

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 714 707**

51 Int. Cl.:

A61L 2/18 (2006.01)

A01N 1/02 (2006.01)

A61L 101/22 (2006.01)

A01P 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.05.2014 PCT/CN2014/078739**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.03.2015 WO15027728**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.05.2014 E 14839546 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.12.2018 EP 3025734**

54 Título: **Método para la desinfección y esterilización de material tisular animal**

30 Prioridad:

26.08.2013 CN 201310376627

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.05.2019

73 Titular/es:

**BEIJING RUIJIAN GAOKE BIOTECHNOLOGY CO., LTD. (100.0%)
Room No.102 and 202, Building No.15, Chaoqian Road No.A1, Science and Technology Park, Changping District Beijing 102200, CN**

72 Inventor/es:

**LIU, ZHIGANG y
LIU, XINHUA**

74 Agente/Representante:

DURAN-CORRETJER, S.L.P

ES 2 714 707 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método para la desinfección y esterilización de material tisular animal

5 Campo técnico

La presente solicitud se refiere a un método para desinfectar y esterilizar un material de un tejido animal.

Antecedentes de la técnica relacionada

10 Se ha usado una matriz descelularizada de un tejido y órgano para la restauración de tejido humano, diversos estudios de ingeniería tisular e investigaciones de medicina regenerativa. Hay una gran similitud y homología en las matrices extracelulares de tejidos y órganos de cuerpos humanos y muchos animales. Un material de matriz biológico fabricado descelularizando un tejido y órgano alogénico o xenogénico se ha usado satisfactoriamente para la reparación y la restauración de tejidos humanos en medicina clínica. Tras implantar una buena matriz de un tejido y órgano en el huésped, el material de andamiaje de matriz proporciona un soporte biomecánico inicial y regula el comportamiento celular (por ejemplo, adherencia, migración, proliferación y diferenciación) al interactuar con una célula huésped, y la matriz del propio tejido y órgano se convierte gradualmente en un nuevo tejido con crecimiento hacia el interior de las células huésped.

20 Tras la retirada de los componentes celulares originales de un tejido y órgano de un animal, la matriz del tejido y órgano que tiene una estructura de andamiaje tridimensional también puede recelularizarse y funcionalizarse incorporando células humanas *in vitro*, produciendo de ese modo finalmente un tejido y órgano que puede implantarse en el cuerpo humano.

25 Una matriz de un tejido y órgano es un andamio tridimensional compuesto por diversas proteínas estructurales y proteínas funcionales complejas, y comprende muchos otros complejos activos. Los componentes principales incluyen fibra colagenosa, glicoproteína, mucoproteína, y otros componentes incluyen sacáridos tales como glicosaminoglicano (ácido hialurónico, sulfato de condroitina), algunos lípidos y factores de crecimiento. Un procedimiento de procesamiento para fabricar la matriz del tejido y órgano es muy complejo, incluyendo procesos tales como recolección, conservación, lavado, desinfección, descelularización, reducción de antigenicidad, inactivación de virus y esterilización terminal del tejido y órgano. Entre estos procesos, el tratamiento de desinfección y esterilización del tejido animal provoca un gran daño en la matriz del tejido y órgano, que cambia de manera grave los constituyentes bioquímicos de la matriz del tejido y órgano, al tiempo que inactiva las bacterias y virus, perturbando de ese modo las ultraestructuras tridimensionales y alterando propiedades biomecánicas. Estos cambios influyen en la respuesta del huésped al material de matriz implantado, y posiblemente dan como resultado los desenlaces clínicos menos deseables del producto de la matriz de tejido, y haciendo así que sea difícil conseguir la reparación de tejido humano apropiada.

40 Los documentos US2004/057936 y US6482584 dan a conocer un método para desinfectar y esterilizar un material de un tejido animal usando una solución de remojo alcalina que comprende una solución de peróxido de hidrógeno.

45 El método para la desinfección, esterilización e inactivación de virus del material del tejido animal se usa a través de cada etapa de proceso del proceso de fabricación para el andamio de la matriz de tejido. Actualmente, los métodos aplicables se refieren principalmente a varios métodos tal como sigue. El primero es un método físico, que reduce el número de bacterias y hongos mediante enjuagado y dilución, y funciona en un entorno estéril para impedir una nueva infección; el segundo es añadir un inhibidor del crecimiento microbiano y un antibiótico en una solución de preparación; el tercero es incorporar una etapa de esterilización especial en el procedimiento de procesamiento de la preparación, para controlar el número de bacterias; y el cuarto es el tratamiento terminal de esterilización del producto. El método de esterilización en el procedimiento de procesamiento de la preparación es tratar con un oxidante químico (ácido peracético, hipoclorito de sodio, peróxido de hidrógeno o solución de yodo, o similar), alcohol, o ácido o base (ácido acético, ácido clorhídrico, hidróxido de sodio). Los resultados de prueba indican que estos métodos usados comúnmente para el tratamiento de desinfección y esterilización tienen diferentes grados de daño en la matriz de tejido. Una de las cuestiones que requieren un estudio adicional en el campo de la ciencia de la ingeniería tisular y la ciencia de los materiales biológicos es cómo desinfectar, esterilizar e inactivar virus más eficazmente, sin dañar la estructura básica original de la matriz de tejido extracelular, y cambiar los constituyentes bioquímicos principales y las propiedades biomecánicas.

60 Contenido de la invención

La presente solicitud se refiere a 1) un método para desinfectar y esterilizar un material de un tejido animal, que comprende las etapas de: (1) poner el material del tejido animal en una solución de remojo alcalina que contiene un peróxido de metal y un detergente, y agitar; (2) lavar con una solución de limpieza neutra para eliminar los componentes orgánicos liberados de microorganismos y células de tejido animal durante el remojo; (3) lavar con una solución de limpieza débilmente ácida que tiene un pH de 5,0 a 6,0; (4) crioconservar o liofilizar la matriz de tejido obtenida en una solución neutra; conteniendo la solución de remojo en la etapa (1) el 0,01-0,2% p/v del peróxido de

metal y el 0,05-1,0% p/v del detergente, y estando el pH de la solución de remojo entre 8,5-11,5, y 2) el uso de una solución de remojo para un tejido animal para desinfectar y esterilizar un material de un tejido animal, comprendiendo la solución el 0,01-0,2% p/v de un peróxido de metal y el 0,05-1,0% p/v de un detergente, y estando el pH de la solución entre 8,5-11,5, alternativamente entre 9,0-11,5.

