamente, el pericardio bovino descclularizado como se describe anteriormente se colocó en una solución de trehalosa cuya concentración de trehalosa se estableció a cada uno de 5, 10, 20, 25, 30, 35, 40 y 50 % en peso, se sometió al tratamiento de agitación descrito anteriormente y después se secó y se esterilizó como se describe anteriormente para proporcionar un tejido secado esterilizado del pericardio bovino de acuerdo con cada uno de los ejemplos 2 a 9.

Además, la concentración máxima de trehalosa se estableció a un 50 % porque la concentración de trehalosa disuelta en PBS a 37 °C era de aproximadamente un 50 %.

(Ejemplos 10 a 18)

- 35 Se obtuvo un tejido secado esterilizado de pericardio bovino en las mismas condiciones que en los ejemplos 1 a 9 excepto en que no se realizó la descclularización.

(Ejemplos 19 a 36)

Se obtuvo un tejido secado esterilizado de tendón bovino en las mismas condiciones que en los ejemplos 1 a 18 excepto en que se cambió un tejido a tratar de pericardio bovino a tendón bovino.

- 40 En esta ocasión, el tendón bovino usado era del orden de 10 cm de longitud y 10 mm de grosor.

(Ejemplo comparativo 1)

Se obtuvo un tejido secado esterilizado de pericardio bovino siguiendo un procedimiento diferente al del ejemplo 1, donde el pericardio bovino descclularizado no se impregnó con una solución de trehalosa, pero se secó y se esterilizó como se describe anteriormente.

- 45 **(Ejemplo comparativo 2)**

Se obtuvo un tejido secado esterilizado de pericardio bovino en las mismas condiciones que en el ejemplo comparativo 1 sin la impregnación con una solución de trehalosa, excepto que no se realizó la descclularización.

(Ejemplos comparativos 3 y 4)

Se obtiene un tejido secado esterilizado de tendón bovino en las mismas condiciones que en los ejemplos comparativos 1 y 2 sin la impregnación con una solución de trehalosa, excepto que se cambió un tejido a tratar de pericardio bovino a tendón bovino como en el ejemplo 19 y otros.

5 Entonces, se realizaron experimentos para demostrar el efecto de la presente invención.

Como un primer experimento, se realizó un experimento para demostrar el efecto de la supresión de la degeneración tisular de acuerdo con la presente invención usando el tejido secado esterilizado obtenido en cada uno de los ejemplos y de los ejemplos comparativos anteriores.

10 Específicamente, se añaden 40 ml de PBS que contiene antibiótico a un tubo de centrifuga de 50 ml, en que se coloca cada tejido secado esterilizado. Después, se agita a una revolución de 180 rpm durante 24 horas usando un bioagitador calentado a 37 °C, y se mide la masa del tejido secado esterilizado de ese modo rehidratado usando una balanza electrónica. Entonces, se calculó la tasa de aumento en la masa del tejido secado esterilizado de cada ejemplo respecto a la del tejido secado esterilizado del ejemplo comparativo correspondiente sin impregnación con una solución de trehalosa. El ejemplo comparativo correspondiente es el ejemplo comparativo 1 para los ejemplos 1 a 9; el ejemplo comparativo correspondiente es el ejemplo comparativo 2 para los ejemplos 10 a 18; el ejemplo comparativo correspondiente es el ejemplo comparativo 3 para los ejemplos 19 a 27; y el ejemplo comparativo correspondiente es el ejemplo comparativo 4 para los ejemplos 28 a 36.

20 Un segundo experimento, un ensayo de tensión para demostrar el efecto de la supresión de la reducción de la resistencia del tejido de acuerdo con la presente invención se realizó usando el tejido secado esterilizado obtenido en cada uno de los ejemplos y ejemplos comparativos anteriores.

El experimento se realizó en las siguientes condiciones para cada uno de los ejemplos 1 a 18 y los ejemplos comparativos 1 y 2 en que se usó un pericardio bovino como tejido a tratar.

25 Después de rehidratar cada tejido secado esterilizado del pericardio bovino en las mismas condiciones que las del primer experimento, se preparó una tira de muestra de 3 mm de anchura y se realizó un ensayo de tensión estableciendo la distancia inicial del mandril a 7 mm. El ensayo de tensión se realizó en las condiciones de una carga de tensión inicial de 0,5 N, una elongación de la muestra de un 20 %, una velocidad de tracción de 120 mm/min y un número de ciclos de 3000. Entonces, para cada muestra, se determinó la tasa de relajación de la tensión a lo largo del tiempo que se calculó restando la carga después de 3000 ciclos desde la carga inicial y dividiendo el resultado por la carga inicial, y se calculó la tasa de aumento a partir de la tasa de relación de la tensión para el tejido secado esterilizado de cada uno de los ejemplos comparativos correspondientes. La tasa de relación de la tensión en esta ocasión es una medida de una característica viscoelástica (flexibilidad) y una tasa de relajación de la tensión mayor significa mayor flexibilidad. Se ha descubierto que la esterilización del tejido biológico disminuye la tasa de relajación de la tensión en comparación con antes del tratamiento.

