

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 751 911**

51 Int. Cl.:

<b>A61L 27/36</b>	(2006.01)
<b>A61L 27/54</b>	(2006.01)
<b>A61L 33/00</b>	(2006.01)
<b>A61L 33/18</b>	(2006.01)
<b>A61L 17/00</b>	(2006.01)
<b>A61K 35/32</b>	(2015.01)
<b>A61K 35/34</b>	(2015.01)
<b>A61K 35/36</b>	(2015.01)
<b>A61L 17/08</b>	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.03.2007 PCT/US2007/006716**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **27.09.2007 WO07109180**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.03.2007 E 07753351 (1)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.07.2019 EP 2001521**

54 Título: **Armazones de colágeno estabilizados y esterilizados con aditivos activos unidos**

30 Prioridad:

**17.03.2006 US 743542 P**  
**15.03.2007 US 686859**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**02.04.2020**

73 Titular/es:

**SYNOVIS ORTHOPEDIC AND WOUNDCARE, INC.**  
**(100.0%)**  
**2575 University Avenue West**  
**St Paul, MN 55114 , US**

72 Inventor/es:

**NATARAJ, CHANDRASEKARAN;**  
**RITTER, GREGG y**  
**SANDER, THOMAS**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

ES 2 751 911 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**

Armazones de colágeno estabilizados y esterilizados con aditivos activos unidos

**Antecedentes de la invención**

5 Los bioimplantes de tejidos naturales están ganando aceptación como alternativas ventajosas a los implantes sintéticos en muchos procedimientos quirúrgicos. Entre otras ventajas, los bioimplantes se parecen más en tamaño, forma y rendimiento a las estructuras biológicas para las que están diseñados para reemplazar que los implantes sintéticos. Por lo tanto, los bioimplantes se consideran, en muchas circunstancias, los dispositivos de elección para el reemplazo o el aumento estructural de los tejidos y órganos internos.

10 Las fuentes de bioimplantes incluyen donantes no humanos y humanos. En general, la elección del donante depende de varios factores, incluidos los tamaños relativos del donante y el receptor. Por ejemplo, como alternativa a un cadáver humano, una oveja, cerdo, vaca o caballo pueden servir como un donante. En algunos casos, el donante y el receptor pueden ser el mismo. Las limitaciones inmunogénicas se superan mediante la reticulación de los tejidos para enmascarar moléculas antigénicas en el tejido. La esterilización generalmente se efectúa poniendo en contacto el tejido con un agente químico esterilizante. En muchos casos, los bioimplantes reticulados y esterilizados proporcionan muchas de las características del tejido natural, al tiempo que evitan en gran medida el problema del rechazo del xeno-tejido que es característico de la implantación de tejido vivo.

15 En muchos casos, los bioimplantes ofrecen ventajas adicionales respecto a los implantes sintéticos. Por ejemplo, muchos bioimplantes permiten la infiltración de las propias células del receptor en el bioimplante. En particular, las células infiltrantes pueden usar el bioimplante como plantilla o almacén para reconstruir estructuras de órganos o tejidos que comprenden las propias células del receptor. En algunos casos, todo o parte del bioimplante puede ser reemplazado por las propias células del cuerpo receptor. Este proceso, que se conoce como remodelación, es ventajoso porque puede mejorar la integración del bioimplante en el sitio del implante. Debido a estas ventajas, se considera ventajoso promover la remodelación del tejido del bioimplante.

20 Si bien algunos bioimplantes pueden estimular la remodelación por sí mismos debido a su origen natural y a la posesión de una matriz de colágeno que actúa como un andamiaje para el crecimiento del tejido, a veces se considera ventajoso estimular la remodelación administrando a un receptor del bioimplante uno o más agentes que estimulan el crecimiento del tejido. Por ejemplo, las proteínas morfogénicas óseas (BMP) se han utilizado experimentalmente para promover el crecimiento óseo en la cirugía de fusión vertebral. Por ejemplo, una esponja de colágeno reabsorbible perfundida con proteína morfogénica ósea recombinante-2 (rhBMP-2) ha sido aprobada para su uso en cirugía vertebral. Se cree que la liberación de rhBMP-2 de la esponja estimula la infiltración, la proliferación y la organización de los osteoblastos. Como la esponja de colágeno es reabsorbible, finalmente el tejido hospedador regenerado reemplaza a la esponja. El uso de la esponja de colágeno perfundida con rhBMP-2 en la cirugía vertebral ha quedado acreditado con una tasa muy reducida de fracaso de la cirugía vertebral.

25 A pesar de las mejoras en los resultados quirúrgicos que ya han sido proporcionados por los bioimplantes perfundidos con factor de crecimiento, aún quedan muchos desafíos por superar. Por ejemplo, la perfusión de bioimplantes solo es útil cuando el bioimplante es absorbente, es decir, cuando el remojo del tejido en una solución que contiene el factor de crecimiento hace que haya suficiente factor de crecimiento perfundido en el tejido para estimular el crecimiento del tejido después de haber sido implantado en un receptor. Así, el método de perfusión no se considera efectivo para dispositivos de bioimplante menos porosos como válvulas cardíacas, injertos de piel, tejidos de reparación de tendones, huesos y ligamentos, etc. Otra limitación es que la liberación del factor de crecimiento es por difusión. Si bien la difusión puede ser en algunos casos un método útil de liberación, en otras circunstancias la difusión puede dar como resultado una tasa de liberación inicial demasiado alta y, por lo tanto, una tasa de liberación posterior demasiado baja. Así, una desventaja de la liberación difusiva es que el período de liberación efectivo puede ser más corto de lo deseado, a menos que al comienzo se perfunda un exceso de factor de crecimiento en el bioimplante. Sin embargo, esto puede no ser siempre factible o incluso posible. Además, incluso si fuera posible perfundir un exceso de factor de crecimiento en el bioimplante, una desventaja que surge de este enfoque puede ser que la concentración local del factor de crecimiento puede causar la difusión del factor de crecimiento en el tejido circundante, incluidos los capilares, las venas y las arterias, donde puede provocar efectos nocivos locales o sistémicos. En algunos casos, tal difusión puede incluso dar lugar a un nuevo crecimiento de tejido en un área distal al área donde se desea un nuevo crecimiento.

30 Por lo tanto, existe la necesidad de un dispositivo que supere las limitaciones de la esponja de colágeno perfundida con factor de crecimiento de la técnica anterior. Existe la necesidad de un dispositivo de bioimplante que sea capaz de administrar el factor de crecimiento a un área deseada, en el que el factor de crecimiento se libere del dispositivo de bioimplante a una velocidad menor que la velocidad de liberación difusiva de la esponja de colágeno perfundida con factor de crecimiento de la técnica anterior. Asimismo, existe la necesidad de un dispositivo de bioimplante que tenga asociado un factor de crecimiento que esté sujeto a la degradación del factor de crecimiento en menor grado

que la esponja de colágeno perfundida con factor de crecimiento de la técnica anterior. También existe la necesidad de un dispositivo de bioimplante que tenga asociado un factor de crecimiento que esté unido covalentemente al bioimplante. También existe la necesidad de procesos para fabricar tales dispositivos de bioimplante. Estas y otras necesidades se satisfacen mediante realizaciones de la invención.

- 5 También existe la necesidad de un dispositivo de bioimplante que lleve un aditivo. También existe la necesidad de un dispositivo de bioimplante que sea capaz de administrar un aditivo a un área deseada, en el que el aditivo se libera del bioimplante a una velocidad menor que la tasa de liberación difusiva del aditivo desde una esponja de colágeno perfundida. También existe la necesidad de un dispositivo de bioimplante que tenga asociado un aditivo que esté sujeto a degradación en menor grado que un aditivo en una esponja de colágeno perfundida con aditivo.
- 10 También existe la necesidad de un dispositivo de bioimplante que tenga asociado una molécula de aditivo que esté unido a covalentemente al bioimplante. También existe la necesidad de procesos para fabricar tales dispositivos de bioimplante. Estas y otras necesidades se satisfacen mediante realizaciones de la invención. El documento WO98/46288 se refiere a métodos para la unión activa de heparina para reticular tejidos biológicos. El documento WO96/31157 se refiere a injertos de ICL no antigénicos reticulados con ácido peracético.

## 15 Sumario de la invención

Las necesidades anteriores y adicionales se satisfacen mediante realizaciones de la invención, que proporcionan un proceso de acuerdo con la reivindicación 1. En algunas realizaciones, el bioimplante se esteriliza químicamente con una carbodiimida soluble en agua, tal como EDC. En algunas realizaciones, la esterilización se lleva a cabo en presencia de un potenciador de la penetración, especialmente un potenciador de la penetración soluble en agua que tiene de 1 a aproximadamente 6 átomos de carbono y al menos un grupo polar. En realizaciones preferidas, el potenciador de la penetración es un alcohol, tal como un alcohol C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, especialmente un alcohol C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>, y lo más particularmente isopropanol.