En algunas realizaciones, la solución de remojo usada para el tejido animal en la etapa (1) contiene el 0,01~0,2% (p/v) del peróxido de metal y el 0,05~1,0% (p/v) del detergente, y el pH de la solución está entre 9,0~12,0. El peróxido de metal se selecciona de uno o más del grupo que consiste en peróxido de calcio, peróxido de magnesio, peróxido de sodio o peróxido de bario, y el detergente se selecciona de uno o más del grupo que consiste en Triton X-100, desoxicolato de sodio o dodecilsulfonato de sodio.

El peróxido de calcio, también denominado dióxido de calcio, se usa como desinfectante no tóxico para semillas y cereales en agricultura; se usa como aditivo en la fabricación de alimentos, cosméticos; y se usa como oxidante de alta temperatura o un productor de oxígeno en la fabricación de medicina. Por tanto, en una realización más preferible de la presente invención, el peróxido de metal es una baja concentración de o solución acuosa alcalina supersaturada de peróxido de calcio, cuyo contenido está generalmente entre el 0,01~0,2% (p/v) (que corresponde a 0,01~0,2 g de peróxido de calcio por 100 ml de solución, teniendo "p/v" a continuación en el presente documento el mismo significado). El contenido de peróxido de calcio en aplicaciones prácticas puede ajustarse dependiendo de la razón del volumen de la solución con respecto al material original del tejido y órgano del animal, tal como el 0,01%, el 0,02%, el 0,03% ..., hasta cualquier concentración de no más del 0,2% (p/v). Es más, además de peróxido de calcio, el peróxido de metal que puede usarse en los ejemplos de la presente invención también puede incluir, pero no limitarse a, peróxido de sodio, peróxido de magnesio, peróxido de bario y otros peróxidos de metal.

En el proceso de usar la solución acuosa de peróxido de calcio u otros peróxidos de metal en los ejemplos de la presente invención, un pH inicial de la solución de remojo se ajusta a un pH de entre 8,5~12,5, preferiblemente 9,0~12,0, más preferiblemente 9,5~11,5, con una solución de carbonato de sodio, bicarbonato de sodio, hidróxido de sodio, ácido acético, ácido clorhídrico. El contenido final de carbonato de sodio y bicarbonato de sodio está entre el 0,01~2,0% (p/v), y el contenido de hidróxido de sodio puede estar entre 1,0~100 mM. Preferiblemente, el contenido de carbonato de sodio y bicarbonato de sodio puede estar entre el 0,5~1,0% (p/v) y el contenido de hidróxido de sodio puede estar entre 5~10 mM. El contenido de cada componente en aplicaciones prácticas puede variarse dependiendo de la razón del volumen de la solución con respecto al material original del tejido y órgano del animal.

El peróxido de metal en los ejemplos de la presente invención se usa en combinación con una baja concentración de un detergente o un descontaminante que puede no provocar la desnaturalización de proteínas de matriz de tejido. Hay muchas clases de detergentes o descontaminantes adecuados para esta aplicación, incluyendo un tensioactivo iónico y un tensioactivo no iónico. Se usan comúnmente Triton X-100, desoxicolato de sodio, dodecilsulfonato de sodio, alfatato de sodio, ácido 3-[(3-colesterolaminopropil)dimetilamino]-1-propanosulfónico, ácido metacrílico de metil éter de poli(etilenglicol) y polietilenglicol. Preferiblemente, se usan uno o más de Triton X-100, desoxicolato de sodio y dodecilsulfonato de sodio. La concentración de Triton X-100 en la solución puede ser de entre el 0,05~1,0% (p/v), la concentración de desoxicolato de sodio puede ser de entre el 0,1~1,0% (p/v) y la concentración de dodecilsulfonato de sodio puede ser de entre el 0,05~1,0% (p/v).

En la solución de remojo usada en los ejemplos de la presente invención pueden usarse inhibidores de proteasa, tales como fluoruro de fenilmetilsulfonilo y/o N-etilmaleimida, según se requiera para impedir que la proteasa liberada tras la lisis celular dañe el material de la matriz de tejido.

En algunas realizaciones, cuando se somete a pretratamiento el material del tejido y órgano del animal en la etapa (1), el material del tejido puede remojarse en la solución de remojo a la temperatura de 5~42°C y entonces agitarse. El volumen de la solución usada es generalmente 1~10 veces mayor que el peso del material del tejido. El tiempo de pretratamiento es generalmente de entre 6~48 horas. Mientras tanto, puede ajustarse apropiadamente dependiendo de la temperatura de tratamiento, el tipo del material del tejido, el número de las bacterias presentes y la razón de volumen con respecto a peso.

El método para desinfección y esterilización de los ejemplos de la presente invención comprende además lavar completamente el material del tejido tras remojarse para desinfección y esterilización. En algunas realizaciones, la etapa (2) puede realizarse con una solución de limpieza neutra, que es agua pura, una solución salina normal o una solución de tampón biológica que se obtiene mediante filtración estéril, tal como 10 mM de ácido hidroxietilpiperazinetanosulfónico. El método específicos es lavar el material del tejido con agua pura, una solución salina normal o una solución de tampón biológica 2~5 veces, cada vez durante 1~3 horas.

En el método para desinfección y esterilización de los ejemplos de la presente invención, tras lavarse completamente con la solución de limpieza neutra, se requiere adicionalmente que el material del tejido se lave con una solución de limpieza ácida débil. La solución de limpieza ácida débil en la etapa (3) es una solución salina normal o una solución de tampón de 2~20 mM de ácido hidroxietilpiperazinetanosulfónico, que se obtiene ajustando

el pH a 5,0~6,0 con ácido acético, acetato de sodio o ácido clorhídrico y mediante filtración estéril. El método específico es lavar el material del tejido con la solución de limpieza ácida débil 2~5 veces, cada vez durante 1~3 horas.

