

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 721 652**

51 Int. Cl.:

**A61L 27/36** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.05.2014 PCT/CN2014/078737**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.03.2015 WO15027727**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.05.2014 E 14840537 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.01.2019 EP 3040088**

54 Título: **Método para preparar un material de matriz de tejido descelularizado animal y un material de matriz de tejido descelularizado preparado mediante el mismo**

30 Prioridad:

**26.08.2013 CN 201310376619**

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

**02.08.2019**

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**

**Observaciones:**

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

ES 2 721 652 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 preparar un material de matriz de tejido descelularizado animal y un material de matriz de tejido descelularizado preparado mediante el mismo

5

Campo técnico

La presente invención se refiere al campo técnico de tratamiento de tejidos biológicos y fabricación de materiales de matriz tisular y, en particular, se refiere a un método para fabricar un material de matriz de tejido acelular animal y un material de matriz de tejido acelular animal fabricado por el mismo, como se define en las reivindicaciones.

10

Antecedentes de la técnica relacionada

Hay una gran similitud y homología en una matriz extracelular de un tejido y órgano de un organismo humano y muchos animales. Un material de matriz biológico fabricado por descelularización de un tejido y órgano alogénico o xenogénico se ha usado satisfactoriamente para la reparación y restauración de tejidos humanos en medicina clínica. La matriz de tejido y órgano descelularizado se usa ampliamente también para diversos estudios en ingeniería tisular y medicina regenerativa, por ejemplo, eliminación de componentes celulares originales de un tejido y órgano de animales y recelularización y funcionalización de la matriz del tejido y órgano que tiene una estructura de armazón tisular tridimensional por células humanas *in vitro*, produciendo finalmente de ese modo el tejido y órgano que puede implantarse en el organismo humano.

15

20

La matriz del tejido y órgano es un armazón tridimensional compuesto de diversas proteínas estructurales complejas y proteínas funcionales, y comprende muchos otros complejos activos. Los componentes principales incluyen fibra de colágeno, glucoproteína, mucoproteína y similares, y los otros componentes incluyen sacáridos tales como glucosaminoglucano (ácido hialurónico, sulfato de condroitina), algunos lípidos y factores de crecimiento. Una buena matriz del tejido y órgano tiene resistencia biomecánica adecuada y, después de implantarse en un hospedador, el material de matriz proporciona soporte biomecánico inicial y regula el comportamiento celular (por ejemplo, adherencia, migración, proliferación y diferenciación) interactuando con una célula hospedadora, y la propia matriz de tejido y órgano se degrada gradualmente y se convierte en un nuevo tejido con el crecimiento interior de la célula hospedadora.

25

30

Actualmente, hay aproximadamente treinta tipos de productos de material de matriz derivados de tejidos y órganos en todo el mundo, que se han usado en diversas medicinas clínicas tales como reparación y regeneración tisular. Las materias primas de los tejidos y órganos en estos productos se obtienen de tejidos de seres humanos y diversos de mamíferos, incluyendo vaso sanguíneo, válvula cardíaca, ligamento, nervio, piel, mucosa del intestino delgado, estómago anterior, pericardio, peritoneo, tendón muscular y vejiga, y similares.

35

Un procedimiento del proceso para fabricar la matriz del tejido y órgano es muy complejo, incluyendo procesos tales como recogida, conservación, lavado, desinfección, descelularización, reducción de la antigenicidad, inactivación vírica y esterilización final del tejido y órgano y similares. Hay muchos métodos existentes para fabricar la matriz del tejido y órgano, y pueden clasificarse en un método físico, un método químico, un método enzimático y similares de acuerdo con sus principios de acción de la descelularización. El método de descelularización más habitualmente usado es un método en que se combina el tratamiento físico y el tratamiento químico. La membrana celular se daña por agitación o ultrasonidos, masaje mecánico o presurización, congelación y descongelación, de modo que los componentes celulares se liberan de la célula, facilitando adicionalmente la posterior descelularización y lavado usando un detergente químico. El propio método físico en general no es suficiente para conseguir descelularización completa. El método de tratamiento enzimático, tal como alguna tripsina, puede alterar la densidad y porosidad de la matriz extracelular tisular, y corta la conexión entre la superficie celular y la matriz extracelular tisular. Además, usando diferentes procedimientos y métodos del proceso, la eficacia de eliminación de las células y el efecto o daño a la matriz del tejido y órganos son diferentes. Además del daño directo a la matriz del tejido y órgano, la recogida, conservación, lavado, desinfección y tratamiento de descelularización también influyen en las posteriores etapas de procesamiento del tejido y órgano. Diversos tratamientos influirán y cambiarán la composición bioquímica de la matriz del tejido y órgano, y la ultraestructura y la propiedad biomecánica del armazón tridimensional en diferente grado, que influirá en la respuesta del hospedador al material de matriz implantado. La evidencia de ensayos preclínicos en animales y aplicación clínica en seres humano demuestra que hay grandes diferencias entre diversos productos de la matriz del tejido y órgano en términos del rendimiento clínico de reparación y regeneración tisular. La variación de las características de la matriz del tejido y órgano durante el proceso de fabricación es una de las razones principales que causan la diferencia de efectos clínicos de diversos productos. El documento WO-A-2011/132089 divulga un método para producir un tejido bioprotésico humano, que comprende: poner en contacto un tejido humano con una solución hipotónica para producir un tejido lisado; poner en contacto el tejido lisado con una primera solución de tensioactivo para producir un tejido tratado con tensioactivo; poner en contacto el tejido tratado con tensioactivo con una solución de enzima nucleasa para producir un tejido tratado con enzima; poner en contacto el tejido tratado con enzima con una solución de limpieza que comprende un segundo tensioactivo, un agente caotrópico o una mezcla de los mismos, para producir un tejido descelularizado; y poner en contacto el tejido descelularizado con una solución de agente reductor de carga biológica para producir el tejido bioprotésico humano.

40

45

50

55

60

65

Contenido de la invención

En un aspecto, la presente invención proporciona un método para fabricar un material de matriz de tejido acelular animal que comprende a las etapas de:

(1) recoger una materia prima de un tejido animal, en el que el tejido animal se lava para eliminar la sangre y la suciedad, y se corta en un material tisular que tienen una longitud, una anchura y una altura de la especificación y dimensión deseadas, y después el material tisular se conserva a una baja temperatura;

(2) descongelar lentamente y rehidratar el material tisular en una solución salina normal que contiene gentamicina;

(3) desinfectar y esterilizar el material tisular en una solución alcalina moderada, en el que la solución alcalina moderada usada es una solución de bicarbonato de sodio, de hidróxido de sodio con un pH de 10,5 a 11,5 o una solución de hidróxido de amoníaco con una concentración de un 0,1 %, siendo el método de desinfección y esterilización el empapamiento del material tisular rehidratado en la solución alcalina moderada durante 24 horas hasta 48 horas con agitación lentamente, en el que el material tisular entonces se aclara con agua pura estéril, y el pH del material tisular se ajusta para que sea neutro;