En algunas realizaciones, el tejido biológico comprende tejido nativo, tejido procesado en forma nativa, tejido procesado en forma no nativa, un composite o un complejo de composite. En algunas realizaciones, (1) dicho tejido nativo comprende hueso, tendones, ligamentos, dermis, fascia, pericardio y combinaciones de los mismos, incluyendo combinaciones de hueso-tejido conjuntivo, tales como combinaciones hueso-tendón y combinaciones hueso-ligamento-hueso; (2) dicho tejido procesado en forma nativa comprende tejido reticulado, fragmentos de hueso triturado descelularizado, colágeno descelularizado u otro hueso descelularizado y/o desgrasado, tendones, ligamentos, fascia o combinaciones de hueso-tejido conjuntivo, tales como combinaciones de hueso-ligamento-hueso o hueso-tendón; (3) dicho tejido procesado en forma no nativa, comprende colágeno solubilizado o purificado de tejido conjuntivo, gelatina de mamíferos o pescado o hueso desmineralizado; (4) dichos composites comprenden combinaciones de tejidos nativos, tejidos procesados en forma nativa y/o tejidos procesados en forma no nativa, tales como pericardio con gelatina, hueso con gelatina, colágeno purificado con gelatina o hueso desmineralizado con colágeno solubilizado o purificado; y (5) dicho composite complejo comprende tejido nativo, tejido procesado en forma nativa, tejido procesado en forma no nativa o un composite de tejido nativo, tejido procesado en forma nativa y/o tejido procesado en forma no nativa con un material biocompatible tal como un hidrogel, un alginato y/o quitosano.

En algunas realizaciones, el método incluye dar forma o formar el tejido biológico en forma de sutura, una lámina, una válvula implantable, una esponja implantable o una pasta implantable.

## 40 Breve descripción de los dibujos

Las nuevas características de la invención se exponen con particularidad en las reivindicaciones adjuntas. Se obtendrá una mejor comprensión de las características y ventajas de las realizaciones de la presente invención haciendo referencia a la siguiente descripción detallada que expone realizaciones ilustrativas, en la que se utilizan los principios de la invención y los dibujos adjuntos de los cuales:

- 45 La FIG. 1 muestra tres esquemas de reacción química diferentes para preparar un bioimplante de la presente invención.

La FIG. 2 muestra dos esquemas de reacción química alternativos para preparar un bioimplante de la presente invención.

La FIG. 3 muestra tres esquemas de reacción adicionales de acuerdo con la presente invención.

- 50 La FIG.4 muestra dos esquemas de reacción alternativos adicionales de acuerdo con la presente invención.

Las FIG. 5A-5C son imágenes de microscopía óptica de pericardio Control (FIG. 5A), modificado con GAG parcial (FIG. 5B) y modificado con GAG completo (FIG. 5C). Los cortes de tejido se tiñeron con PAS-azul alcian; Los GAG

se tiñen de azul y el colágeno se tiñe de rosa. Estas figuras muestran la unión exitosa de GAG al tejido pericárdico reticulado y esterilizado por métodos de acuerdo con un ejemplo de referencia.

Las FIG. 6A y 6B son imágenes a pequeño y gran aumento de la esponja de colágeno Tipo 1 en la que el GAG se ha unido a la esponja de colágeno durante la esterilización. Como puede observarse en la FIG. 6A y 6B, la unión del GAG a la esponja de colágeno durante la esterilización conduce a la unión difusa del GAG a la esponja de colágeno.

La FIG. 7A es una imagen de un corte histológico de hueso esponjoso que tiene GAG unido a la misma.

La FIG. 7B es una imagen de un corte histológico de una esponja de colágeno Tipo I que tiene GAG unido a la misma durante la reticulación mediante un método de acuerdo con un ejemplo de referencia.

Las FIG. 8A y 8B son imágenes de cortes histológicos de esponja de colágeno que tienen ácido hialurónico unido a ellas mediante un método de acuerdo con un ejemplo de referencia.

La FIG. 8C es una imagen de un corte histológico de pericardio que tiene ácido hialurónico unido al mismo por un método de acuerdo con un ejemplo de referencia.

La FIG. 8D es un gráfico de resultados de un ensayo ELISA inverso de IGF-I unido a una esponja de colágeno mediante un método de acuerdo con un ejemplo de referencia. La señal ELISA disminuida en el ensayo IGF FX/STER frente al ensayo de control indica que el anticuerpo anti-IGF se ha unido al IGF en la muestra IGF FX/STER, produciendo así una señal ELISA deprimida en la solución de anticuerpo anti-IGF que ha contactado con la muestra IGF FX/STER en comparación con la señal en la solución de anticuerpo anti-IGF que ha contactado con la muestra de control.

La FIG. 9 es un gráfico de los resultados de un ensayo de viabilidad celular. Las esponjas de control y de colágeno con sulfato de condroitina unido se sembraron con condrocitos primarios y se incubaron. La esponja de colágeno sembrada en condrocitos humanos se evaluó el día 7, mientras que la esponja de colágeno sembrada en condrocitos bovinos se evaluó el día 14. Los resultados de un ensayo de viabilidad celular (MTT) demuestran el aumento de la viabilidad celular en la esponja de colágeno con sulfato de condroitina unido (rojo) frente a la esponja de colágeno control (no tratada) (azul).

Las FIG. 10A, 10B y 10C son imágenes de ensayos de MTT de cortes histológicos de esponja de colágeno con GAG unido sembrada en condrocitos de acuerdo con un ejemplo de referencia. Las FIG. 10A y 10B son imágenes a pequeño y gran aumento de una esponja de colágeno con GAG unido tratada con MTT sembrada con condrocitos. Las células viables se tiñen de púrpura y la presencia de una matriz recién sintetizada se ve alrededor de las células como una delgada capa fibrinosa. La FIG. 10C es una imagen de gran aumento de la esponja de colágeno con GAG unido sembrada en condrocitos que muestra la apariencia de una matriz recién sintetizada.

Las FIG. 11A y 11B son cortes histológicos de esponja de celulosa con GAG unido. Se implantaron muestras seleccionadas de esponja de colágeno con GAG unido por vía subcutánea en ratas. Los explantes se recuperaron 4 semanas después y los cortes se tiñeron con PAS-azul alcian (FIG. 11A) o hematoxilina y eosina (H&E; La FIG. 11B). Como puede observarse en la FIG. 11A, el GAG permanece unido a la matriz de celulosa incluso después de 4 semanas, como lo demuestra la tinción azul. La ausencia de inflamación abierta y activa y la aparición de nuevas matrices y vasos sanguíneos entre las cadenas de colágeno de los tejidos (FIG. 11B) indican una respuesta biocompatible del hospedador.

### Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona procesos de fabricación de bioimplantes. En términos generales, los bioimplantes comprenden tejidos biológicos que están esterilizados, preferiblemente esterilizados químicamente, y que tienen moléculas adjuntas unidas covalentemente (conjugadas) a los mismos. De acuerdo con la presente invención, la molécula adjunta es la heparina. Tales bioimplantes tienen ventajas notables sobre los tejidos biológicos de la técnica anterior, tales como la curación de heridas mejorada, la remodelación de tejidos, el crecimiento de tejidos y la regeneración de tejidos. Además, debido a que los aditivos se conjugan con los tejidos biológicos, en algunas realizaciones se liberan a una velocidad que generalmente es menor que la velocidad de difusión del aditivo desde tejidos biológicos similares en los que los aditivos se perfunden simplemente en los tejidos biológicos. Esto es especialmente ventajoso para los factores de crecimiento y otros aditivos que tienen actividad a concentraciones muy bajas, pero que se administran de manera ventajosa durante un largo período de tiempo. Esto también es ventajoso para las moléculas pequeñas, que al ser de bajo peso molecular, se difunden relativamente rápido fuera de los tejidos cuando simplemente se perfunden en los mismos. La conjugación covalente de las moléculas pequeñas al tejido biológico permite una liberación más lenta, más regulada del aditivo, proporcionando así una actividad local efectiva del aditivo durante un período de tiempo más largo. En algunas realizaciones, las moléculas de aditivo retienen la actividad nativa cuando se conjugan con el tejido biológico; y en algunas realizaciones, las

moléculas de aditivo recuperan la actividad nativa cuando se liberan del tejido biológico. Otras ventajas del bioimplante de la presente invención serán evidentes para la persona experta en la materia al considerar la divulgación en el presente documento.

5 Tal como se usa en el presente documento, el término "bioimplante" se refiere a un dispositivo que comprende un tejido biológico que ha sido sometido a una o más etapas del proceso para que sea susceptible de implantación. En general, el bioimplante es un bioimplante esterilizado químicamente que tiene conjugado al menos un aditivo. En realizaciones particulares, el bioimplante se esteriliza químicamente con una carbodiimida soluble en agua, tal como clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC). En algunas realizaciones, el tejido biológico se reticula con un agente de reticulación adecuado, tal como una diamina u otro reactivo de reticulación bifuncional, opcionalmente en presencia de un agente de acoplamiento y/o un potenciador del acoplamiento. La reticulación mediada por carbodiimida se describe en detalle en la patente de los EE. UU. N.º 5.733.339 y en la Solicitud de Patente de los EE. UU. N.º US2004253291. En algunas realizaciones particulares, la invención excluye específicamente los bioimplantes que comprenden tejido biológico que han sido tratados con glutaraldehído, especialmente solución o vapor de glutaraldehído.

15 Los bioimplantes de la presente invención comprenden un tejido biológico que está esterilizado, especialmente esterilizado químicamente. En particular, la presente invención proporciona un bioimplante que comprende un tejido biológico que se ha esterilizado con un agente químico capaz de reducir la población de bacterias y/o esporas en el tejido biológico en al menos 3 log, especialmente al menos aproximadamente 4 log, más especialmente al menos 5 log, y particularmente al menos aproximadamente 6 log. Los ejemplos de agentes esterilizantes incluyen una carbodiimida tal como clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetil aminopropil)carbodiimida (EDC). El uso de EDC como agente esterilizante se describe en detalle por ejemplo, en la patente de los EE. UU. N.º 5.911.951. En algunas realizaciones particulares, la invención excluye específicamente aquellos bioimplantes esterilizados con radiación  $\gamma$ . En otras realizaciones particulares, la invención excluye tejidos esterilizados únicamente con radiación  $\gamma$ .