5 La matriz de tejido lavada de los ejemplos de la presente invención se pone en una solución de conservación neutra para crioconservarse o liofilizarse. La solución neutra en la etapa (4) es una solución de tampón de 2~20 mM de ácido hidroxietilpiperazinetanosulfónico u otra solución de tampón biológica compatible, con un pH de entre 7,0~8,0.

10 Cuando se lleva a cabo el método de los ejemplos de la presente invención, tras eliminar la solución de remojo para el material del tejido, también puede añadirse un antibiótico adecuado en la solución de limpieza posterior, tal como una solución que contiene 100 mg de gentamicina por litro. El material del tejido puede conservarse temporalmente a 5~10°C en la solución a la que se añade un antibiótico.

15 Se da a conocer una solución de remojo para un tejido animal para desinfectar y esterilizar un material de un tejido animal, que contiene el 0,01~0,2% (p/v) de peróxido de metal y el 0,05~1,0% (p/v) de detergente, y el pH de la solución está preferiblemente entre 9,0~12,0, más preferiblemente entre 9,5~11,5. El peróxido de metal se selecciona de uno o más del grupo que consiste en peróxido de calcio, peróxido de magnesio, peróxido de sodio o peróxido de bario, y el detergente se selecciona de uno o más del grupo que consiste en Triton X-100, desoxicolato de sodio o dodecilsulfonato de sodio.

20 Se da a conocer una matriz de tejido animal fabricada mediante desinfección y esterilización de un material de un tejido animal según el método descrito anteriormente.

25 Con respecto a los problemas presentes en la desinfección, esterilización e inactivación de virus de una materia prima en diversas tecnologías de fabricación de la técnica anterior, los ejemplos de la presente invención proporcionan un método para desinfectar y esterilizar un material de un tejido animal y una solución de remojo correspondiente para un tejido animal, y se da a conocer una matriz de tejido animal obtenida mediante este método.

30 Usando este método y esta solución, puede reducirse el número de bacterias en el material del tejido animal fabricado en al menos 10^6 , sin dañar la estructura de andamiaje básica, los componentes bioquímicos principales y las propiedades biomecánicas del material de la matriz extracelular del tejido original del animal. Mientras tanto, una baja concentración de detergente que no puede provocar desnaturalización de proteínas se usa en combinación con los ejemplos de la presente invención, para facilitar la lisis y rotura de las células animales, y liberar componentes orgánicos intracelulares, pudiendo de ese modo eliminar algunos componentes de la célula animal del tejido durante los procesos de remojo y lavado. Además, el método para desinfección y esterilización de los ejemplos de la presente invención es seguro, ecológico y protege el medio ambiente, no está relacionado con el uso de sustancias químicas tóxicas y tampoco deja sustancias químicas residuales en el andamio de la matriz de tejido.

40 Breve descripción de los dibujos

Figura 1: Diagramas del efecto de desinfección y esterilización de piel porcina con una solución de peróxido de calcio al 0,1%;

45 Diagrama izquierdo: control;

Diagrama derecho: para el material tratado con una solución de peróxido de calcio durante 24 horas, no se observa ninguna bacteria mediante detección.

50 Figura 2: El termograma calorimétrico de barrido diferencial de la matriz dérmica porcina tratada con solución de peróxido de calcio al 0,1% (pH inicial, 11,6).

55 Figura 3: Imbibición del material dérmico de piel porcina en las soluciones con diferente pH (figura A) y termograma calorimétrico de barrido diferencial de la matriz de tejido tratada con las soluciones de diferente pH para desinfección y esterilización (figura B).

Figura 4: Histología de tinción con HE de secciones de tejido de matriz de tejido dérmico acelular porcino pretratada con una solución de pH alto (12,2) para desinfección y esterilización;

60 A: tejido dérmico porcino sin tratar;

B: el material de la matriz de tejido tras un tratamiento de desinfección y esterilización y descelerización.

65 Figura 5: El termograma calorimétrico de barrido diferencial de los andamios de matriz de tejido dañados mediante varios métodos para desinfección y esterilización.

Figura 6: Micrografías electrónicas de barrido de la estructura de la matriz de tejido cambiada mediante varios métodos para desinfección y esterilización.

A: una solución de tampón fosfato para control;

B: hidróxido de sodio 1 N (1 hora);

C: ácido peracético al 0,2% (2 horas);

D: peróxido de hidrógeno al 3,0% (2 horas).

Descripción detallada de realizaciones

La presente invención se ilustra a continuación adicionalmente en detalle a modo de ejemplos en el presente documento.

Ejemplo 1: Desinfección y esterilización de un material de un tejido animal y efecto sobre la descelularización del mismo

Se sacrificaron cuatro cerdos de 9 meses de edad y en primer lugar se depilaron. Se recogió una piel porcina nueva con un grosor de 1~2 mm (sin grasa subcutánea) de cada animal. Se cortó la dermis porcina en trozos pequeños con una longitud de 3 cm y una anchura de 3 cm, y se pusieron en una botella de plástico de 250 ml. Se prepararon cuatro botellas para cada lote de animales y se pusieron 20 g del material dérmico porcino en cada botella. Entre las 4 botellas anteriores, a cada una de dos botellas se les añadieron 125 ml de solución de tampón fosfato (pH inicial, 7,5) que sirve para control, a una de las otras dos botellas 125 ml de solución de peróxido de calcio al 0,1% (pH inicial, 11,6) y a otra de las otras dos botellas se le añadieron 125 ml de una solución (pH inicial, 11,6) de peróxido de calcio al 0,1% y Triton X-100 al 0,1%. Tras agitarse y remojar durante 1 hora, se usó una botella con solución de tampón fosfato para control para determinar el número inicial de bacterias viables. Después de que la solución de prueba se diluyera diferentes veces (10, 1000 y 100000 veces), se filtraron y se lavaron por separado 100 µL de muestras diluidas diferentes veces, los filtros se incubaron en agar nutriente/medio de caldo durante 24 horas (a 37°C), y entonces se contó el número de bacterias viables. Todas las botellas de prueba se lavaron en un agitador rotatorio (50 revoluciones por minuto) durante la noche durante 24 horas. El efecto de desinfección y esterilización de la materia prima del tejido se midió mediante la determinación del número de bacterias viables. Los resultados mostraron que el número inicial de bacterias viables en la botella era en promedio $10^{8.7}$ ($\pm 0,1$, N=4); en la solución de tampón fosfato para control, after 24 horas, el número de bacterias viables aumentó 245 veces, en promedio $10^{11.1}$ ($\pm 0,1$, N=4); y en la solución de peróxido de calcio no se detectó ninguna bacteria viable, véase la Figura 1 para detalles.