(4) descelularizar y lavar el material tisular, en el que el método de descelularización es aclarar el material tisular desinfectado y esterilizado y aclarado en una solución salina normal que contiene 2,0 mmol/l de cloruro de calcio, 2,0 mmol/l de cloruro de magnesio y 100 mg/l de gentamicina a temperatura ambiente durante 1~3 horas, y después añadir una solución de dispasa para eliminar las células, siendo la solución de dispasa una solución de dispasa neutra que contiene de 1 mmol/l a 20 mmol/l de cloruro de calcio, de 1 mmol/l a 20 mmol/l de cloruro de magnesio y de 50 unidades/litro a 400 unidades/litro de dispasa, y siendo el método para eliminar las células con la solución de dispasa el empapamiento del material tisular en la solución de dispasa neutra a 37 °C durante 24 horas hasta 36 horas con agitación lentamente; en el que el lavado comprende lavar con un primer detergente y/o lavar con un segundo detergente, preparándose la primera solución de detergente disolviendo Triton X-100 a una concentración de 0,5 %, en una solución de tampón de ácido hidroxietilpiperazinaetanosulfónico con un pH entre 7,0 y 8,0 y siendo el método de lavado el empapamiento del material tisular en la primera solución de detergente a 37 °C durante 12 horas hasta 18 horas con agitación lentamente; y preparándose la segunda solución de detergente disolviendo desoxicolato de sodio a una concentración de un 1,0 %, en solución de tampón fosfato con un pH entre 7,2 y 7,8, y siendo el método de lavado el empapamiento del material tisular en la segunda solución de detergente a temperatura ambiente durante 24 horas hasta 36 horas con agitación lentamente;

(5) digerir los componentes de ADN del tejido animal, en el que el tejido animal entonces se aclara con una solución salina normal;

(6) digerir un antígeno de resto de  $\alpha$ -1,3-galactosa, es decir, antígeno  $\alpha$ -Gal del tejido animal, en el que el tejido animal entonces se aclara con una alta concentración de una solución de cloruro de sodio, y se aclara con una solución salina normal, en el que cuando se selecciona la materia prima del tejido animal que se ha mejorado por genomanipulación y no tiene antígeno  $\alpha$ -Gal, la etapa (6) se omite y la etapa (7) se realiza directamente;

(7) inactivar los virus en el material tisular y después aclarar el material tisular, en el que el tejido animal se aclara con una solución de tampón fosfato;

(8) envasar y precintar el material tisular en condiciones asépticas; y

(9) tratamiento de esterilización final del material tisular, para obtener el material de matriz de tejido acelular animal.

En el método, se usa un método enzimático para eliminar los componentes celulares y el antígeno  $\alpha$ -Gal y mejorar la flexibilidad de un armazón tisular.

En una realización de la presente invención, la materia prima del tejido animal en la etapa (1) se selecciona de uno cualquiera o más de piel, dermis, arteria, vena, estómago, cartílago, menisco, intestino delgado, intestino grueso, diafragma, tendón muscular, ligamento, tejido nervioso, vejiga, uretra y uréter.

En una realización preferida de la presente invención, el lavado del tejido animal para eliminar la sangre y la suciedad en la etapa (1) se realiza usando agua pura y un método físico o lavado ultrasónico.

En un método del proceso para fabricar el material de matriz de tejido acelular animal, está implicada la etapa de conservación de una materia prima de un tejido a una baja temperatura, en el que la tasa de enfriamiento y calentamiento es un parámetro muy importante. Si la tasa de enfriamiento y calentamiento es demasiado rápida o no

uniforme en los tejidos, pueden producirse grietas delgadas en regiones locales de los tejidos y la matriz tisular es propensa a rasgarse cuando se usa.

5 En una realización de la presente invención, preferiblemente, el material tisular de la etapa (1) se conserva a una temperatura de -40 °C o menos que se consigue con una tasa de enfriamiento promedio de no más de 1,0 °C por minuto, y más preferiblemente la tasa de enfriamiento promedio es 0,5 °C por minuto. El material tisular conservado a una baja temperatura se descongela lentamente en un entorno de 5 °C a 12 °C en la etapa (2), para evitar la producción de grietas en la matriz tisular debido a un aumento de temperatura demasiado rápido. Después de descongelarse completamente, el material tisular descongelado se rehidrata en una solución salina normal que  
10 contiene 100 mg de gentamicina por litro durante 3 horas hasta 6 horas en la etapa (2).

15 En una realización de la presente invención, la conservación a una baja temperatura en la etapa (1) es conservación a largo plazo, el método es depositar un material dérmico porcino sobre un trozo de capa protectora con un área ligeramente más grande que la del material dérmico porcino, tal como tela de hilo de algodón, papel, película de plástico, red de nailon u otras telas tejidas, y enrollar el material de dermis y la capa protectora en un rodillo concéntrico de múltiples capas o formar una forma de envase de múltiples capas con el materia de dermis y la capa protectora alternando, que se coloca en una bolsa de plástico y se mantiene en un refrigerador a -80 °C hasta -40 °C para la conservación después de precintarse.

20 En el método de preparación de las realizaciones de la presente invención, están implicadas la desinfección inicial y esterilización del material tisular. Los métodos existentes comprenden el uso de hipoclorito de sodio, ácido peroxiacético, peróxido de hidrógeno, solución de yodo y una alta concentración de solución de hidróxido de sodio (con un pH de 13 o más). Después del tratamiento usando estas soluciones, la matriz tisular se daña a diferentes grados, especialmente siendo los mayores los efectos de hidróxido de sodio, hipoclorito de sodio y solución de yodo.

25 A diferencia de la tecnología de desinfección y esterilización del material tisular en los métodos existentes, de acuerdo con la presente invención, la solución alcalina moderada de la etapa (3) es una solución de bicarbonato de sodio o hidróxido de sodio con un pH de 10,5 a 11,5 o una solución de hidróxido de amoníaco con una concentración de un 0,1 %, siendo el método de desinfección y esterilización el empapamiento del material tisular rehidratado en una solución alcalina moderada durante 24 horas hasta 48 horas con agitación lentamente, evitando de ese modo el  
30 daño de la matriz tisular.

35 De acuerdo con la presente invención, el método de descclularización de la etapa (4) es aclarar en primer lugar el material tisular desinfectado y esterilizado y aclarado en una solución salina normal que contiene 2,0 mmol/l de cloruro de calcio, 2,0 mmol/l de cloruro de magnesio y 100 mg/l de gentamicina a temperatura ambiente durante 1 hora hasta 3 horas, y después añadir una solución de dispasa para eliminar las células.

40 De acuerdo con la presente invención, la solución de dispasa es una solución de dispasa neutra, que contiene de 1 mmol/l a 20 mmol/l de cloruro de calcio, de 1 mmol/l a 20 mmol/l de cloruro de magnesio y de 50 unidades/litro a 400 unidades/litro de dispasa, y el método para eliminar las células con la solución de dispasa es empapar el material tisular en la solución de dispasa neutra, por ejemplo a 37 °C durante 24 horas hasta 36 horas con agitación lentamente, y más preferiblemente, la solución de dispasa neutra contiene 2,0 mmol/l de cloruro de calcio, 2,0 mmol/l de cloruro de magnesio y de 100 unidades/litro a 200 unidades/litro de dispasa.