25 Los bioimplantes de la presente invención tienen unido covalentemente a ellos al menos una "molécula de aditivo", también denominada en el presente documento simplemente como "aditivo". De acuerdo con la presente invención, esta al menos una molécula de aditivo es la heparina. La molécula de aditivo es una molécula no endógena que promueve la cicatrización, la remodelación, el crecimiento o la regeneración de tejidos en el cuerpo receptor. La molécula de aditivo ejercer esta actividad de cicatrización, la remodelación, el crecimiento o regeneración del tejido en el estado conjugado (es decir, mientras está unida al bioimplante) o al liberarse en el entorno inmediato del bioimplante. La molécula de aditivo no es endógena en el sentido de que está fuera del cuerpo del receptor del bioimplante cuando se conjuga con y se convierte en parte de, el bioimplante. Por lo tanto, las moléculas de aditivo excluyen específicamente los factores de crecimiento y otras moléculas que están dentro del cuerpo del receptor del bioimplante en el momento de la implantación y se unen covalentemente al bioimplante solo de manera incidental y solo durante o después de la implantación del bioimplante. Sin embargo, las moléculas de aditivo incluyen específicamente moléculas del interior del cuerpo del receptor previsto que se aíslan, purifican o se tratan de otra manera para mejorar su concentración, pureza, actividad o una combinación de las mismas, antes de ser conjugadas con el tejido biológico fuera del cuerpo del receptor.

40 Tal como se usa en el presente documento, los términos "conjugado" y "unido" y sus diversas formas lingüísticas, significan que el aditivo está unido covalentemente al tejido biológico, ya sea directa o indirectamente. Una unión covalente directa entre el aditivo y el tejido biológico es un enlace covalente formado entre una cadena lateral del tejido biológico y una cadena lateral del aditivo. Un enlace covalente indirecto se forma a través de un "enlazador" intermedio. El enlazador es un resto, que es el resto de una molécula multifuncional (por ejemplo, bifuncional) capaz de formar enlaces covalentes con cadenas laterales tanto del tejido biológico como del aditivo. Así, un enlace covalente indirecto entre el aditivo y el tejido biológico es un enlace covalente que comprende un primer enlace covalente entre una cadena lateral del aditivo y un grupo reactivo en un resto de enlace y un segundo enlace covalente entre el resto de enlace y una cadena lateral del tejido biológico. Los enlaces covalentes adecuados se forman como amidas, ésteres, éteres, ureas, carbamatos, carbonatos, anhídridos y otros enlaces covalentes. Los enlaces covalentes especialmente adecuados son las amidas. Una amida se puede formar directamente entre un grupo ácido de un aditivo y una amina de una proteína o glicosamina del tejido biológico o entre una amina de un aditivo y un grupo ácido de una proteína en el tejido biológico. Se puede formar un enlace covalente indirecto que comprende, por ejemplo, a través de un conector diácido, un enlazador de aminoácidos o un enlazador de diamina usando un agente de conjugación.

55 En algunos ejemplos de referencia, los aditivos son proteínas, péptidos pequeños, ácido ribonucleico (ARN), ácido desoxirribonucleico (ADN), polisacáridos, proteoglicanos, glucosaminoglicanos (GAG)<sub>5</sub> tal como hialuronano, sulfato de condroitina, queratín sulfato, dermatán sulfato, heparina o sulfato de heparán o antibióticos, como se describe con mayor detalle a continuación. La fuente de tales aditivos puede ser tejidos biológicos (especialmente en el caso de proteínas, péptidos pequeños, ARN y ADN), cultivos celulares (especialmente en el caso de proteínas recombinantes, péptidos pequeños, ARN, ADN y antibióticos) o fuentes sintéticas (especialmente en el caso de ciertos antibióticos y ARN pequeño, ADN y péptidos). Los aditivos promueven la cicatrización, la remodelación, el crecimiento o la regeneración de tejidos mientras están unidos al bioimplante (estado conjugado), después de la

liberación del bioimplante o ambos.

En algunos ejemplos de referencia, el bioimplante comprende un aditivo que es una proteína, especialmente un factor de crecimiento o un proteoglicano. Los factores de crecimiento adecuados que se pueden mencionar incluyen todos los miembros de la superfamilia del factor de crecimiento transformante (TGF), incluyendo BMP-2, BMP-4, BMP-7 y BMP-13, etc. Otras proteínas adecuadas incluyen los proteoglucanos, incluidos los proteoglucanos que tienen asociados glucosaminoglucanos (GAG), tales como hialuronano, sulfato de condroitina, queratín sulfato, dermatán sulfato, heparina (presente invención) o sulfato de heparán.

En algunos ejemplos de referencia, la molécula de aditivo es un ácido desoxirribonucleico (ADN), un ácido ribonucleico (ARN) o un imitador de ADN o ARN. Los ácidos desoxirribonucleicos incluyen genes y fragmentos de genes, así como moléculas antisentido capaces de unirse y silenciar y/o regular uno o más genes, como un gen bacteriano o viral. Los ácidos ribonucleicos incluyen ARN pequeños de interferencia (ARNpi) y microARN, así como versiones estructuralmente modificadas de ARNpi y microARN, como un gen bacteriano o viral, que son capaces de silenciar un gen, como un gen bacteriano o viral. El ARN y el ADN también incluyen uno o más plásmidos capaces de invadir una bacteria y expresar un producto génico que es bacteriostático o que es letal para la bacteria o un virus. El ADN y el ARN también incluyen plásmidos capaces de expresar ARNpi o microARN que silencian y/o regulan uno o más genes en una bacteria o en un virus, una bacteria coinfectante u otro microbio patógeno. En ejemplos de referencia particulares, los aditivos ADN y ARN se activan *in vivo* después de que se rompen las conjugaciones entre el ADN o ARN y el bioimplante, p.ej., por hidrólisis de uno o más enlaces covalentes entre el ADN o ARN y el tejido biológico. En algunos ejemplos de referencia, el ADN o ARN está activo mientras está conjugado con el tejido biológico.

En algunos ejemplos de referencia, la molécula de aditivo es un antibiótico. Debido a que los aditivos están covalentemente conjugados con los tejidos biológicos, se liberan al medio ambiente solo tras la escisión del enlace covalente, p.ej., por hidrólisis. Esto proporciona la liberación del antibiótico a una velocidad que en algunos casos es más lenta que la velocidad de liberación difusiva de una cantidad similar de antibiótico libre o antibiótico perfundido en un tejido. Los aditivos antibióticos adecuados incluyen aminoglucósidos, los anfenicoles, las ansamicinas, las  $\beta$ -lactamas, las lincosamidas, los macrólidos, los antibióticos polipéptidos, las tetraciclinas, cicloserina, mupirocina, tuberina, 2,4-diaminopiridinas, los nitrofuranos, las quinolonas, las sulfonamidas, las sulfonas, clofocetol, hexedina, metenammina, nitroxolina, taurolidina y xibernol. Los antibióticos ejercen su acción de cicatrización, remodelación, crecimiento o regeneración de tejidos al interferir con el crecimiento bacteriano en las proximidades del bioimplante después de que se haya implantado en el cuerpo receptor. En particular, Los antibióticos ejercen su acción de cicatrización, remodelación, al ejercer efectos bactericidas o bacteriostáticos sobre las bacterias en la vecindad del bioimplante. Algunos de estos antibióticos son bactericidas o bacteriostáticos mientras están conjugados con el bioimplante. Otros antibióticos de este tipo se activan a un estado bactericida o bacteriostático después de que se rompen las conjugaciones entre los antibióticos y el tejido, p.ej. hidrolizando uno o más enlaces amida, éster, urea o anhídrido entre los antibióticos y el bioimplante. Algunas ventajas de usar tejidos biológicos conjugados con antibióticos como bioimplantes incluyen las siguientes: la concentración local de antibiótico puede ser alta, mientras que la concentración sistémica permanece baja, localizando así el efecto antibacteriano del antibiótico y reduciendo la toxicidad sistémica; la liberación lenta de antibiótico del tejido biológico conserva la actividad antibacteriana durante un largo período de tiempo; efecto nocivo reducido sobre las bacterias comensales no patógenas, especialmente en el intestino; y la inducción potencialmente reducida de resistencia a antibióticos en bacterias.