El tejido de piel porcina que se había pretratado con una solución de peróxido de calcio al 0,1% y Triton X-100 al 0,1% se trató adicionalmente mediante descelularización, para evaluar el efecto del pretratamiento de desinfección y esterilización sobre los procesos posteriores. Tras lavarse con una solución salina normal estéril (cloruro de sodio al 0,9%) dos veces, se añadió el tejido de piel porcina a 100 ml de desoxicolato de sodio al 0,5% (disuelto en una solución de tampón de ácido hidroxietilpiperazinetanosulfónico 5 mM, pH 8,0). Tras descelularizarse remojando durante 22 horas, se lavó el tejido de piel porcina con una solución salina normal estéril cinco veces, cada vez durante 2 horas. Se analizó el efecto del pretratamiento de desinfección y esterilización sobre la matriz de tejido usando un calorímetro de barrido diferencial. Se realizó al análisis en una solución de tampón fosfato (pH=7,5) usando un calorímetro de barrido diferencial y se aumentó la temperatura desde 2°C hasta 125°C a una tasa de aumento de temperatura de 2°C por minuto. La temperatura inicio de la desnaturalización de la matriz de tejido de piel porcina nueva sin tratar era $60,5 \pm 0,3$ °C, con un valor de entalpía de $65,2 \pm 1,4$ J/g (N=3). La temperatura de inicio de la desnaturalización de la matriz de tejido pretratada era $61,9 \pm 0,2$ °C, con un valor de entalpía de $62,3 \pm 1,1$ J/g (N=3). Los resultados de determinación indicaron que no se dañaba nada de matriz de tejido dérmico mediante el pretratamiento de desinfección y esterilización de los ejemplos de la presente invención, en comparación con la dermis porcina nueva, véase la Figura 2 para detalles.

Ejemplo 2: Desinfección y esterilización de un material de un tejido animal

Se sacrificó un cerdo de seis meses de edad, se trató mediante limpieza de superficie y se depiló. Se cortó piel porcina nueva y se raspó grasa subcutánea de la misma (2-3 mm de grosor). La materia prima recogida de la piel porcina se almacenó temporalmente en un entorno de 5-10°C. Se cortó la dermis porcina en trozos grandes con una longitud de aproximadamente 30 cm y una anchura de aproximadamente 30 cm, y se pusieron en una solución de carbonato de sodio al 2% + Triton X-100 al 0,2% (ajustándose el pH inicial a 12,0~12,2 con una solución concentrada saturada de peróxido de calcio), con cada 400 g de la materia prima de la piel porcina en 1 litro de la solución. Se lavó la muestra en un agitador rotatorio (90 revoluciones por minuto) durante la noche (16-24 horas). Tras eliminar la solución de remojo, se enjuagó con agua pura que contiene 100 mg de gentamicina por litro en un entorno aséptico, y entonces se lavó adicionalmente dos veces tras ajustar el pH a 5,0-6,0 con ácido clorhídrico 1 N.

Se lavó adicionalmente de nuevo dos veces tras ajustar el pH a 7,0-8,0 con ácido clorhídrico 1 N, completando de ese modo el pretratamiento de desinfección y esterilización de la materia prima del tejido.

5 **Ejemplo 3: Desinfección y esterilización de un material de un tejido animal y efecto sobre un tejido matriz del mismo**

Se sacrificó un cerdo de seis meses, se trató mediante limpieza de superficie y se depiló. Se cortó piel porcina nueva y se raspó grasa subcutánea de la misma. La materia prima recogida de la piel porcina se almacenó temporalmente en un entorno de 5-10°C. Se cortó la dermis porcina en trozos grandes con una longitud de aproximadamente 30 cm y una anchura de aproximadamente 30 cm, y se pusieron en una solución de carbonato de sodio al 0,5% + Triton X-100 al 0,1% (se ajustó el pH inicial a 11,0 con una solución saturada de peróxido de calcio), con cada 100 g de la materia prima de la piel porcina en 1 litro de la solución. Se lavó la muestra en un agitador rotatorio (60 revoluciones por minuto) durante la noche (16-24 horas). Tras eliminar la solución de remojo, se lavó con agua pura que contiene 100 mg de gentamicina por litro, y entonces se ajustó el pH a 7,0-8,0 con ácido acético 0,2 M, completando de ese modo el pretratamiento de desinfección y esterilización de la materia prima del tejido. Se analizó el efecto de pretratamiento sobre la matriz de tejido usando un calorímetro de barrido diferencial, se realizó el análisis en una solución de tampón fosfato (pH=7,5) usando un calorímetro de barrido diferencial y se aumentó la temperatura desde 2°C hasta 125°C a una tasa de aumento de temperatura de 2°C por minuto. La temperatura inicial de desnaturalización de la matriz de tejido de piel porcina nueva sin tratar era 60,5±0,3°C, con un valor de entalpía de 65,2±1,4 J/g (N=3). La temperatura inicial de desnaturalización de la matriz de tejido pretratada era 61,9±0,4°C, con un valor de entalpía de 66,7±1,5 J/g (N=3). Los resultados de determinación indicaron que no se dañaba nada de matriz de tejido dérmico mediante el pretratamiento de desinfección y esterilización de los ejemplos de la presente invención, en comparación con la dermis porcina nueva.