45 De acuerdo con la presente invención, después de completarse la descclularización en la etapa (4) se realiza la etapa de lavado. El lavado comprende lavar con un primer detergente y/o lavar con un segundo detergente, en el que la primera solución de detergente es una solución de un 0,5 % de Triton X-100 en una solución de tampón de ácido hidroxietilpiperazinaetanosulfónico (pH 7,0~8,0) y el método de lavado es empapar el material tisular en la primera solución de detergente, a 37 °C durante 12 horas hasta 18 horas con agitación lentamente. La segunda  
50 solución de detergente es una solución de un 1,0 % de desoxicolato de sodio en una solución de tampón fosfato (pH 7,2~7,8) y el método de lavado es empapar el material tisular en la segunda solución de detergente a temperatura ambiente durante 24 horas hasta 36 horas con agitación lentamente. Mientras tanto, se usan otros detergentes adecuados, tales como Tween-20, t-octilfenoxilpolietilenetoxietanol y ácido 3-[(3-colesterol aminopropil)dimetilaamino]-1-propanosulfónico y similares, en realizaciones de la presente divulgación.

55 En una realización de la presente invención, después de empaparse y lavarse en la primera solución de detergente y la segunda solución de detergente, y antes de la etapa (5), el material tisular se aclara tres veces con una solución de tampón de 20 mmol/l de ácido hidroxietilpiperazinaetanosulfónico (con un pH entre 7,0~8,0) a temperatura ambiente, cada vez durante 2 horas hasta 4 horas.

60 Debido a la existencia de ADN de los tejidos animales, se causa fácilmente una respuesta inflamatoria por la matriz tisular que se está implantando en un organismo humano. Además de los humanos y los monos del viejo mundo, otros mamíferos contienen todos, el antígeno  $\alpha$ -Gal que consiste en glucoproteína o glucolípido con un extremo de disacárido de resto de  $\alpha$ -1,3-galactosa [ $\text{Gal}\alpha(1,3)\text{Gal}$ ] *in vivo*. El antígeno  $\alpha$ -Gal en tejidos porcinos causará una  
65 respuesta de rechazo inmunológico. Uno de los métodos para eliminar o superar la respuesta inflamatoria y la

respuesta de rechazo es eliminar el ADN y el antígeno  $\alpha$ -Gal de la matriz de tejido animal usando tratamiento enzimático específico.

En una realización de la presente invención, la digestión de los componentes de ADN del tejido animal en la etapa (5) se consigue añadiendo una solución de desoxirribonucleasa, en la que la solución de desoxirribonucleasa se prepara añadiendo 2,0 mmol/l de cloruro de calcio, 2,0 mmol/l cloruro de magnesio y de 200 a 5000 unidades de enzima por litro de desoxirribonucleasa, en una solución de tampón de 100 mmol/l de trihidroximetil aminometano-ácido clorhídrico con un pH de 7,2, y un método para digerir ADN del tejido animal es empapar el material tisular en la solución de desoxirribonucleasa a tratar durante 18 horas hasta 28 horas, por ejemplo a 37 °C con agitación lentamente, y después colocar el material tisular en una solución salina normal a aclarar dos veces a temperatura ambiente, cada vez durante 1 hora hasta 3 horas.

En una realización de la presente invención, la digestión del antígeno  $\alpha$ -Gal del tejido animal en la etapa (6) se consigue añadiendo solución de  $\alpha$ -galactosidasa, en la que la solución de  $\alpha$ -galactosidasa se prepara añadiendo 2,0 mmol/l de cloruro de calcio, 2,0 mmol/l de cloruro de magnesio y una cantidad de 400 unidades GALU por litro de  $\alpha$ -galactosidasa en una solución de tampón de 10 mmol/l de ácido hidroxietilpiperazinaetanosulfónico con un pH entre 7,0 y 8,0 y un método para digerir el antígeno  $\alpha$ -Gal del tejido animal es empapar el material tisular en la solución de  $\alpha$ -galactosidasa, a lavar durante 24 horas hasta 36 horas, por ejemplo, a 37 °C con agitación lentamente.

Cuando se fabrica la matriz tisular implantada en el organismo humano, es necesario eliminar diversas enzimas residuales. Para conseguir los objetivos anteriores, en una realización de la presente invención se realiza el lavado usando un método de desalado, en el que la alta concentración de solución de cloruro de sodio en la etapa (6) es de un 2 % en peso a un 5 % en peso de solución de cloruro de sodio, y un método de aclarado es empapar el material tisular en la solución de cloruro de sodio y lavar el material tisular dos veces a temperatura ambiente, cada vez durante 2 horas hasta 4 horas. En una realización preferible, la alta concentración de solución de cloruro de sodio puede ser de un 3 % en peso de solución de cloruro de sodio. Además, la solución de cloruro de sodio puede remplazarse con otra solución salina neutra, tal como cloruro de potasio, cloruro de magnesio y cloruro de litio, y similares.

Para aumentar la seguridad de los productos, en una realización preferida de la presente invención, dicho método también se refiere a un tratamiento de inactivación de virus, en el que los agentes de inactivación de virus usados en la etapa (7) son peróxido de hidrógeno y ácido peroxiacético, y un método para la inactivación de virus es empapar el material tisular en una solución que contiene de un 0,01 % en peso a un 0,10 % en peso de peróxido de hidrógeno, de un 0,05 % en peso a un 0,50 % en peso de ácido acético y de un 0,05 % en peso a un 0,50 % en peso de ácido peroxiacético, a lavar durante 2 horas hasta 3 horas a temperatura ambiente con agitación lentamente. En una realización más preferible de la presente invención, se usa una solución que contiene un 0,02 % en peso de peróxido de hidrógeno, un 0,15 % en peso de ácido acético y un 0,10 % en peso de ácido peroxiacético para la inactivación de virus, disminuyéndose el número de virus en  $10^6$  o más durante 2 horas hasta 3 horas. La concentración de peróxido de hidrógeno, ácido acético y ácido peroxiacético puede variarse con el número de bacterias.

En una realización de la presente invención, después de la inactivación de virus de la etapa (7), el material tisular se aclara tres veces a temperatura ambiente con una solución de tampón fosfato neutra, cada vez durante 2 horas hasta 4 horas para eliminar el peróxido de hidrógeno, ácido acético y ácido peroxiacético residual.

El tratamiento de esterilización final del producto tisular a menudo es una de las etapas más destructivas para el material tisular. Por este motivo, en una realización de la presente invención, se usa una irradiación a baja temperatura para realizar el tratamiento en la etapa (9). En una realización preferida de la presente invención, en condiciones de -40 °C, el tratamiento de esterilización final del material tisular se realiza usando de 10 kGy a 50 kGy de rayos gamma, que reduce enormemente el daño al material tisular. En algunas realizaciones de la presente invención, se varía la dosificación de radiación dependiendo del número de bacterias en la matriz tisular. En una realización preferible, el tratamiento de esterilización final del material tisular se realiza usando de 20 kGy a 30 kGy de rayos gamma.