### Tejidos biológicos

La presente invención proporciona bioimplantes que comprenden tejidos biológicos esterilizados que se han conjugado una o más moléculas de aditivo. Los tejidos biológicos adecuados son aquellos tejidos susceptibles de implantación en un cuerpo hospedador para reparar o reemplazar tejido huésped dañado o extirpado o para promover la cicatrización, la remodelación, el crecimiento o la regeneración del tejido hospedador. En algunas realizaciones, el tejido biológico es tejido nativo, un tejido procesado en forma nativa, un tejido procesado en forma no nativa, un composite o un complejo de composite. Los tejidos pueden ser de origen autógeno, alógeno o xenógeno. La expresión "tejido nativo" significa que el tejido a partir del cual se prepara el implante ("tejido inicial") no se procesa antes de conjugarse al aditivo al mismo. En particular, el "tejido nativo" no está desgrasado, descelularizado o reticulado antes de conjugarse al aditivo al mismo. Los tejidos nativos adecuados incluyen hueso, tendones, ligamentos, dermis, fascia, pericardio y combinaciones de los mismos, tales como combinaciones hueso-tejido conjuntivo, que incluyen combinaciones hueso-tendón y hueso-ligamento-hueso. La expresión "tejido procesado en forma nativa" significa que el tejido de partida se somete a una o más etapas de procesamiento, tales como descelularización, desgrasado o reticulación antes de la conjugación del aditivo al tejido, pero por lo demás permanece sustancialmente en la misma forma que en el tejido nativo. Los tejidos procesados adecuados en forma nativa incluyen tejido reticulado, fragmentos de hueso triturado descelularizado, colágeno descelularizado u otro hueso descelularizado y/o desgrasado, tendones, ligamentos, fascia y combinaciones de los mismos, tales como combinaciones hueso-tejido conjuntivo, p.ej., combinaciones hueso-tendón o hueso-ligamento-hueso. La expresión "tejido procesado en forma no nativa" significa tejido que ha sido procesado de tal manera que el tejido ya no está en su forma nativa, p.ej., mediante solubilización, reconstitución o algún otro proceso que cambia su forma de su forma

nativa. Los tejidos procesados adecuados en forma no nativa incluyen colágeno solubilizado o purificado de tejido conjuntivo, gelatina de mamíferos o peces o hueso desmineralizado. Un "composite" es una combinación de dos o más miembros del grupo de tejidos nativos, tejidos procesados en forma nativa y tejidos procesados en forma no nativa. Composites adecuados incluyen combinaciones de tejidos nativos, tejidos procesados en forma nativa y/o tejidos procesados en forma no nativa, tales como pericardio, con gelatina, hueso con gelatina, colágeno purificado con gelatina o hueso desmineralizado con colágeno solubilizado o purificado. Un "composite complejo" es una combinación de uno o más tejidos nativos, tejidos procesados en forma nativa, tejidos procesados en forma no nativa y composites con un material biocompatible, como un material sintético o un material biocompatible que no es de mamífero (por ejemplo, crustáceos o derivados de plantas). El composite complejo adecuado comprende tejido nativo, tejido procesado en forma nativa, tejido procesado en forma no nativa o un composite de tejido nativo, tejido procesado en forma nativa y/o tejido procesado en forma no nativa con un material biocompatible tal como un hidrogel, un alginato y/o quitosano.

El tejido puede descelularizarse mediante un método reconocido en la técnica, como el tratamiento con tripsina o dodecilsulfato de sodio (SDS). Rieder et al., "Decellularization protocols of porcine heart valves differ importantly in efficiency of cell removal and susceptibility of the matrix to recellularization with human vascular cells", *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 127, 399-405 (2004); Kasimir et al., "Comparison of different decellularization procedures of porcine heart valves", *Int. J. Artif. Organs*, 26(5), 421-427 (2003). En algunas realizaciones, el tratamiento con SDS deja algunas células en el armazón. Reider et al., 2003. En algunas realizaciones, tales células residuales o fragmentos de células pueden no ser perjudiciales, ya que se esperaría que la reticulación y/o la esterilización neutralizaran tales estructuras residuales. En cualquier caso, si el tratamiento con tripsina y/o SDS no produce un material de partida adecuado, la descelularización se puede efectuar con otro método de descelularización conocido, tal como el tratamiento con una combinación de *terc-octilfenilpolioxietileno* y desoxicolato de sodio (Rieder et al., 2003) o un detergente no iónico, tal como Triton-X 100 (Kasimir, 2003). El experto en la materia reconocerá que pueden emplearse otros métodos de descelularización y, por lo tanto, están dentro del alcance de la presente invención.

El tejido óseo, como el hueso sólido y los fragmentos óseos, se pueden desmineralizar mediante un método reconocido en la técnica. Tal desmineralización puede realizarse conjuntamente con, o independientemente de, la descelularización como se describió anteriormente. Dicha desmineralización puede ser parcial o completa. La desmineralización parcial a menudo se usa para modificar los injertos de hueso cortical para mejorar sus propiedades osteoinductoras. Danilchenko et al., "X-ray diffraction studies of bone apatite under acid demineralization", *Cryst. Res. Technol.*, 39(1), 71-77 (2004). El tejido óseo también puede desmineralizarse mediante el tratamiento con un ácido débil, tal como ácido acético. La desmineralización elimina el contenido mineral (como el carbonato de calcio) del hueso, dejando agentes osteoinductores intactos en la matriz ósea desmineralizada. Laurencin, "Bone Graft Substitute Materials", eMedicine (disponible solo a través de Internet), <http://www.emedicine.com/orthop/topic611.htm>, actualizado el 15 de marzo de 2005. Se ha demostrado que la matriz ósea desmineralizada induce la formación de hueso nuevo *in vivo*. Salih et al., "Natural variation in the extent of phosphorylation of bone phosphoproteins as a function of *in vivo* new bone formation induced by demineralized bone matrix in soft tissue and bony environments", *Biochemical Journal*, 364, 465-474 (2002), entrada a <http://www.biochemj.org/364/0465/bj3640465.htm>. Así, el tejido óseo, como el hueso entero o los fragmentos óseos, pueden desmineralizarse en presencia de una solución de ácido débil, como HCl 0,05 a 0,5 M u otro ácido mineral, o en presencia de un ácido débil como el ácido acético. El hueso resultante parcialmente desmineralizado o la matriz ósea completamente desmineralizada (DBM) puede conjugarse con una molécula de aditivo y esterilizarse y reticularse opcionalmente como se describe con más detalle a continuación.

#### Bioimplantes

La invención proporciona un bioimplante que comprende un tejido biológico esterilizado químicamente y al menos un aditivo, en el que el aditivo se conjuga covalentemente al tejido biológico. En algunas realizaciones, el bioimplante se esteriliza químicamente con una carbodiimida soluble en agua, tal como EDC. En algunas realizaciones, la esterilización se lleva a cabo en presencia de un potenciador de la penetración, especialmente un potenciador de la penetración soluble en agua que tiene de 1 a aproximadamente 6 átomos de carbono y al menos un grupo polar. En realizaciones preferidas, el potenciador de la penetración es un alcohol, tal como un alcohol C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, especialmente un alcohol C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>, y lo más particularmente isopropanol. Otros alcoholes que se pueden mencionar en este sentido incluyen metanol, etanol, n-propanol, n-butanol, i-butanol, t-butanol, y s-butanol, así como n-pentanol, n-hexanol, ciclopropanol, ciclobutanol, ciclopentanol y ciclohexanol. En algunas realizaciones, el tejido biológico esterilizado químicamente también se reticula con una carbodiimida, en presencia de un agente de reticulación divalente y/o un potenciador del acoplamiento, tal como N-hidroxisuccinimida (NHS) o N-hidroxi-2-sulfosuccinimida (Sulfo-NHS).

El tejido biológico utilizado en los bioimplantes puede comprender tejido nativo, tejido procesado en forma nativa, tejido procesado en forma no nativa, un composite o un complejo de composite. En realizaciones preferidas, el tejido biológico es un tejido nativo, un tejido procesado en forma no nativa o un composite. En realizaciones particulares, el tejido biológico es un tejido nativo, que comprende hueso, tendones, ligamentos, dermis, fascia, pericardio o combinaciones de los mismos, incluyendo combinaciones de hueso-tejido conjuntivo, tales como combinaciones