25 **Ejemplo 4: Un pH adecuado de una solución de remojo para desinfección y esterilización de un tejido animal – ejemplo comparativo**

La solución de desinfección y esterilización se haría reaccionar con la materia prima de la piel porcina. Tras añadir el material de piel porcina nueva, se redujo significativamente el pH. En este ejemplo se determinó un pH adecuado de solución de peróxido de calcio. En esta prueba, se puso la piel porcina nueva con un grosor de 1~2 mm en una solución de bicarbonato de sodio (1%) y peróxido de calcio (0,1%), cuyo pH se ajustó previamente a diferentes valores con hidróxido de sodio, y se evaluaron los cambios del tejido durante el pretratamiento a partir de la imbibición de la materia prima. Tras lavarse con una solución salina normal estéril (cloruro de sodio al 0,9%), se añadió adicionalmente el tejido de piel porcina pretratado en desoxicolato de sodio al 0,5% (disuelto en una solución de tampón de ácido hidroxietilpiperazinetasulfónico 5 mM, pH 8,0), se descelularizó remojando durante la noche. La matriz de tejido descelularizado se lavó con una solución salina normal estéril cinco veces, cada vez durante 2 horas. El análisis calorimétrico de barrido diferencial indicó que cuando el pH era mayor de 11,5, se aumentaba significativamente la imbibición de la piel porcina, la matriz de tejido se cambiaría de manera irreversible y la matriz de tejido parecía ser inestable, véase la Figura 3 para detalles. El estudio de la histología del tejido también mostró que cuando el pH era de más de 11,5, se dañaba la estructura de la matriz de tejido, véase la Figura 4 para detalles. Además, durante la aplicación práctica, que el pH de la solución provoque el cambio irreversible de la matriz de tejido o no puede depender adicionalmente de factores tales como el tiempo de tratamiento y la razón en volumen de la matriz de tejido con respecto a la solución.

45 **Ejemplo 5: Daño de un material de la matriz de tejido provocado por los métodos existentes para desinfección y esterilización – ejemplo comparativo**

Para comparar el daño del material de la matriz de tejido provocado por los métodos existentes para desinfección y esterilización, en la prueba de este ejemplo, se pusieron pieles porcinas nuevas con un grosor de aproximadamente 1 mm en varias clases de diferentes soluciones, incluyendo hipoclorito de sodio al 0,2% (2 horas), ácido peracético al 0,2% (2 horas), peróxido de hidrógeno al 3,0% (2 horas), solución de yodo al 7,5% (2 horas), hidróxido de sodio 1 N (1 hora) y solución de tampón fosfato para control (pH, 7,5). Tras tratarse en estas soluciones, los tejidos de piel porcina se lavaron completamente con una solución de tampón fosfato (5 veces, cada vez durante dos horas). Los resultados de análisis obtenidos mediante un calorímetro de barrido diferencial indicaron que estos métodos usados comúnmente para el tratamiento de desinfección y esterilización tenían diferentes grados de daño sobre la matriz de tejido, particularmente hidróxido de sodio, hipoclorito de sodio y solución de yodo, véase la Figura 5 para detalles. Algunos cambios de la estructura de la matriz de tejido pudieron observarse claramente en micrografías electrónicas de barrido, véase la Figura 6 para detalles. Sin embargo, a diferencia de estos métodos existentes para desinfección y esterilización, un óxido de metal hidratado o peróxido de metal usado en combinación con una baja concentración de un detergente a un pH adecuado (por ejemplo, 8,5~12,5, alternativamente, 10,0~11,5) en los ejemplos de la presente invención, no dañó la estructura de andamiaje básica, los componentes bioquímicos principales y las propiedades biomecánicas del material de la matriz extracelular del tejido original del animal.

REIVINDICACIONES

- 1.- Un método para desinfectar y esterilizar un material de un tejido animal, que comprende las etapas de:
- 5 (1) poner el material del tejido animal en una solución de remojo alcalina que contiene un peróxido de metal y un detergente, y agitar;
- (2) lavar el material del tejido animal obtenido en la etapa (1) con una solución de limpieza neutra para eliminar los componentes orgánicos liberados de microorganismos y células de tejido animal durante el remojo;
- 10 (3) lavar la matriz de tejido obtenida en la etapa (2) con una solución de limpieza débilmente ácida que tiene un pH de 5,0~6,0;
- (4) crioconservar o liofilizar la matriz de tejido obtenida en la etapa (3) en una solución neutra;
- 15 en el que la solución de remojo en la etapa (1) contiene el 0,01~0,2% p/v del peróxido de metal y el 0,05~1,0% p/v del detergente, y el pH de la solución de remojo está entre 8,5~11,5.
- 2.- El método según la reivindicación 1, en el que el pH de la solución de remojo en la etapa (1) está entre 9,5~11,5, el peróxido de metal es peróxido de calcio, peróxido de magnesio, peróxido de sodio o peróxido de bario, y el detergente es Triton X-100, desoxicolato de sodio o dodecilsulfonato de sodio.
- 20 3.- El método según la reivindicación 1, en el que la solución de remojo comprende además un inhibidor de proteasa que se selecciona de fluoruro de fenilmetilsulfonilo y N-etilmaleimida.
- 25 4.- El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el método específico en la etapa (1) es remojar cada kilogramo del material del tejido animal en 2~8 litros de la solución de remojo a la temperatura de 5~42°C durante 6~48 horas, y agitar durante el remojo.
- 30 5.- El método según la reivindicación 1, en el que la solución de limpieza neutra en la etapa (2) es agua pura, una solución salina normal o una solución de tampón biológica que se obtiene mediante filtración estéril.
- 6.- El método según la reivindicación 1 o 5, en el que el material del tejido animal en la etapa (2) se lava con la solución de limpieza neutra 2~5 veces, cada vez durante 1~3 horas.
- 35 7.- El método según la reivindicación 1, en el que la solución de limpieza débilmente ácida en la etapa (3) es una solución salina normal o una solución de tampón de 2~20 mM de ácido hidroxietilpiperazinetanosulfónico, que se obtiene ajustando el pH a 5,0~6,0 con ácido acético, acetato de sodio o ácido clorhídrico y mediante filtración estéril.
- 40 8.- El método según la reivindicación 1 o 7, en el que la matriz de tejido en la etapa (3) se lava con la solución de limpieza débilmente ácida 2~5 veces, cada vez durante 1~3 horas.
- 9.- El método según la reivindicación 1, en el que la solución neutra en la etapa (4) es una solución de tampón de 2~20 mM de ácido hidroxietilpiperazinetanosulfónico con un pH de entre 7,0~8,0.
- 45 10.- Uso de una solución de remojo que comprende el 0,01~0,2% p/v de un peróxido de metal y el 0,05~1,0% p/v de un detergente, y el pH de la solución está entre 8,5~11,5, alternativamente entre 9,0~11,5 para desinfectar y esterilizar un material de un tejido animal.
- 50 11.- El uso según la reivindicación 10, en el que el peróxido de metal es peróxido de calcio, peróxido de magnesio, peróxido de sodio o peróxido de bario, el detergente es Triton X-100, desoxicolato de sodio o dodecilsulfonato de sodio, y el pH de la solución está entre 9,5~11,5.
- 55 12.- El uso según la reivindicación 11, en el que el peróxido de metal es peróxido de calcio.