En algunas realizaciones de la presente invención, además del método de esterilización final por irradiación, la matriz tisular en dicho método también puede esterilizarse usando óxido de etileno gaseoso después de liofilizarse.

En algunos aspectos de la divulgación, la secuencia de la etapa (4) (descelularización con enzima), etapa (5) (digestión de ADN con enzima) y etapa (6) (digestión del antígeno de resto de  $\alpha$ -1,3-galactosa con enzima) puede ajustarse o alterarse según se requiera realmente. Por ejemplo, en primer lugar, puede digerirse el antígeno de resto de  $\alpha$ -1,3-galactosa en tejidos animales, y después los tejidos animales se descclularizan y los componentes de ADN de los animales se digieren; o en primer lugar se elimina el ADN animal y después el antígeno de resto de  $\alpha$ -1,3-galactosa se elimina y finalmente se trata por descclularización.

Además, en algunas realizaciones alternativas de la presente invención, si se seleccionan los animales mejorados por genomanipulación y libres de antígeno  $\alpha$ -Gal, la etapa (6) se omite y la etapa (7) se realiza directamente. Mientras tanto, para reducir el efecto desfavorable sobre la proteólisis de la matriz extracelular, la concentración de la dispasa, la temperatura y el tiempo se controlarán y optimizarán mientras se trata. En el procedimiento del proceso, puede añadirse además un inhibidor enzimático específico, por ejemplo, ácido etilendiaminatetraacético para inhibir la actividad de la dispasa.

Otro aspecto de la presente invención se refiere además a un material de matriz de tejido acelular animal fabricado por el método anterior de las realizaciones de la presente invención.

En una realización de la presente invención, se obtiene dicho material de matriz de tejido acelular animal usando dermis con membrana basal o dermis con membrana basal eliminada como materia prima de un tejido animal.

En el método para fabricar un material de matriz de tejido acelular de acuerdo con las realizaciones de la presente invención, está implicada una serie de etapas de tratamiento de tejidos de piel animal y fabricación de la matriz del tejido y órgano, así como una pluralidad de soluciones bioquímicas y fórmulas de las mismas. El material de matriz de tejido acelular animal fabricado por las etapas y soluciones anteriores retiene la estructura de almacén básico original de la matriz extracelular tisular, los componentes bioquímicos principales y la resistencia biomecánica, eliminándose un antígeno que causa respuesta de rechazo inmunológico en el organismo humano de forma eficaz del tejido animal; y mejora la flexibilidad, adaptabilidad y el rendimiento de integración de la superficie curvada enrollada de la matriz tisular, y el material de matriz de tejido acelular animal fabricado es similar a la piel humana, lo que no causará que el colágeno en la matriz tisular reticule con otras proteínas, y no causará degradación o desnaturalización, y el material de tejido acelular animal retiene la integridad biológica de la matriz de tejido dérmico natural.

Descripción de los dibujos

Figura 1: Histología de secciones tisulares.

- A: Sección de tinción HE de una dermis porcina fresca;
- B: Una sección de tinción HE de una matriz dérmica después de tratarse;
- C: Una sección de tinción inmunológica de antígeno de resto de  $\alpha$ -1,3-galactosa de la dermis porcina fresca;
- D: Una sección de tinción inmunológica de antígeno de resto de  $\alpha$ -1,3-galactosa de la matriz dérmica tratada.

Figura 2: Histología de secciones tisulares.

- A, B, C: Una sección de tinción inmunológica de colágeno de tipo I;
- D, E, F: Una sección de tinción inmunológica de colágeno de tipo III;
- A, D: Tinción negativa;
- B, E: Tinción positiva de una dermis porcina fresca sin tratar;
- C, F: Matrices dérmicas de tejido tratado.

Figura 3: Un diagrama característico de un material de matriz de tejido celular frente a la hidrólisis mediante colagenasa después de la esterilización final por irradiación con rayos gamma.

Figura 4: Una histología de tinción HE que muestra crecimiento interior de células hospedadoras y neovascularización, después de dos semanas desde el implante subcutáneo de un material de matriz de tejido acelular en una rata.

Descripción detallada de realizaciones

Las realizaciones de la presente invención se ilustran adicionalmente en detalle mediante ejemplos a partir de ahora en este documento, y pretenden ilustrar la presente invención.

### **Ejemplo 1: Fabricación y detección de rendimiento de un material de matriz de tejido acelular animal**

#### 1. Fabricación

##### (1) Recogida y conservación de un tejido y órgano

Se recogió pellejo porcino fresco de un cerdo recién sacrificado, y se conservó temporalmente en un refrigerador a 4 °C. Después de que el pellejo porcino se rasurara mecánicamente, el pellejo porcino se dividió en una capa de dermis que tenía un grosor de aproximadamente 1,0 mm, que se crioconservó a -20 °C.

##### (2) Descelularización

Después de descongelar la dermis, se lavó abundantemente en primer lugar con una solución salina normal dos veces, cada vez durante 30 minutos. La dermis porcina lavada abundantemente se empapó en una solución

salina normal que contenía 100 mg de gentamicina por litro y se añadieron adicionalmente una concentración de 2,0 milimoles por litro de cloruro de calcio, una concentración de 2,0 milimoles por litro de cloruro de magnesio y 150 unidades por litro de dispaasa neutra a la solución, y la dermis se trató a 37 °C durante 24 horas.

5 (3) Lavado

Después de empaparse en gentamicina, la dermis se lavó con una solución al 0,5 % de Triton X-100 durante 16 horas. Después de la descelularización y el lavado, la dermis se lavó abundantemente con una solución salina normal dos veces, cada vez durante 120 minutos.

10

(4) Digestión de ADN y eliminación del antígeno de resto de  $\alpha$ -1,3-galactosa

A cada litro de la solución se le añadió además una concentración de 2,0 milimoles de cloruro de calcio, una concentración de 2,0 milimoles de cloruro de magnesio, 5000 unidades de desoxirribonucleasa y dos comprimidos de Beano de GlaxoSmithKline (que contenía  $\alpha$ -galactosidasa) y la dermis se trató a temperatura ambiente durante 20 horas.

15

(5) Inactivación de virus

20

Después de lavarse, la dermis se esterilizó y se inactivó el virus con una solución que contenía un 0,02 % de peróxido de hidrógeno, un 0,15 % de ácido acético y un 0,10 % ácido peroxiacético durante 2 horas.

(6) Lavado y conservación

25

Finalmente, la dermis se lavó abundantemente con solución salina normal estéril hasta que no quedó Triton X-100 ni enzima. La matriz dérmica tratada se conservó temporalmente en una 6 % de glicerina.