35 Para cada uno de los ejemplos 19 a 36 y los ejemplos comparativos 3 y 4 en que se usó un tendón bovino como tejido a tratar, el experimento se realizó en las siguientes condiciones.

40 Cada muestra en la forma descrita anteriormente se rehidrató en las mismas condiciones que las del primer experimento, seguido por realización de un ensayo de tensión estableciendo la anchura de la muestra a 4 mm y la distancia inicial del mandril a 45 mm. El ensayo de tensión se realizó en las condiciones de una carga de tensión inicial de 66,7 N durante 15 minutos y después los 10 000 ciclos de una carga de tensión de 100 N a una velocidad de tracción de 300 mm/min. Entonces, para cada muestra, se determinó el punto en que el porcentaje de aumento en la deformación por cada 100 ciclos llega a ser de menos de un 0,15 %, y se eliminó la influencia de la estructura de restricción de colágeno o similar que constituye el tejido lo máximo posible restando un valor de deformación en un punto donde el porcentaje de aumento en la deformación por cada 100 ciclos alcanzaba menos de un 0,15 % desde un valor de deformación hasta 10 000 ciclos para calcular la tasa de cambio en la deformación de la propia estructura tisular. La tasa de cambio en la deformación en esta ocasión es, asimismo, una medida de una característica viscoelástica. Después, para cada muestra, se calculó la tasa de aumento en la tasa de cambio en la deformación respecto a la del tejido secado esterilizado del correspondiente ejemplo comparativo.

Los resultados de los experimentos se muestran en las siguientes tablas. Los ejemplos 4-7, 13-16, 22-25 y 31-34 son de acuerdo con la invención; los otros ejemplos no.

50

[Tabla 1]

	Tejido	Descelularización	Concentración de trehalosa (%)	Tasa de aumento de masa (%)	Tasa de aumento en la tasa de relajación de la tensión (%)
Ejemplo 1	Pericardio bovino	SÍ	1	5	11
Ejemplo 2	Pericardio bovino	SÍ	5	5	11
Ejemplo 3	Pericardio bovino	SÍ	10	5	21
Ejemplo 4	Pericardio bovino	SÍ	20	8	34
Ejemplo 5	Pericardio bovino	SÍ	25	13	52
Ejemplo 6	Pericardio bovino	SÍ	30	16	95
Ejemplo 7	Pericardio bovino	SÍ	35	12	34
Ejemplo 8	Pericardio bovino	SÍ	40	12	33
Ejemplo 9	Pericardio bovino	SÍ	50	9	30
Ejemplo comparativo 1	Pericardio bovino	SÍ	0	0	0

[Tabla 2]

	Tejido	Descelularización	Concentración de trehalosa (%)	Tasa de aumento de masa (%)	Tasa de aumento en la tasa de relajación de la tensión (%)
Ejemplo 10	Pericardio bovino	NO	1	3	8
Ejemplo 11	Pericardio bovino	NO	5	5	16
Ejemplo 12	Pericardio bovino	NO	10	16	17
Ejemplo 13	Pericardio bovino	NO	20	21	23
Ejemplo 14	Pericardio bovino	NO	25	51	25
Ejemplo 15	Pericardio bovino	NO	30	57	60
Ejemplo 16	Pericardio bovino	NO	35	50	43
Ejemplo 17	Pericardio bovino	NO	40	27	37
Ejemplo 18	Pericardio bovino	NO	50	19	42
Ejemplo comparativo 2	Pericardio bovino	NO	0	0	0

[Tabla 3]

	Tejido	Descelularización	Concentración de trehalosa (%)	Tasa de aumento de masa (%)	Tasa de aumento en la tasa de cambio de la deformación (%)
Ejemplo 19	Tendón bovino	SÍ	1	1	1
Ejemplo 20	Tendón bovino	SÍ	5	4	3
Ejemplo 21	Tendón bovino	SÍ	10	5	3

(continuación)