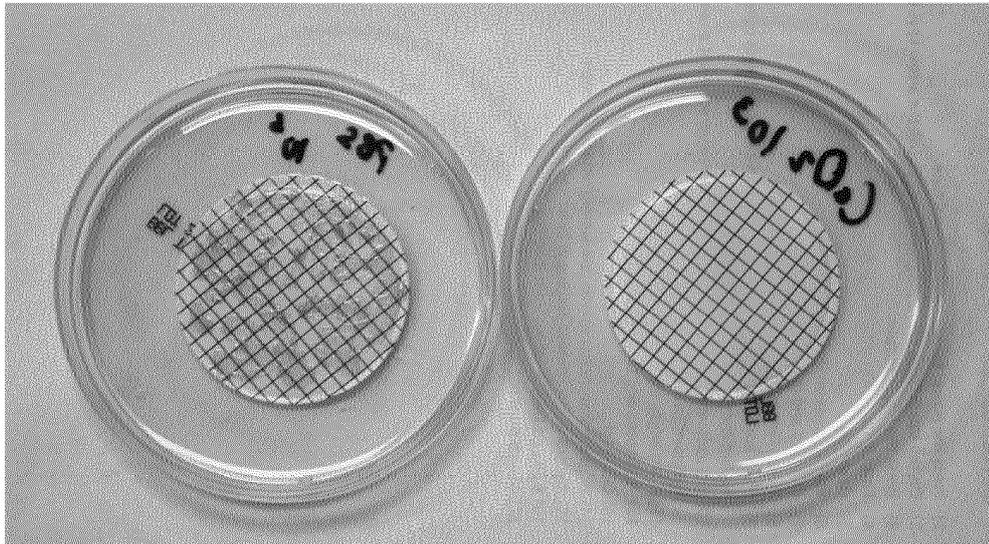


FIG. 1

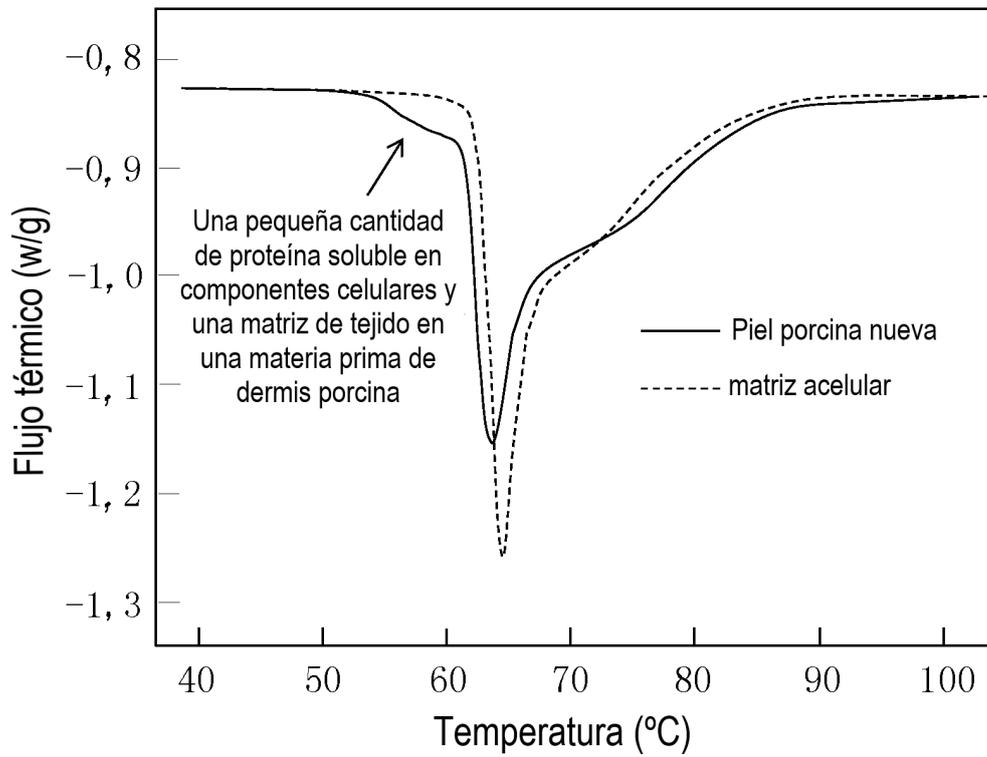


FIG. 2