2. Detección de rendimiento

30

Se indicó por las mediciones que la resistencia a la tracción del material era de  $15,0 \pm 3,6$  megapascales (N=24); la resistencia de la sutura era de  $56 \pm 13$  newton (N=24); cada 100 g en peso húmedo de la matriz de dermis contenía  $24,2 \pm 2,9$  g de un material de materia seca de una dermis (N=15).

35

Se demostró por análisis usando calorimetría diferencial de barrido que la temperatura de desnaturalización inicial del material de matriz tisular era  $58,0 \pm 0,4$  °C (N=5), y el valor de cambio de entalpía era  $61,6 \pm 2,1$  Julios por gramo por peso seco (N=5), que no era significativamente diferente de la matriz de dermis en estado natural de la materia prima de la dermis.

40

No hubo cambio significativo o daño en las características de la matriz de dermis en el curso del proceso completo. Se indicó por análisis de la sección tisular que no había componentes celulares (por ejemplo, ácido desoxirribonucleico, ADN) y antígeno de resto de  $\alpha$ -1,3-galactosa en la matriz, véase la figura 1 para los detalles. También se demostró por análisis de tinción inmunológica de colágeno de tipo I y III que no había daño en el colágeno en la matriz de dermis en el proceso de tratamiento, véase la figura 2 para los detalles.

45

**Ejemplo 2: Determinación de las condiciones apropiadas para lavado y desinfección de la dermis**

50

Se recogió dermis fresca de un cuerpo porcino, y la dermis porcina fresca se trató en soluciones de hidróxido de sodio con pH de 10,6, 11,5 y 11,8 a 37 °C, respectivamente. Cada kilogramo del pellejo porcino estaba en 4 litros de solución de hidróxido de sodio, con el control de tampón fosfato. Después de 24 horas, se determinaron las unidades formadoras de colonias por mililitro de solución. El tampón fosfato contenía  $10,3 \pm 1,3$  unidades formadoras de colonias logarítmicas (LogCFU)(N=3); y las unidades formadoras de colonias logarítmicas en la solución con pH de 10,6, 11,5 y 11,8 eran de  $2,1 \pm 0,1$ , 0 y 0, respectivamente. Como pudo observarse, el efecto de desinfección y esterilización en solución alcalina moderada fue significativo.

55

Se demostró usando calorimetría diferencial de barrido que la matriz tisular se dañaba por lavado con una solución alcalina con un pH de 11,5 o más, y la estabilidad de la proteína en la matriz tisular se reducía significativamente. El daño del pH alto en la matriz tisular demostró además la inhibición irreversible y el endurecimiento de la matriz tisular. Este ejemplo determinó una condición más adecuada para lavar y desinfectar la dermis, que comprendía ajustar el pH entre 10,5~11,5.

60

**Ejemplo 3: Fabricación y detección de rendimiento de un material de matriz de tejido acelular animal**

1. Fabricación

65

(1) Recogida y conservación de un tejido u órgano

Se recogió pellejo porcino fresco de un cerdo recién sacrificado y se conservó temporalmente en un refrigerador a 4 °C. Después de que el pellejo porcino se rasurara mecánicamente, el pellejo porcino se dividió en una capa de dermis que tenía un grosor de aproximadamente 1,0 mm.

5 (2) Recogida y lavado

Después de la recogida y el lavado (véase el ejemplo 1), la dermis porcina con un grosor de 1,0 mm se conservó temporalmente en un refrigerador a -80 °C.

10 (3) Descelularización

Después de descongelarse, la dermis se lavó abundantemente con 5 mmol/l de solución de ácido hidroxietilpiperazinaetanosulfónico (pH 7,4) y después se trató a 37 °C durante 18 horas después de añadir 2,0 mmol/l de cloruro de calcio y 200 unidades/litro de dispasa neutra.

15 (4) Lavado

La dermis se lavó con un 1,0 % de solución de desoxicolato de sodio a 37 °C durante 20 horas.

20 (5) Digestión de ADN y antígeno de resto de  $\alpha$ -1,3-galactosa

Después de lavar abundantemente la dermis con una solución salina normal estéril durante 120 minutos, a cada litro de la solución se le añadió además 2,0 mmol/l de cloruro de calcio, 2,0 mmol/l de cloruro de magnesio, 4000 unidades de desoxirribonucleasa recombinante y 200 unidades GALU de  $\alpha$ -galactosidasa extraída de semillas de granos de café verdes, y la dermis se trató a 37 °C durante 24 horas.

25 (6) Inactivación de virus

Después de lavarse con solución salina normal, la dermis se esterilizó con un 0,05 % de peróxido de hidrógeno, un 0,30 % de ácido acético y un 0,20 % de ácido peroxiacético durante 2 horas.

30 (7) Lavado

La dermis se lavó abundantemente con una solución salina normal estéril hasta que no quedó desoxicolato de sodio, desoxirribonucleasa recombinante y  $\alpha$ -galactosidasa.

35 (8) Tratamiento de esterilización final

La matriz dérmica tratada se conservó en solución salina normal estéril que contenía un 12 % de glicerina y se esterilizó mediante 25 kGy de rayos gamma.

2. Detección de rendimiento

Se demostró, por medición usando el durómetro con sonda de tipo OO, que la suavidad de la dermis porcina sin tratar era de  $40 \pm 8,6$  (N=24), la suavidad de la dermis porcina acelular era de  $13,0 \pm 4,0$  (N=25) y la suavidad de la dermis humana era de  $14,2 \pm 6,1$  (N=40). Se demostró que no había diferencia estadísticamente significativa en la suavidad entre la matriz dérmica porcina después del tratamiento de descclularización y el tejido de dermis humana, en comparación con la dermis porcina sin tratar (mucho más dura). Además, se demostró que el método de los ejemplos de la presente invención mejoraba la flexibilidad, adaptabilidad y el rendimiento de integración de superficie curvada enrollada de la matriz tisular.

Se demostró mediante análisis de la sección tisular que el antígeno de resto de  $\alpha$ -1,3-galactosa de la matriz tisular producida se eliminaba completamente, el resultado de la tinción era negativo y no se expresaba antígeno. El contenido de ADN se determinó usando un método de fluorocromo QuantiT-PicoGreen, cuyos resultados indicaron que cada gramo de la dermis porcina fresca contenía aproximadamente  $84,0 \pm 10,2$  microgramos de ADN (N=3), cada gramo de la dermis porcina después de lavarse y desinfectarse contenía  $62,9 \pm 9,5$  microgramos de ADN (N=3), cada gramo de la matriz tisular después de tratarse por descclularización y lavarse contenía únicamente  $1,9 \pm 1,1$  microgramos de ADN (N=3) y el contenido de ADN animal se redujo en promedio en un 97,7 %. Se demostró por análisis usando calorimetría diferencial de barrido que la temperatura de desnaturalización inicial del material de matriz tisular era de  $54,7 \pm 0,2$  °C (N=3), el valor del cambio de entalpía era de  $59,5 \pm 3,1$  Julios por grama en peso seco (N=3). En comparación con la dermis en estado natural de la materia prima de la dermis porcina, la temperatura de desnaturalización inicial se redujo únicamente en 3,3 °C, y no hubo diferencia significativa en el valor de cambio de entalpía, que ilustró que no había cambio significativo o daño en las características de la matriz tisular en el proceso de fabricación completo (incluyendo esterilización por radiación final por rayos gamma).