- hueso-tendón y combinaciones hueso-ligamento-hueso. En otras realizaciones, el tejido biológico es un tejido procesado en forma nativa, que comprende tejido reticulado, fragmentos de hueso triturado descelularizado, colágeno descelularizado u otro hueso descelularizado y/o desgrasado, tendones, ligamentos, fascia y combinaciones de hueso-tejido conjuntivo, tales como combinaciones de hueso-ligamento-hueso o hueso-tendón.
- 5 En otras realizaciones, el tejido biológico es tejido procesado en forma no nativa, que comprende colágeno solubilizado o purificado de tejido conjuntivo, gelatina de mamíferos o peces o hueso desmineralizado. En otras realizaciones adicionales, dicho tejido comprende un material composite, que comprende combinaciones de tejidos nativos, tejidos procesados en forma nativa y/o tejidos procesados en forma no nativa, tales como pericardio con gelatina, hueso con gelatina, colágeno purificado con gelatina o hueso desmineralizado, con colágeno solubilizado o purificado.
- 10 En otras realizaciones adicionales, el tejido biológico es un tejido composite complejo, que comprende tejido nativo, tejido procesado en forma nativa, tejido procesado en forma no nativa o un composite de tejido nativo, tejido procesado en forma nativa y/o tejido procesado en forma no nativa con un material biocompatible tal como un hidrogel, un alginato y/o quitosano. En realizaciones preferidas, la invención proporciona un bioimplante, en el que el tejido biológico comprende colágeno, colágeno purificado o colágeno solubilizado.
- 15 En algunos ejemplos de referencia, el aditivo es una proteína, un péptido pequeño, un ácido ribonucleico, un ácido desoxirribonucleico, un polisacárido, glucosaminoglucano (GAG), glucosaminoglucano (GAG) o un antibiótico. En realizaciones particulares, el aditivo comprende: (1) uno o más proteoglicanos, glucosaminoglucanos, factores de crecimiento, que incluyen cualquier miembro de la superfamilia del factor de crecimiento transformante (TGF) y proteoglicanos; (3) un ácido desoxirribonucleico; (4) ácido ribonucleico, tal como un ARN pequeño de interferencia o microARN; (3) un antibiótico seleccionado de aminoglucósidos, los anfenicoles, las ansamicinas, las  $\beta$ -lactamas, las lincosamidas, los macrólidos, los antibióticos polipéptidos, las tetraciclinas, cicloserina, mupirocina, tuberina, 2,4-diaminopiridinas, los nitrofuranos, las quinolonas, las sulfonamidas, las sulfonas, clofocetol, hexedina, metenamina, nitroxolina, taurolidina y xibernol. En realizaciones particulares, la invención proporciona un bioimplante, en el que el aditivo comprende: (1) uno o más proteoglicanos o glucosaminoglucanos, (2) una o más proteínas, tales como: (a) cualquier miembro de la superfamilia del factor de crecimiento transformante (TGF), tales como BMP-2, BMP-4 y BMP-7, el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ); (b) factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF); (c) factor de crecimiento de fibroblastos (FGF); (d) factores de crecimiento similares a la insulina (IGF); (e) factores de crecimiento derivados del cartílago (CDGF); (3) un ácido desoxirribonucleico seleccionado de genes, fragmentos de genes y ADN antisentido; (4) ácido ribonucleico tal como un ARN pequeño de interferencia (ARNpi) o un microARN; o (5) un antibiótico, tales como uno o más aminoglucósidos, anfenicoles, ansamicinas,  $\beta$ -lactamas, lincosamidas, macrólidos, antibióticos polipéptidos, tetraciclinas, cicloserina, mupirocina, tuberina, 2,4-diaminopiridinas, nitrofuranos, quinolonas, sulfonamidas, sulfonas, clofocetol, hexedina, metenamina, nitroxolina, taurolidina y xibernol. En las realizaciones particularmente preferidas, el bioimplante está en forma de una sutura, una lámina, una válvula implantable, una esponja implantable o una pasta implantable.
- 20
- 25
- 30
- 35 En realizaciones preferidas de la invención, el aditivo retiene al menos algo de su actividad nativa cuando se conjuga con el tejido biológico. En otras realizaciones preferidas, el aditivo se libera en condiciones *in vivo* o *in vitro* diseñadas para imitar las condiciones *in vivo*. En dichas realizaciones preferidas, el aditivo liberado tiene al menos algo de su actividad nativa. Tal como se usa en el presente documento, la expresión "al menos algo de" significa al menos aproximadamente 5 %. Así, en realizaciones de la invención, el aditivo conjugado tiene al menos el 5 %, al menos el 10 %, al menos el 15 %, al menos el 20 %, al menos el 25 %, al menos el 30 %, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, en particular aproximadamente del 5 a aproximadamente el 100 %, de aproximadamente el 10 a aproximadamente el 95 %, de aproximadamente el 15 a aproximadamente el 90 %, o de aproximadamente el 20 a aproximadamente el 80 % de su actividad nativa, ya sea unido al tejido biológico o cuando se libera del tejido biológico en el tejido circundante *in vivo* o en un entorno *in vitro* diseñado para simular el entorno *in vivo*. Como se usa en el presente documento, la expresión "actividad nativa" significa la actividad que posee el aditivo antes de ser conjugado con el tejido biológico. En general, la actividad nativa se ensaya en condiciones *in vivo* o en condiciones *in vitro* diseñadas para simular las condiciones *in vivo*.
- 40
- 45

#### Proceso general

- En algunas realizaciones, el bioimplante se esteriliza químicamente con una carbodiimida soluble en agua, tal como EDC. En algunas realizaciones, la esterilización se lleva a cabo en presencia de un potenciador de la penetración, especialmente un potenciador de la penetración soluble en agua que tiene de 1 a aproximadamente 6 átomos de carbono y al menos un grupo polar. En realizaciones preferidas, el potenciador de la penetración es un alcohol, tal como un alcohol  $C_1$ - $C_6$ , especialmente un alcohol  $C_2$ - $C_4$ , y lo más particularmente isopropanol. Otros alcoholes que se pueden mencionar en este sentido incluyen metanol, etanol, n-propanol, n-butanol, i-butanol, t-butanol, y s-butanol, así como n-pentanol, n-hexanol, ciclopropanol, ciclobutanol, ciclopentanol y ciclohexanol. En algunas realizaciones, el tejido biológico esterilizado químicamente también se reticula con una carbodiimida, opcionalmente en presencia de un agente de reticulación divalente y/o un potenciador del acoplamiento, tal como N-hidroxisuccinimida (NHS) o N-hidroxi-2-sulfosuccinimida (Sulfo-NHS).
- 50
- 55

- El tejido biológico puede comprender tejido nativo, tejido procesado en forma nativa, tejido procesado en forma no nativa, un composite o un complejo de composite. En realizaciones particulares, el tejido biológico es un tejido
- 60

nativo, que comprende hueso, tendones, ligamentos, dermis, fascia, pericardio o combinaciones de los mismos, incluyendo combinaciones de hueso-tejido conjuntivo, tales como combinaciones hueso-tendón y combinaciones hueso-ligamento-hueso. En otras realizaciones, el tejido biológico es un tejido procesado en forma nativa, que comprende tejido reticulado, fragmentos de hueso triturado descelularizado, colágeno descelularizado u otro hueso descelularizado y/o desgrasado, tendones, ligamentos, fascia y combinaciones de hueso-tejido conjuntivo, tales como combinaciones de hueso-ligamento-hueso o hueso-tendón. En otras realizaciones, el tejido biológico es tejido procesado en forma no nativa, que comprende colágeno solubilizado o purificado de tejido conjuntivo, gelatina de mamíferos o peces o hueso desmineralizado. En otras realizaciones adicionales, dicho tejido comprende un material composite, que comprende combinaciones de tejidos nativos, tejidos procesados en forma nativa y/o tejidos procesados en forma no nativa, tales como pericardio con gelatina, hueso con gelatina, colágeno purificado con gelatina o hueso desmineralizado, con colágeno solubilizado o purificado. En otras realizaciones adicionales, el tejido biológico es un tejido composite complejo, que comprende tejido nativo, tejido procesado en forma nativa, tejido procesado en forma no nativa o un composite de tejido nativo, tejido procesado en forma nativa y/o tejido procesado en forma no nativa con un material biocompatible tal como un hidrogel, un alginato y/o quitosano. En realizaciones preferidas, el tejido biológico comprende colágeno, colágeno purificado o colágeno solubilizado.

En algunos ejemplos de referencia, el aditivo es una proteína, un péptido pequeño, un ácido ribonucleico, un ácido desoxirribonucleico, un polisacárido, glucosaminoglucano (GAG) o un antibiótico. En ejemplos de referencia particulares, el aditivo comprende: (1) uno o más proteoglicanos, glucosaminoglucanos, factores de crecimiento, que incluyen cualquier miembro de la superfamilia del factor de crecimiento transformante (TGF) y proteoglicanos; (3) un ácido desoxirribonucleico; (4) ácido ribonucleico, tal como un ARN pequeño de interferencia o microARN; (3) un antibiótico seleccionado de aminoglucósidos, los anfenicoles, las ansamicinas, las  $\beta$ -lactamas, las lincosamidas, los macrólidos, los antibióticos polipéptidos, las tetraciclinas, cicloserina, mupirocina, tuberina, 2,4-diaminopiridinas, los nitrofuranos, las quinolonas, las sulfonamidas, las sulfonas, clofoctol, hexedina, metenamina, nitroxolina, taurolidina y xibernol. En ejemplos de referencia particulares, la invención proporciona un bioimplante, en el que el aditivo comprende: (1) uno o más proteoglicanos o glucosaminoglucanos, (2) una o más proteínas, tales como: (a) cualquier miembro de la superfamilia del factor de crecimiento transformante (TGF), tales como BMP-2, BMP-4 y BMP-7, el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ); (b) factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF); (c) factor de crecimiento de fibroblastos (FGF); (d) factores de crecimiento similares a la insulina (IGF); (e) factores de crecimiento derivados del cartílago (CDGF); (3) un ácido desoxirribonucleico seleccionado de genes, fragmentos de genes y ADN antisentido; (4) ácido ribonucleico tal como un ARN pequeño de interferencia (ARNpi) o un microARN; o (5) un antibiótico, tales como uno o más aminoglucósidos, anfenicoles, ansamicinas,  $\beta$ -lactamas, lincosamidas, macrólidos, antibióticos polipéptidos, tetraciclinas, cicloserina, mupirocina, tuberina, 2,4-diaminopiridinas, nitrofuranos, quinolonas, sulfonamidas, sulfonas, clofoctol, hexedina, metenamina, nitroxolina, taurolidina y xibernol. En las realizaciones particularmente preferidas, el bioimplante está en forma de una sutura, una lámina, una válvula implantable, una esponja implantable o una pasta implantable. En algunas realizaciones, el proceso comprende además conformar o formar el tejido biológico en forma de una sutura, una lámina, una válvula implantable, una esponja implantable o una pasta implantable.

En realizaciones preferidas de la invención, el aditivo retiene al menos algo de su actividad nativa cuando se conjuga con el tejido biológico. En otras realizaciones preferidas, el aditivo se libera en condiciones *in vivo* o *in vitro* diseñadas para imitar las condiciones *in vivo*. En dichas realizaciones preferidas, el aditivo liberado tiene al menos algo de su actividad nativa. En algunas realizaciones del presente proceso, el aditivo conjugado tiene al menos el 5 %, al menos el 10 %, al menos el 15 %, al menos el 20 %, al menos el 25 %, al menos el 30 %, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, en particular aproximadamente del 5 a aproximadamente el 100 %, de aproximadamente el 10 a aproximadamente el 95 %, de aproximadamente el 15 a aproximadamente el 90 %, o de aproximadamente el 20 a aproximadamente el 80 % de su actividad nativa, ya sea unido al tejido biológico o cuando se libera del tejido biológico en el tejido circundante *in vivo* o en un entorno *in vitro* diseñado para simular el entorno *in vivo*.