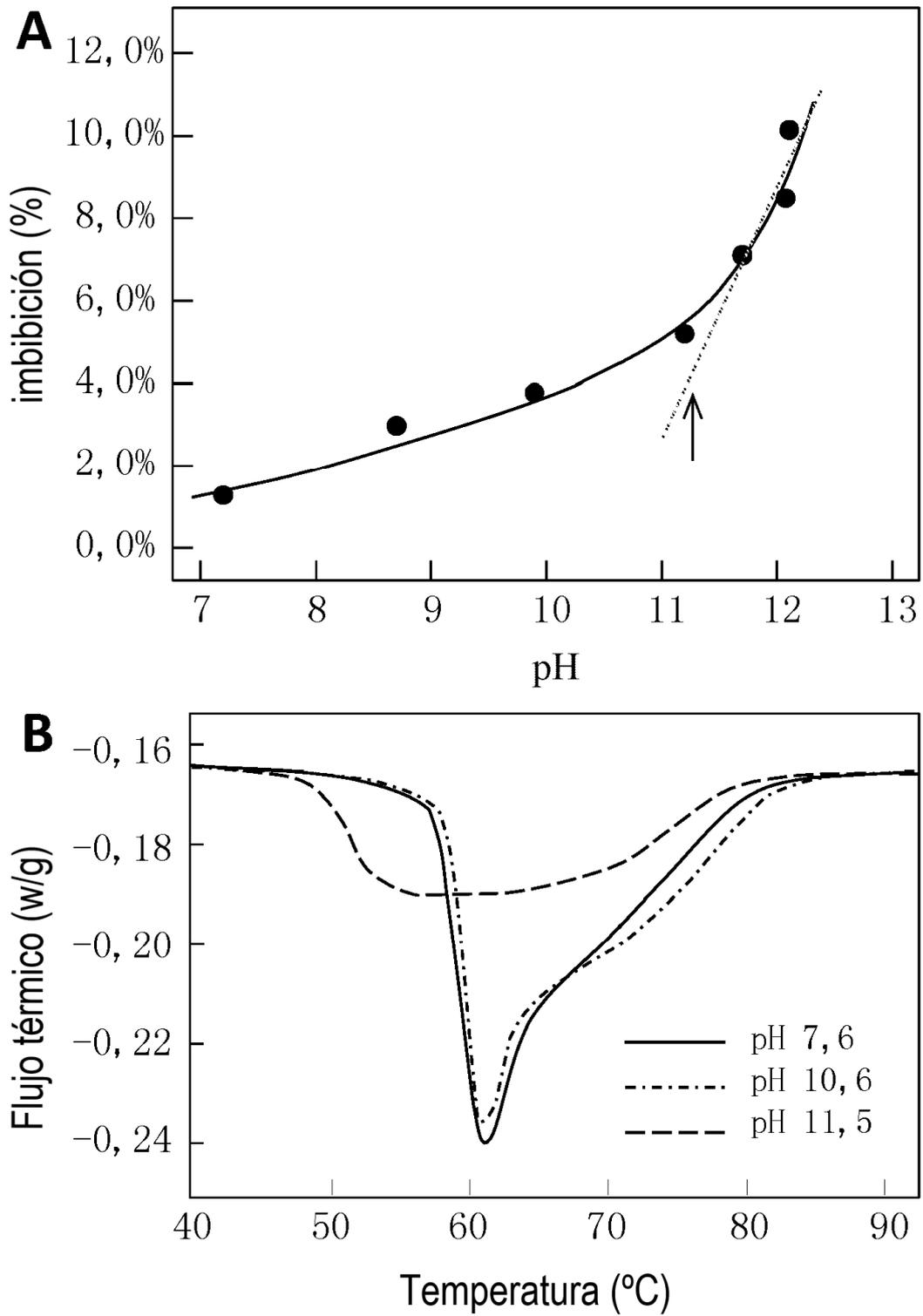


FIG. 3

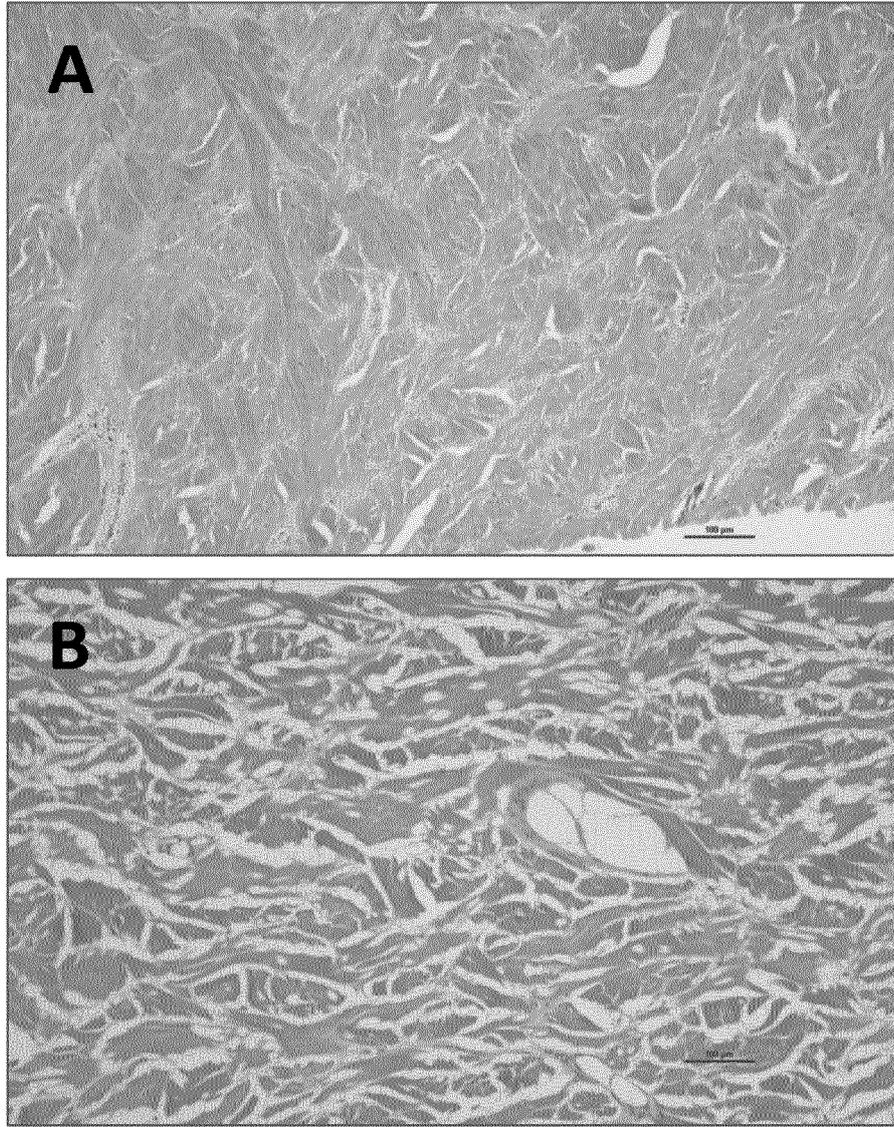


FIG. 4