65

5 El contenido de colágeno en la matriz tisular se determinó por el método de hidroxiprolina, y la matriz tisular de pellejo porcino después de la esterilización por radiación final por rayos gamma contenía un  $91,0 \pm 3,0$  % (N=6) de colágeno. El contenido de elastina se determinó por el método de tinción de fastina, y la matriz tisular después de esterilización por radiación final por rayos gamma contenía un  $0,92 \pm 0,21$  % (N=6) de elastina, que se redujo en un 71,4 % en comparación con el material dérmico porcino sin tratar.

10 Las características del material de matriz de tejido acelular frente a la hidrólisis mediante colagenasa pueden usarse para estudiar la estabilidad del colágeno en el material de matriz de tejido acelular fabricado por los ejemplos de la presente invención después de esterilización por radiación final por rayos gamma. El material de matriz de tejido  
15 acelular fabricado se colocó en una solución de trihidroximetil aminometano-ácido clorhídrico que contenía 5 unidades de colagenasa por mililitro (10 mmol/l, pH 7,5) y se incubó a 37 °C durante hasta 64 horas. Los resultados demuestran que, en comparación con el material dérmico porcino sin tratar, las características de la matriz de tejido  
20 acelular fabricada por el método de los ejemplos de la presente invención frente a la hidrólisis mediante colagenasa no cambiaban después de esterilización por radiación final por rayos gamma, véase la figura 3 para los detalles.

15 Utilizando las características de recelularización del material de matriz de tejido acelular fabricado por el método de los ejemplos de la presente invención, se realizó un experimento de evaluación animal con ratas (*Rattus norvegicus* Lewis). Después de narcotizar a 8 ratas, se eliminó el pelo de la espalda mediante una afeitadora eléctrica, se frotó  
20 el sitio quirúrgico con alcohol al 70 % y se cortó una incisión separada en la parte superior e inferior en el lomo y a la izquierda y a la derecha, para formar un pequeño bolsillo cuyo tamaño era adecuado para acomodar 1x1 cm de muestra (aproximadamente 1 mm de grosor). La muestra de material de matriz de tejido acelular se implantó de forma subcutánea en la rata. Después de la cirugía, si las ratas mostraban signos de dolor se usaba una solución de buprenorfina (0,05 mg/kg) para detener el dolor. Las ratas se sacrificaron después de dos semanas y se recogió el  
25 material de matriz de tejido acelular implantado y se fijó con una solución de formalina neutra al 10 %. Se observó el crecimiento interior de células hospedadoras y la angiogénesis de las ratas mediante un método de sección tisular. Los resultados demostraron que un gran número de células hospedadoras crecían en el material de matriz tisular en dos semanas, y que comenzaba la neovascularización sin observarse reacción adversa, véase la figura 4 para los detalles.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para fabricar un material de matriz de tejido acelular animal, que comprende las etapas de:

- 5 (1) recoger una materia prima de un tejido animal, en el que el tejido animal se lava para eliminar la sangre y la suciedad, y se corta en un material tisular que tienen una longitud, una anchura y una altura de la especificación y dimensión deseadas, y después el material tisular se conserva a una baja temperatura;
- 10 (2) descongelar lentamente y rehidratar el material tisular en una solución salina normal que contiene gentamicina;
- 15 (3) desinfectar y esterilizar el material tisular en una solución alcalina moderada, en el que la solución alcalina moderada usada es una solución de bicarbonato de sodio o hidróxido de sodio con un pH de 10,5 a 11,5 o una solución de hidróxido de amoníaco con una concentración de un 0,1 %, siendo el método de desinfección y esterilización el empapamiento del material tisular rehidratado en la solución alcalina moderada durante 24 horas hasta 48 horas con agitación lentamente, en el que el material tisular entonces se aclara con agua pura estéril, y el pH del material tisular se ajusta para que sea neutro;
- 20 (4) descelularizar y lavar el material tisular,
- 25 en el que el método de descelularización es aclarar el material tisular desinfectado y esterilizado y aclarado en una solución salina normal que contiene 2,0 mmol/l de cloruro de calcio, 2,0 mmol/l de cloruro de magnesio y 100 mg/l de gentamicina a temperatura ambiente durante 1~3 horas, y después añadir una solución de dispasa para eliminar las células, siendo la solución de dispasa una solución de dispasa neutra que contiene de 1 mmol/l a 20 mmol/l de cloruro de calcio, de 1 mmol/l a 20 mmol/l de cloruro de magnesio y de 50 unidades/litro a 400 unidades/litro de dispasa, y siendo el método para eliminar las células con la solución de dispasa el empapamiento del material tisular en la solución de dispasa neutra a 37 °C durante 24 horas hasta 36 horas con agitación lentamente;
- 30 en el que el lavado comprende lavar con un primer detergente y/o lavar con un segundo detergente, preparándose la primera solución de detergente disolviendo Triton X-100 a una concentración de 0,5 %, en una solución de tampón de ácido hidroxietilpiperazinaetanosulfónico con un pH entre 7,0 y 8,0 y siendo el método de lavado el empapamiento del material tisular en la primera solución de detergente a 37 °C durante 12 horas hasta 18 horas con agitación lentamente; y preparándose la segunda solución de detergente disolviendo desoxicolato de sodio a una concentración de un 1,0 %, en solución de tampón fosfato con un pH entre 7,2 y 7,8, y siendo el método de lavado el empapamiento del material tisular en la segunda solución de detergente a temperatura ambiente durante 24 horas hasta 36 horas con agitación lentamente;
- 35 (5) digerir los componentes de ADN del tejido animal, en el que el tejido animal entonces se aclara con una solución salina normal;
- 40 (6) digerir un antígeno de resto de  $\alpha$ -1,3-galactosa, es decir, antígeno  $\alpha$ -Gal del tejido animal, en el que el tejido animal entonces se aclara con una alta concentración de una solución de cloruro de sodio, y se aclara con una solución salina normal, en el que, cuando se selecciona la materia prima del tejido animal que se ha mejorado por genomanipulación y no tiene antígeno  $\alpha$ -Gal, la etapa (6) se omite y la etapa (7) se realiza directamente;
- 45 (7) inactivar los virus en el material tisular y después aclarar el material tisular, en el que el tejido animal se aclara con una solución de tampón fosfato;
- 50 (8) envasar y precintar el material tisular en condiciones asépticas;
- (9) tratamiento de esterilización final del material tisular, para obtener el material de matriz de tejido acelular animal.
- 55 en el que se usa un método enzimático para eliminar los componentes celulares y el antígeno  $\alpha$ -Gal y mejorar la flexibilidad de un armazón.