	Tejido	Descelularización	Concentración de trehalosa (%)	Tasa de aumento de masa (%)	Tasa de aumento en la tasa de cambio de la deformación (%)
Ejemplo 22	Tendón bovino	SÍ	20	5	14
Ejemplo 23	Tendón bovino	SÍ	25	6	32
Ejemplo 24	Tendón bovino	SÍ	30	4	18
Ejemplo 25	Tendón bovino	SÍ	35	1	14
Ejemplo 26	Tendón bovino	SÍ	40	1	9
Ejemplo 27	Tendón bovino	SÍ	50	1	6
Ejemplo comparativo 3	Tendón bovino	SÍ	0	0	0

[Tabla 4]

	Tejido	Descelularización	Concentración de trehalosa (%)	Tasa de aumento de masa (%)	Tasa de aumento en la tasa de cambio de la deformación (%)
Ejemplo 28	Tendón bovino	NO	1	9	11
Ejemplo 29	Tendón bovino	NO	5	14	7
Ejemplo 30	Tendón bovino	NO	10	17	9
Ejemplo 31	Tendón bovino	NO	20	18	52
Ejemplo 32	Tendón bovino	NO	25	18	54
Ejemplo 33	Tendón bovino	NO	30	18	57
Ejemplo 34	Tendón bovino	NO	35	15	23
Ejemplo 35	Tendón bovino	NO	40	10	18
Ejemplo 36	Tendón bovino	NO	50	5	10
Ejemplo comparativo 4	Tendón bovino	NO	0	0	0

- 5 El tejido biológico tratado por el procedimiento convencional (a partir de ahora en el presente documento mencionado como "tejido tratado convencional") tiene una masa disminuida en comparación con la del tejido no tratado; sin embargo, de acuerdo con los resultados experimentales anteriores, se posibilitó que el tejido biológico sometido al tratamiento de la presente invención (a partir de ahora en el presente documento mencionado como "el
- 10 tejido tratado de la presente invención") tuviera una masa aumentada en comparación con la del tejido tratado convencional. Además, la concentración de trehalosa puede establecerse dentro del intervalo de un 20 % en peso a un 35 % en peso para proporcionar un pico de la masa más elevada entre los tejidos tratados de la presente invención, que posibilita que la masa del tejido resultante se genere a casi el mismo nivel que la masa del tejido no tratado. Como resultado, puede estimarse que la presente invención tiene el efecto de suprimir el fenómeno de destrucción de la estructura fina del tejido antes del tratamiento y se demostró que suprime la degeneración del
- 15 tejido biológico después del tratamiento en comparación con el procedimiento convencional.

El tejido tratado convencional tiene resistencia reducida en comparación con la del tejido no tratado debido a la flexibilidad reducida; sin embargo, de acuerdo con los resultados experimentales anteriores, se posibilitó que el tejido tratado de la presente invención tuviera flexibilidad y resistencia aumentada en comparación con las del tejido tratado convencional. Además, la concentración de trehalosa puede establecerse dentro del intervalo de un 20 % en

20 peso a un 35 % en peso para proporcionar un pico de la flexibilidad más elevada entre los tejidos tratados de la presente invención, lo que posibilita que su flexibilidad se genere a casi el mismo nivel que la flexibilidad del tejido no

tratado. Como resultado, se demostró que la presente invención suprime la reducción de la resistencia del tejido biológico después del tratamiento a un grado mayor que el procedimiento convencional.

Además, de acuerdo con la presente invención, incluso cuando el tejido biológico estaba descelularizado, se demostró que la degeneración tisular o la reducción de la resistencia se suprimían en el tejido secado y esterilizado.

5 **Aplicabilidad industrial**

La presente divulgación puede usarse para el tratamiento para procesamiento industrial o para la conservación de un tejido recogido de un animal como un tejido para el trasplante en un organismo humano.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de tratamiento de tejido biológico, que comprende las etapas de:

- a) impregnar dicho tejido biológico con una solución de trehalosa;
- b) secar dicho tejido biológico; y
- c) esterilizar dicho tejido biológico,

5

en el que dicha etapa de esterilización se realiza usando gas de óxido de etileno o plasma de baja temperatura de peróxido de hidrógeno,

en el que la concentración de dicha solución de trehalosa es de un 20 % en peso a un 35 % en peso, y

10

en el que el tejido biológico es pericardio bovino o tendón bovino.

2. Tejido biológico obtenido impregnando tejido biológico con una solución de trehalosa seguido de secado y esterilización con gas de óxido de etileno o plasma de baja temperatura de peróxido de hidrógeno, en el que la concentración de dicha solución de trehalosa es de un 20 % en peso a un 35 % en peso, y en el que el tejido biológico es pericardio bovino o tendón bovino.