#### Liofilización - Variante 1: Adición del aditivo antes de la congelación

En algunas realizaciones, el aditivo (heparina) se añade antes de la congelación. En algunas realizaciones, el bioimplante se esteriliza químicamente con una carbodiimida soluble en agua, tal como EDC. En algunas realizaciones, la esterilización se lleva a cabo en presencia de un potenciador de la penetración, especialmente un potenciador de la penetración soluble en agua que tiene de 1 a aproximadamente 6 átomos de carbono y al menos un grupo polar. En realizaciones preferidas, el potenciador de la penetración es un alcohol, tal como un alcohól C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, especialmente un alcohól C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>, y lo más particularmente isopropanol. Otros alcoholes que se pueden mencionar en este sentido incluyen metanol, etanol, n-propanol, n-butanol, i-butanol, t-butanol, y s-butanol, así como n-pentanol, n-hexanol, ciclopropanol, ciclobutanol, ciclopentanol y ciclohexanol. El tejido biológico esterilizado químicamente también se reticula con una carbodiimida, opcionalmente en presencia de un agente de reticulación divalente y/o un potenciador del acoplamiento, tal como N-hidroxisuccinimida (NHS) o N-hidroxi-2-sulfosuccinimida (Sulfo-NHS).

El tejido biológico puede comprender tejido nativo, tejido procesado en forma nativa, tejido procesado en forma no

nativa, un composite o un complejo de composite. En realizaciones preferidas, el tejido biológico es un tejido nativo o un composite. En realizaciones particulares, el tejido biológico es un tejido nativo, que comprende hueso, tendones, ligamentos, dermis, fascia, pericardio o combinaciones de los mismos, incluyendo combinaciones de hueso-tejido conjuntivo, tales como combinaciones hueso-tendón y combinaciones hueso-ligamento-hueso. En otras realizaciones, dicho tejido comprende un material composite, que comprende combinaciones de tejidos nativos, tejidos procesados en forma nativa y/o tejidos procesados en forma no nativa, tales como pericardio con gelatina, hueso con gelatina, colágeno purificado con gelatina o hueso desmineralizado, con colágeno solubilizado o purificado. En algunas realizaciones preferidas, la invención proporciona un bioimplante, en el que el tejido biológico comprende colágeno, colágeno purificado o colágeno solubilizado.

En algunos ejemplos de referencia, el aditivo es una proteína, un péptido pequeño, un ácido ribonucleico, un ácido desoxirribonucleico, un polisacárido, glucosaminoglucano (GAG) o un antibiótico. En ejemplos de referencia particulares, el aditivo comprende: (1) uno o más proteoglicanos, glucosaminoglucanos, factores de crecimiento, que incluyen cualquier miembro de la superfamilia del factor de crecimiento transformante (TGF) y proteoglicanos; (3) un ácido desoxirribonucleico; (4) ácido ribonucleico, tal como un ARN pequeño de interferencia o microARN; (3) un antibiótico seleccionado de aminoglucósidos, los anfenicoles, las ansamicinas, las  $\beta$ -lactamas, las lincosamidas, los macrólidos, los antibióticos polipéptidos, las tetraciclinas, cicloserina, mupirocina, tuberina, 2,4-diaminopiridinas, los nitrofuranos, las quinolonas, las sulfonamidas, las sulfonas, clofoctol, hexedina, metenamina, nitroxolina, taurolidina y xibernol. En particular un ejemplo de referencia proporciona un bioimplante, en el que el aditivo comprende: (1) uno o más proteoglicanos o glucosaminoglucanos, (2) una o más proteínas, tales como: (a) cualquier miembro de la superfamilia del factor de crecimiento transformante (TGF), tales como BMP-2, BMP-4 y BMP-7, el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ); (b) factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF); (c) factor de crecimiento de fibroblastos (FGF); (d) factores de crecimiento similares a la insulina (IGF); (e) factores de crecimiento derivados del cartílago (CDGF); (3) un ácido desoxirribonucleico seleccionado de genes, fragmentos de genes y ADN antisentido; (4) ácido ribonucleico tal como un ARN pequeño de interferencia (ARNpi) o un microARN; o (5) un antibiótico, tales como uno o más aminoglucósidos, anfenicoles, ansamicinas,  $\beta$ -lactamas, lincosamidas, macrólidos, antibióticos polipéptidos, tetraciclinas, cicloserina, mupirocina, tuberina, 2,4-diaminopiridinas, nitrofuranos, quinolonas, sulfonamidas, sulfonas, clofoctol, hexedina, metenamina, nitroxolina, taurolidina y xibernol.

En las realizaciones particularmente preferidas, el bioimplante está en forma de una sutura, una lámina, una válvula implantable, una esponja implantable o una pasta implantable. En algunas realizaciones, el proceso comprende además conformar o formar el tejido biológico en forma de una sutura, una lámina, una válvula implantable, una esponja implantable o una pasta implantable.

En realizaciones preferidas de la invención, el aditivo retiene al menos algo de su actividad nativa cuando se conjuga con el tejido biológico. En otras realizaciones preferidas, el aditivo se libera en condiciones *in vivo* o *in vitro* diseñadas para imitar las condiciones *in vivo*. En dichas realizaciones preferidas, el aditivo liberado tiene al menos algo de su actividad nativa. En algunas realizaciones de la invención, el aditivo conjugado tiene al menos el 5 %, al menos el 10 %, al menos el 15 %, al menos el 20 %, al menos el 25 %, al menos el 30 %, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, en particular aproximadamente del 5 a aproximadamente el 100 %, de aproximadamente el 10 a aproximadamente el 95 %, de aproximadamente el 15 a aproximadamente el 90 %, o de aproximadamente el 20 a aproximadamente el 80 % de su actividad nativa, ya sea unido al tejido biológico o cuando se libera del tejido biológico en el tejido circundante *in vivo* o en un entorno *in vitro* diseñado para simular el entorno *in vivo*.

#### Liofilización - Variante 2: Adición del aditivo con agente esterilizante

En algunas realizaciones, el aditivo (heparina) se añade con agente esterilizante (después de la congelación/liofilización). En algunas realizaciones, el bioimplante se esteriliza químicamente con una carbodiimida soluble en agua, tal como EDC. En algunas realizaciones, la esterilización se lleva a cabo en presencia de un potenciador de la penetración, especialmente un potenciador de la penetración soluble en agua que tiene de 1 a aproximadamente 6 átomos de carbono y al menos un grupo polar. En realizaciones preferidas, el potenciador de la penetración es un alcohol, tal como un alcohol  $C_1$ - $C_6$ , especialmente un alcohol  $C_2$ - $C_4$ , y lo más particularmente isopropanol. Otros alcoholes que se pueden mencionar en este sentido incluyen metanol, etanol, n-propanol, n-butanol, i-butanol, t-butanol, y s-butanol, así como n-pentanol, n-hexanol, ciclopropanol, ciclobutanol, ciclohexanol y ciclohexanol. En algunas realizaciones, el tejido biológico esterilizado químicamente también se reticula con una carbodiimida, opcionalmente en presencia de un agente de reticulación divalente y/o un potenciador del acoplamiento, tal como N-hidroxisuccinimida (NHS) o N-hidroxi-2-sulfosuccinimida (Sulfo-NHS).

El tejido biológico puede comprender tejido nativo, tejido procesado en forma nativa, tejido procesado en forma no nativa, un composite o un complejo de composite. En realizaciones preferidas, el tejido biológico es un tejido procesado en forma nativa o un composite complejo. En algunas realizaciones, el tejido biológico es un tejido procesado en forma nativa, que comprende tejido reticulado, fragmentos de hueso triturado descelularizado, colágeno descelularizado u otro hueso descelularizado y/o desgrasado, tendones, ligamentos, fascia y

combinaciones de hueso-tejido conjuntivo, tales como combinaciones de hueso-ligamento-hueso o hueso-tendón. En otras realizaciones, el tejido biológico es un tejido composite complejo, que comprende tejido nativo, tejido procesado en forma nativa, tejido procesado en forma no nativa o un composite de tejido nativo, tejido procesado en forma nativa y/o tejido procesado en forma no nativa con un material biocompatible tal como un hidrogel, un alginato y/o quitosano. En realizaciones preferidas, la invención proporciona un bioimplante, en el que el tejido biológico comprende colágeno, colágeno purificado o colágeno solubilizado.