2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la materia prima del tejido animal usado en la etapa (1) se selecciona de uno cualquiera o más de piel, dermis, arteria, vena, estómago, cartílago, menisco, intestino delgado, intestino grueso, diafragma, tendón muscular, ligamento, tejido nervioso, vejiga, uretra y uréter.

3. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el lavado del tejido animal para eliminar la sangre y la suciedad en la etapa (1) se realiza usando agua pura y un método físico o ultrasónico, o en el que el material tisular obtenido en la etapa (1) se conserva a una temperatura de -40 °C o menos, que se consigue con una tasa de enfriamiento promedio de no más de 1,0 °C por minuto, y como alternativa la tasa de enfriamiento promedio es 0,5 °C por minuto.

4. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la conservación a una baja temperatura en la etapa (1) es conservación a largo plazo, y el método es depositar un material dérmico porcino sobre un trozo de capa protectora con un área más grande que la del material dérmico porcino, tal como tela de hilo de algodón, papel, película de plástico, red de nailon u otras telas tejidas, y enrollar el material de dermis y la capa protectora en un rodillo concéntrico de múltiples capas o formar una forma de envase de múltiples capas con el materia de dermis y la capa protectora alternando, que se coloca en una bolsa de plástico y se crioconserva a -80 °C hasta -40 °C después de precintarse.
5. El método con la reivindicación 1, en el que el material tisular conservado a una baja temperatura se descongela lentamente en un entorno de 5 °C hasta 12 °C en la etapa (2), o
- en el que el material tisular descongelado se rehidrata en una solución salina normal que contiene 100 mg de gentamicina por litro en la etapa (2).
6. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la solución de dispasa neutra contiene 2,0 mmol/l de cloruro de calcio, 2,0 mmol/l de cloruro de magnesio y de 100 unidades/litro a 200 unidades/litro de dispasa.
7. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que después de empaparse en la primera solución de detergente y/o la segunda solución de detergente, y antes de la etapa (5), el material tisular se aclara tres veces con una solución de tampón de 20 mmol/l de ácido hidroxietilpiperazinaetanosulfónico con un pH entre 7,0 y 8,0 a temperatura ambiente, cada vez durante 2 horas hasta 4 horas.
8. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la digestión de los componentes de ADN del tejido animal en la etapa (5) se consigue añadiendo una solución de desoxirribonucleasa, en el que la solución de desoxirribonucleasa se prepara añadiendo 2,0 mmol/l de cloruro de calcio, 2,0 mmol/l cloruro de magnesio y 5000 unidades de enzima por litro de desoxirribonucleasa en una solución de tampón de 100 mmol/l de trihidroximetil aminometano-ácido clorhídrico con un pH de 7,2 y un método para digerir el ADN del tejido animal es empapar el material tisular en la solución de desoxirribonucleasa a tratar durante 18 horas hasta 28 horas a 37 °C con agitación lentamente, y después colocar el material tisular en una solución salina normal para aclararse dos veces a temperatura ambiente, cada vez durante 1 hora hasta 3 horas.
9. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la digestión del antígeno  $\alpha$ -Gal del tejido animal en la etapa (6) se consigue añadiendo solución de  $\alpha$ -galactosidasa, en el que la solución de  $\alpha$ -galactosidasa se prepara añadiendo 2,0 mmol/l de cloruro de calcio, 2,0 mmol/l de cloruro de magnesio y una cantidad de 400 unidades GALU por litro de  $\alpha$ -galactosidasa en una solución de tampón de 10 mmol/l de ácido hidroxietilpiperazinaetanosulfónico con un pH entre 7,0 y 8,0 y un método para digerir el antígeno  $\alpha$ -Gal del tejido animal es empapar el material tisular en la solución de  $\alpha$ -galactosidasa, para lavarse durante 24 horas hasta 36 horas a 37 °C con agitación lentamente.
10. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la alta concentración de la solución de cloruro de sodio usada en la etapa (6) es una solución de cloruro de sodio al 2 % hasta el 5 %, y un método de aclarado es empapar el material tisular en la solución de cloruro de sodio y lavar el material tisular dos veces a temperatura ambiente, cada vez durante 2 horas hasta 4 horas, con la alta concentración de la solución de cloruro de sodio que es como alternativa una solución de cloruro de sodio al 3 %, o
- en el que los agentes usados en la inactivación de virus en la etapa (7) son peróxido de hidrógeno y ácido peroxiacético, y un método para la inactivación de virus es empapar el material tisular en una solución que contiene de un 0,01 % a un 0,10 % de peróxido de hidrógeno, de un 0,05 % a un 0,50 % de ácido acético y de un 0,05 % a un 0,50 % de ácido peroxiacético, a lavar durante 2 horas hasta 3 horas a temperatura ambiente con agitación lentamente.
11. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que después de la inactivación de virus en etapa (7) el material tisular se aclara tres veces a temperatura ambiente con una solución de tampón fosfato neutra, cada vez durante 2 horas hasta 4 horas para eliminar el peróxido de hidrógeno, el ácido acético y el ácido peroxiacético residuales, o
- en el que el tratamiento de esterilización final en la etapa (9) es realizar el tratamiento de esterilización usando irradiación de rayos gamma a baja temperatura u óxido de etileno gaseoso, siendo la dosificación de tratamiento de rayos gamma de 10 kGy a 50 kGy, o
- en el que la secuencia de la etapa (4), etapa (5) y etapa (6) puede ajustarse según se requiera realmente.
12. Un material de matriz de tejido acelular animal fabricado por el método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-11.

13. El material de matriz de tejido acelular animal de acuerdo con la reivindicación 12, que se obtiene usando dermis con membrana basal o dermis con membrana basal eliminada como materia prima de un tejido animal.