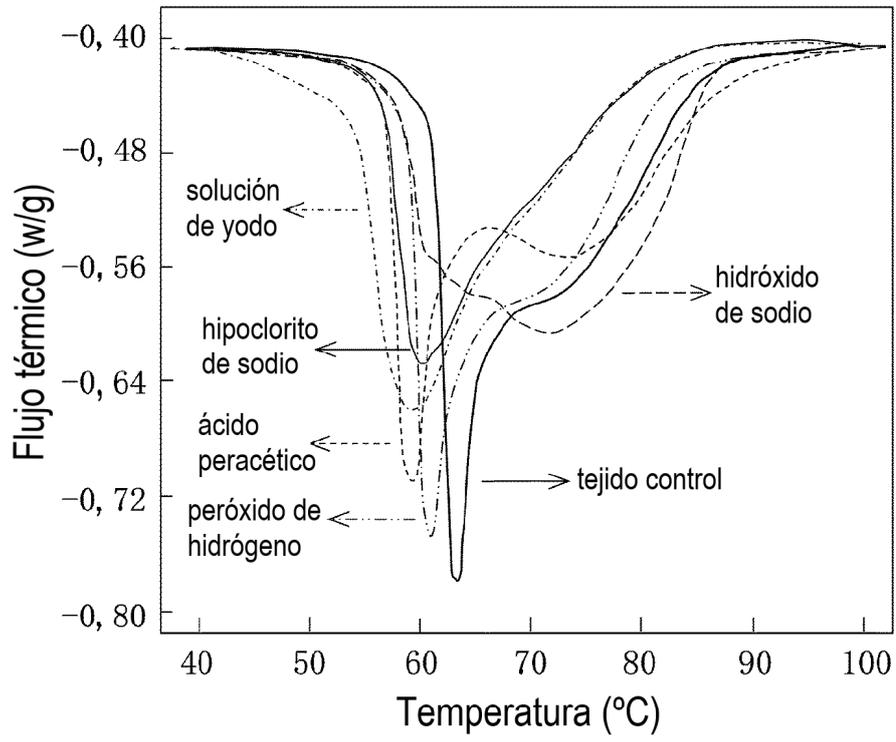


FIG. 5

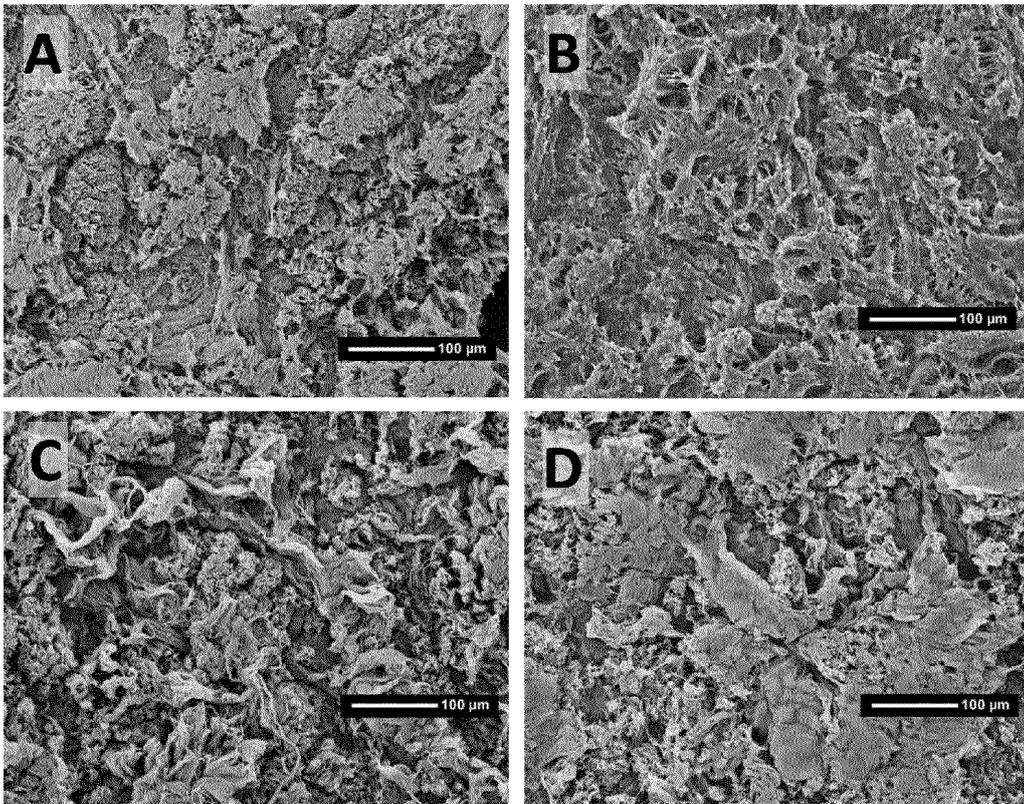


FIG. 6