En algunos ejemplos de referencia, el aditivo es una proteína, un péptido pequeño, un ácido ribonucleico, un ácido desoxirribonucleico, un polisacárido, glucosaminoglucano (GAG) o un antibiótico. En ejemplos de referencia particulares, el aditivo comprende: (1) uno o más proteoglicanos, glucosaminoglucanos, factores de crecimiento, que incluyen cualquier miembro de la superfamilia del factor de crecimiento transformante (TGF) y proteoglicanos; (3) un ácido desoxirribonucleico; (4) ácido ribonucleico, tal como un ARN pequeño de interferencia o microARN; (3) un antibiótico seleccionado de aminoglucósidos, los anfenicoles, las ansamicinas, las  $\beta$ -lactamas, las lincosamidas, los macrólidos, los antibióticos polipéptidos, las tetraciclinas, cicloserina, mupirocina, tuberina, 2,4-diaminopiridinas, los nitrofuranos, las quinolonas, las sulfonamidas, las sulfonas, clofoctol, hexedina, metenamina, nitroxolina, taurolidina y xibernol. En ejemplos de referencia particulares, la invención proporciona un bioimplante, en el que el aditivo comprende: (1) uno o más proteoglicanos o glucosaminoglucanos, (2) una o más proteínas, tales como: (a) cualquier miembro de la superfamilia del factor de crecimiento transformante (TGF), tales como BMP-2, BMP-4 y BMP-7, el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ); (b) factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF); (c) factor de crecimiento de fibroblastos (FGF); (d) factores de crecimiento similares a la insulina (IGF); (e) factores de crecimiento derivados del cartílago (CDGF); (3) un ácido desoxirribonucleico seleccionado de genes, fragmentos de genes y ADN antisentido; (4) ácido ribonucleico tal como un ARN pequeño de interferencia (ARNpi) o un microARN; o (5) un antibiótico, tales como uno o más aminoglucósidos, anfenicoles, ansamicinas,  $\beta$ -lactamas, lincosamidas, macrólidos, antibióticos polipéptidos, tetraciclinas, cicloserina, mupirocina, tuberina, 2,4-diaminopiridinas, nitrofuranos, quinolonas, sulfonamidas, sulfonas, clofoctol, hexedina, metenamina, nitroxolina, taurolidina y xibernol. En las realizaciones particularmente preferidas, el bioimplante está en forma de una sutura, una lámina, una válvula implantable, una esponja implantable o una pasta implantable. En algunas realizaciones, el proceso comprende además conformar o formar el tejido biológico en forma de una sutura, una lámina, una válvula implantable, una esponja implantable o una pasta implantable. En realizaciones preferidas de la invención, el aditivo retiene al menos algo de su actividad nativa cuando se conjuga con el tejido biológico. En otras realizaciones preferidas, el aditivo se libera en condiciones *in vivo* o *in vitro* diseñadas para imitar las condiciones *in vivo*. En dichas realizaciones preferidas, el aditivo liberado tiene al menos algo de su actividad nativa. En algunas realizaciones de la invención, el aditivo conjugado tiene al menos el 5 %, al menos el 10 %, al menos el 15 %, al menos el 20 %, al menos el 25 %, al menos el 30 %, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, en particular aproximadamente del 5 a aproximadamente el 100 %, de aproximadamente el 10 a aproximadamente el 95 %, de aproximadamente el 15 a aproximadamente el 90 %, o de aproximadamente el 20 a aproximadamente el 80 % de su actividad nativa, ya sea unido al tejido biológico o cuando se libera del tejido biológico en el tejido circundante *in vivo* o en un entorno *in vitro* diseñado para simular el entorno *in vivo*.

#### Proceso usando tejido biológico reticulado

En algunas realizaciones, se usa un tejido biológico reticulado, y el proceso comprende además poner en contacto un tejido inicial con un agente reticulante para reticular al menos parcialmente el tejido inicial para producir un tejido reticulado. En algunas realizaciones, el bioimplante se esteriliza químicamente con una carbodiimida soluble en agua, tal como EDC. En algunas realizaciones, la esterilización se lleva a cabo en presencia de un potenciador de la penetración, especialmente un potenciador de la penetración soluble en agua que tiene de 1 a aproximadamente 6 átomos de carbono y al menos un grupo polar. En realizaciones preferidas, el potenciador de la penetración es un alcohol, tal como un alanol C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, especialmente un alanol C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>, y lo más particularmente isopropanol. Otros alcoholes que se pueden mencionar en este sentido incluyen metanol, etanol, n-propanol, n-butanol, i-butanol, t-butanol, y s-butanol, así como n-pentanol, n-hexanol, ciclopropanol, ciclobutanol, ciclopentanol y ciclohexanol. En algunas realizaciones, el tejido biológico esterilizado químicamente también se reticula con una carbodiimida, opcionalmente en presencia de un agente de reticulación divalente y/o un potenciador del acoplamiento, tal como N-hidroxisuccinimida (NHS) o N-hidroxi-2-sulfosuccinimida (Sulfo-NHS).

El tejido biológico puede comprender tejido nativo, tejido procesado en forma nativa, tejido procesado en forma no nativa, un composite o un complejo de composite. En realizaciones preferidas, el tejido biológico comprende tejido nativo, o tejido procesado en forma nativa. En realizaciones particulares, el tejido biológico es un tejido nativo, que comprende hueso, tendones, ligamentos, dermis, fascia, pericardio o combinaciones de los mismos, incluyendo combinaciones de hueso-tejido conjuntivo, tales como combinaciones hueso-tendón y combinaciones hueso-ligamento-hueso. En otras realizaciones, el tejido biológico es un tejido procesado en forma nativa, que comprende tejido reticulado, fragmentos de hueso triturado descelularizado, colágeno descelularizado u otro hueso descelularizado y/o desgrasado, tendones, ligamentos, fascia y combinaciones de hueso-tejido conjuntivo, tales como combinaciones de hueso-ligamento-hueso o hueso-tendón.

En algunos ejemplos de referencia, el aditivo es una proteína, un péptido pequeño, un ácido ribonucleico, un ácido

desoxirribonucleico, un polisacárido, glucosaminoglucano (GAG) o un antibiótico. En ejemplos de referencia particulares, el aditivo comprende: (1) uno o más proteoglicanos, glucosaminoglucanos, factores de crecimiento, que incluyen cualquier miembro de la superfamilia del factor de crecimiento transformante (TGF) y proteoglicanos; (3) un ácido desoxirribonucleico; (4) ácido ribonucleico, tal como un ARN pequeño de interferencia o microARN; (3) un antibiótico seleccionado de aminoglucósidos, los anfenicoles, las ansamicinas, las  $\beta$ -lactamas, las lincosamidas, los macrólidos, los antibióticos polipéptidos, las tetraciclinas, cicloserina, mupirocina, tuberina, 2,4-diaminopiridinas, los nitrofuranos, las quinolonas, las sulfonamidas, las sulfonas, clofoctol, hexedina, metenamina, nitroxolina, taurolidina y xibernol. En ejemplos de referencia particulares, la invención proporciona un bioimplante, en el que el aditivo comprende: (1) uno o más proteoglicanos o glucosaminoglucanos, (2) una o más proteínas, tales como: (a) cualquier miembro de la superfamilia del factor de crecimiento transformante (TGF), tales como BMP-2, BMP-4 y BMP-7, el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ); (b) factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF); (c) factor de crecimiento de fibroblastos (FGF); (d) factores de crecimiento similares a la insulina (IGF); (e) factores de crecimiento derivados del cartílago (CDGF); (3) un ácido desoxirribonucleico seleccionado de genes, fragmentos de genes y ADN antisentido; (4) ácido ribonucleico tal como un ARN pequeño de interferencia (ARNpi) o un microARN; o (5) un antibiótico, tales como uno o más aminoglucósidos, anfenicoles, ansamicinas,  $\beta$ -lactamas, lincosamidas, macrólidos, antibióticos polipéptidos, tetraciclinas, cicloserina, mupirocina, tuberina, 2,4-diaminopiridinas, nitrofuranos, quinolonas, sulfonamidas, sulfonas, clofoctol, hexedina, metenamina, nitroxolina, taurolidina y xibernol. En las realizaciones particularmente preferidas, el bioimplante está en forma de una sutura, una lámina, una válvula implantable, una esponja implantable o una pasta implantable. En algunas realizaciones, el proceso comprende además conformar o formar el tejido biológico en forma de una sutura, una lámina, una válvula implantable, una esponja implantable o una pasta implantable.

En realizaciones preferidas de la invención, el aditivo retiene al menos algo de su actividad nativa cuando se conjuga con el tejido biológico. En otras realizaciones preferidas, el aditivo se libera en condiciones *in vivo* o *in vitro* diseñadas para imitar las condiciones *in vivo*. En dichas realizaciones preferidas, el aditivo liberado tiene al menos algo de su actividad nativa. En algunas realizaciones de la invención, el aditivo conjugado tiene al menos el 5 %, al menos el 10 %, al menos el 15 %, al menos el 20 %, al menos el 25 %, al menos el 30 %, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, en particular aproximadamente del 5 a aproximadamente el 100 %, de aproximadamente el 10 a aproximadamente el 95 %, de aproximadamente el 15 a aproximadamente el 90 %, o de aproximadamente el 20 a aproximadamente el 80 % de su actividad nativa, ya sea unido al tejido biológico o cuando se libera del tejido biológico en el tejido circundante *in vivo* o en un entorno *in vitro* diseñado para simular el entorno *in vivo*.

#### Moléculas de aditivo

La molécula de aditivo (heparina) promueve la cicatrización, la remodelación, el crecimiento y/o la regeneración del tejido biológico.

#### 35 Procesos para fabricar un bioimplante A de la invención

La presente invención proporciona métodos para fabricar bioimplantes esterilizados que tienen moléculas de aditivo unidas a los mismos. Los métodos comprenden conjugar una molécula de aditivo con un tejido biológico y esterilizar el tejido biológico. Se prefiere que una etapa de esterilización sea la última etapa antes de envasar el bioimplante, p.ej., en una bolsa de polímero sellada.

40 La esterilización se lleva a cabo en presencia de un agente químico esterilizante, opcionalmente en presencia de un potenciador de la esterilización y/o un potenciador de la penetración. En algunas realizaciones, el agente de esterilización preferido es una carbodiimida hidrosoluble, tal como EDC. El agente esterilizante se utiliza preferiblemente en una concentración de al menos aproximadamente 1 mM, especialmente de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 100 mM, más específicamente de aproximadamente 15 mM a aproximadamente 50 mM, y lo más preferiblemente de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 40 mM.