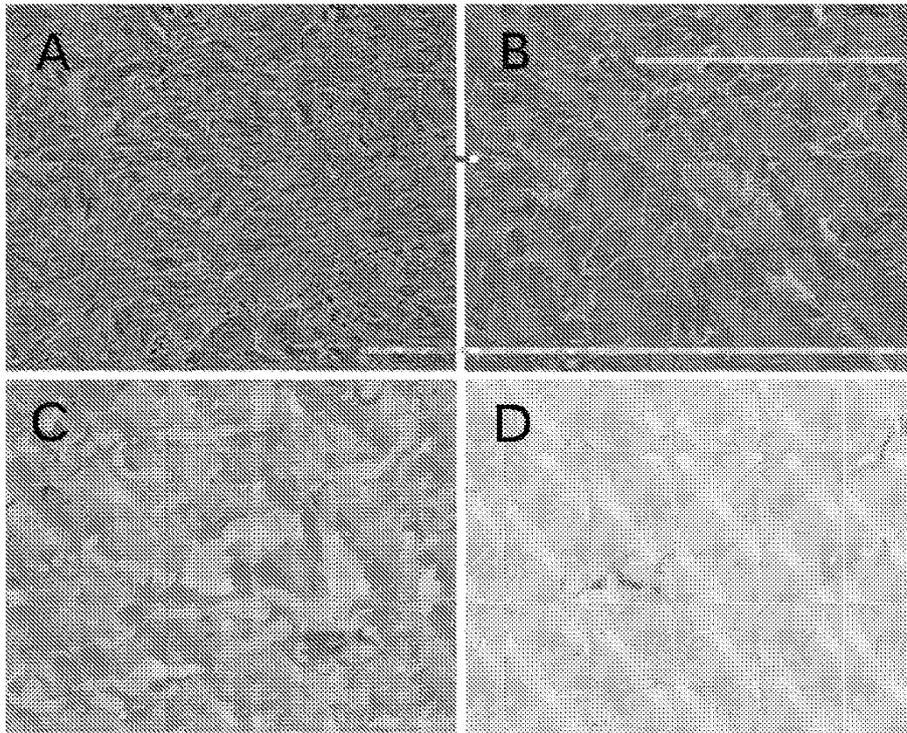


FIG. 1

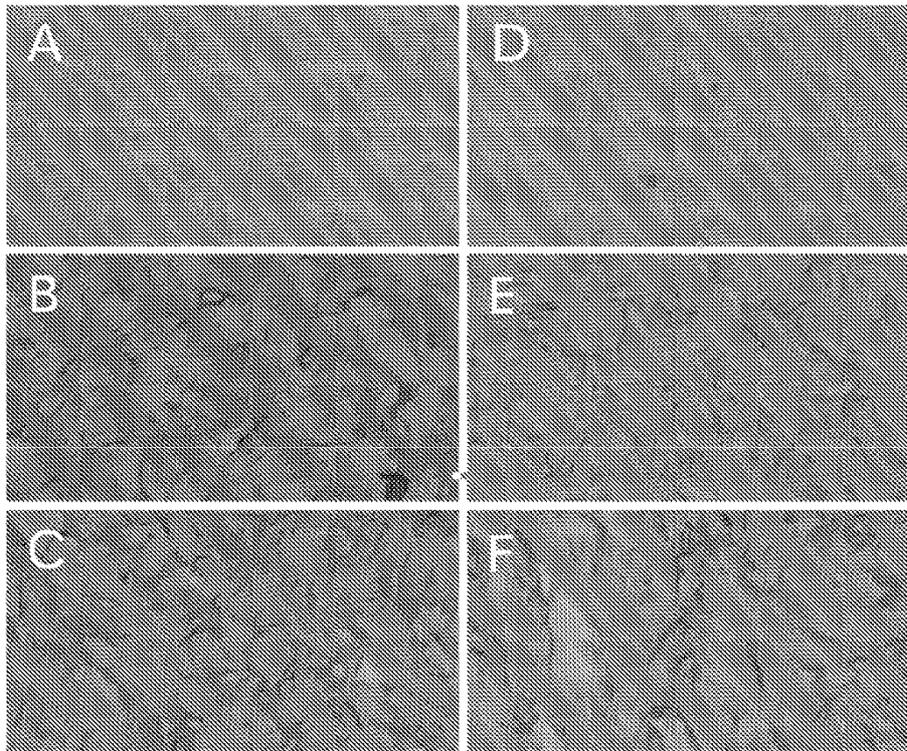


FIG. 2

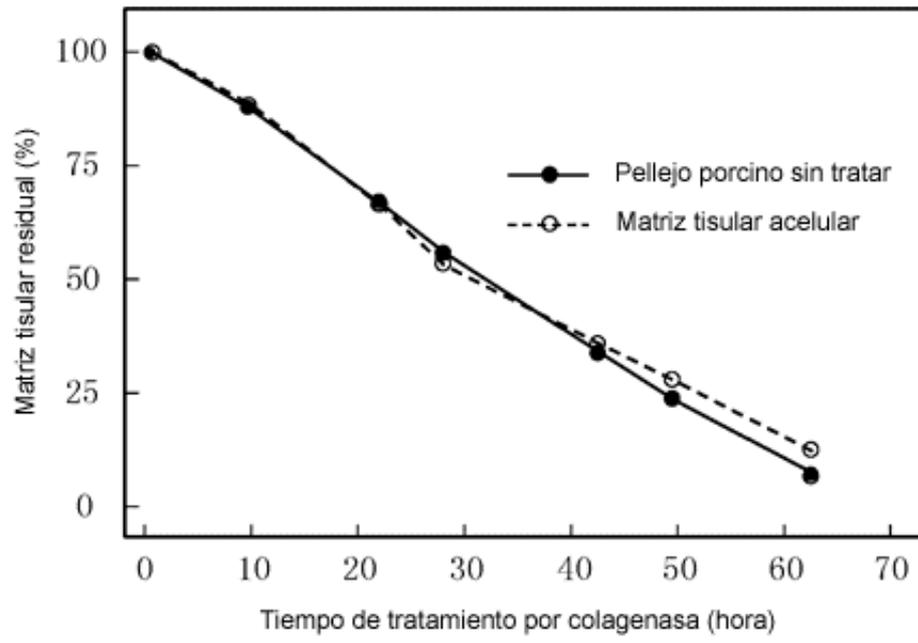


FIG. 3

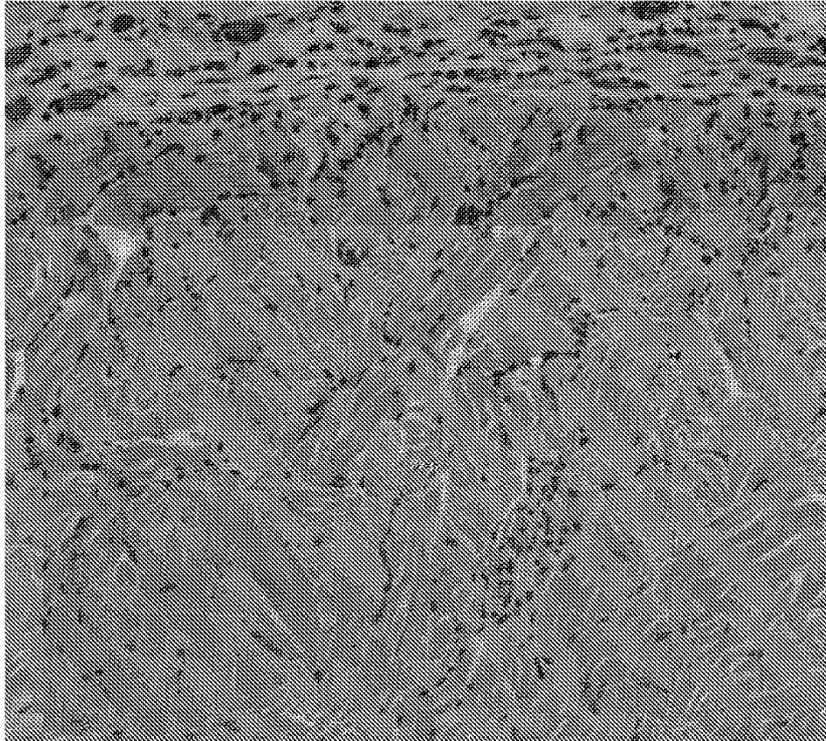


FIG. 4