En algunas realizaciones, el agente esterilizante va acompañado de un potenciador de la esterilización, tal como N-hidroxi-succinimida (NHS) o 2-sulfo-N-hidroxisuccinimida (Sulfo-NHS). En algunas realizaciones, la relación entre potenciador de la esterilización y el agente esterilizante está en el intervalo de aproximadamente 1:100 a aproximadamente 1:1, especialmente de aproximadamente 1:50 a 1:1, preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 1:20 a 1:1 y más preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 1:10 a 1:1. En particular, el potenciador de la esterilización está en una concentración de aproximadamente 0.5 mM a aproximadamente 30 mM, preferiblemente de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 5 mM.

En algunas realizaciones, se considera preferible usar un potenciador de la penetración en el proceso de esterilización para mejorar la penetración del agente esterilizante en los microbios a destruir. Los potenciadores de la penetración adecuados son alcanoles, tales como alcanoles de cadena corta o de anillo pequeño, p.ej., metanol, etanol, isopropanol, n-propanol, isobutanol, n-butanol, s-butanol, t-butanol, n-pentanol, n-hexanol, ciclopropanol,

ciclobutanol, ciclopentanol, ciclohexanol, cicloheptanol, ciclopropanol o combinaciones de cualquiera de los anteriores. En este sentido, el isopropanol es especialmente preferido. En algunas realizaciones, las concentraciones preferidas del potenciador de la penetración son de aproximadamente 1 % (vol/vol) a aproximadamente 50 % (vol/vol), especialmente de aproximadamente 5 % (vol/vol) a aproximadamente 40 % (vol/vol) e incluso más preferiblemente aproximadamente 10 %, aproximadamente 15 %, aproximadamente 20 %, aproximadamente 30 %, aproximadamente 35 % o aproximadamente 40 % (vol/vol). Un potenciador de la penetración particularmente preferido es aproximadamente 20 % (vol/vol) de isopropanol.

En la presente invención, la esterilización y la conjugación se llevan a cabo simultáneamente en presencia de un agente esterilizante, y preferiblemente en presencia de un potenciador de la esterilización y/o un potenciador de la penetración. Aunque en algunas realizaciones de la invención puede usarse una molécula de enlace bifuncional como un agente de conjugación, en algunas realizaciones preferidas el agente de esterilización y opcionalmente el potenciador de la esterilización y/o el potenciador de la penetración se consideran suficientes para conjugar el aditivo al tejido biológico, esterilizar el tejido combinado y el aditivo y opcionalmente reticular el tejido biológico. En algunas realizaciones preferidas, el tejido biológico y el aditivo se combinan para formar un intermedio, que posteriormente se congela y se liofiliza. El producto intermedio liofilizado resultante se pone en contacto a continuación con el agente esterilizante y opcionalmente un potenciador de la esterilización y/o un potenciador de la penetración (con o, preferiblemente sin, un agente conjugante). En algunas realizaciones, el tejido biológico se congela y se liofiliza. El intermediario liofilizado se pone a continuación en contacto con una solución que contiene una molécula de aditivo y un agente esterilizante y, opcionalmente, uno o más miembros del grupo de potenciadores de la esterilización, potenciadores de la penetración y/o agentes conjugados bifuncionales.

En algunas realizaciones, el aditivo se conjuga con el tejido biológico antes de la esterilización. En tales realizaciones, el tejido biológico y el aditivo se ponen en contacto con una solución de conjugación para afectar la conjugación. La solución de conjugación comprende un agente conjugante, como una carbodiimida soluble en agua o NHS. La solución de conjugación también comprende opcionalmente un potenciador de la conjugación, tal como Sulfo-NHS. Además, la solución de conjugación también comprende opcionalmente un agente conjugante bifuncional, como una alcano diamina inferior, diácido o aminoácido.

#### Usos de los bioimplantes de la invención

Los bioimplantes de la invención son especialmente ventajosos porque promueven la cicatrización, la remodelación, el crecimiento y/o la regeneración del tejido posoperatorios. En algunas realizaciones, los bioimplantes presentan en su superficie o liberan aditivos que estimulan directamente la cicatrización, la remodelación, el crecimiento y/o la regeneración del tejido posoperatorios. En algunas realizaciones, los bioimplantes presentan en su superficie o liberan aditivos, que promueven directamente la cicatrización, la remodelación, el crecimiento y/o la regeneración del tejido al inhibir la bioactividad de uno o más microbios en la vecindad del bioimplante, permitiendo así que el cuerpo del receptor cicatrice, remodele, crezca o regenere tejido sin, o con interferencia atenuada, de uno o más microbios.

En otras realizaciones particulares, el bioimplante libera la molécula de aditivo en la vecindad del bioimplante mediante escisión, p.ej., por hidrólisis (ya sea mediada por enzimas o no mediada por enzimas), de uno o más enlaces covalentes que conjugan el aditivo con el tejido biológico. Los enlaces covalentes escindidos de este modo pueden ser enlaces amida, éster, anhídrido o urea, dependiendo del agente conjugante utilizado para conjugar la molécula de aditivo al tejido biológico. En realizaciones particulares, en las que el agente conjugante es una diamina, los enlaces covalentes son enlaces amida, que se escinden por hidrólisis para formar una cadena de amina libre y un grupo carboxilo.

Los bioimplantes de la invención son útiles en una variedad de procedimientos quirúrgicos. En algunas realizaciones, los bioimplantes son tejidos blandos que pueden usarse para aumentar la reparación, tal como la sutura, cierre de heridas quirúrgicas o reparación o reemplazo de tendones, ligamentos, piel, etc. En algunas realizaciones, los bioimplantes son válvulas cardíacas útiles en el alivio de la oclusión de las válvulas vasculares o arteriales (estenosis) u otro mal funcionamiento de las válvulas. En algunas realizaciones, los bioimplantes son hueso o fragmentos de hueso parcial o completamente desmineralizados útiles en la reparación ósea, bioimplantación (por ejemplo, implante de cadera, rodilla u otra articulación) o cirugía de fusión vertebral. El experto en la materia reconocerá que otros métodos de bioimplantación están incluidos en la presente invención y están dentro de la habilidad de la persona experta en la materia quirúrgica relevante.

#### Métodos de preparación

Las siguientes secciones describen con más detalle la esterilización del tejido biológico, la conjugación de moléculas de aditivo al tejido biológico y los procedimientos opcionales de reticulación de tejidos.

#### Reticulación del tejido biológico

Los bioimplantes de la invención comprenden tejidos biológicos de fuentes naturales. En el caso de los composites complejos, también comprenden otros materiales de fuentes no naturales. En algunas realizaciones, los tipos de tejido que se usan incluyen dermis, pericardio, tendones, ligamentos, fascia y almacén de colágeno reconstituido, así como fragmentos óseos y hueso desmineralizado. En algunas realizaciones, los tejidos blandos incluyen múltiples componentes, tales como células vivas y colágeno. El colágeno es un biopolímero fibroso proteico (andamiaje) que forma la matriz que proporciona integridad estructural a los tejidos blandos. El colágeno es también el componente proteico fibroso del cartilago y el hueso. Los tejidos blandos pueden descelularizarse para proporcionar un andamiaje descelularizado que se compone principalmente de colágeno. El tejido mineralizado (hueso) se puede desmineralizar para proporcionar un almacén de colágeno que se descelulariza opcionalmente. En cualquier caso, el colágeno y otras proteínas en los tejidos blandos tienen numerosos grupos funcionales que pueden hacer que reaccionen para formar enlaces con otros grupos funcionales.

Los bioimplantes que comprenden tejidos biológicos naturales, tales como tejidos extraídos de una fuente humana, porcina, ovina, bovina, caprina, murina, canina, felina u otra fuente, son generalmente inestables si se dejan en su estado natural. Habiendo sido extraídos del entorno vivo dentro del cuerpo, tales tejidos pronto se degradarán a menos que se establezcan. Los microbios que existen de manera natural dentro de los tejidos biológicos, o que infestan los tejidos biológicos después de haber sido extirpados, pronto comenzarán a descomponer el tejido biológico como alimento. También, los antígenos presentes de forma natural en el tejido, especialmente en la parte del tejido que está expuesta al líquido intersticial que rodea el bioimplante, atraen componentes del sistema inmunitario del cuerpo receptor, que gradualmente descomponen el tejido y eventualmente dan lugar al rechazo del tejido. También, la proteína en la superficie del tejido biológico no tratado (fresco) se desnaturaliza fácilmente, lo que puede conducir a su erosión gradual dentro del cuerpo receptor. En los tejidos blandos no descelularizados, las células dentro del tejido pueden sufrir lisis (ruptura de la membrana celular), perturbando así la integridad estructural del tejido y exponiendo potencialmente varios antígenos a la superficie del bioimplante. Así, es deseable esterilizar el tejido biológico durante el transcurso de la preparación del bioimplante de la presente invención. Dicha esterilización destruye los microbios asociados con el material biológico y en algunas realizaciones enmascara los sitios antigénicos, proporciona integridad estructural al bioimplante y/o retiene el bioimplante en su forma natural.

En realizaciones de la invención, el bioimplante es un órgano o tejido derivado total o parcialmente de un ser humano o un animal, o que se produce a partir de otro tejido orgánico, y que se implantará, ya sea por sí mismo o como parte de una bioprótesis, en un ser humano o en un animal. Así, los bioimplantes generalmente incluyen corazones, válvulas cardíacas y otros componentes cardíacos, pericardio, injertos vasculares, componentes del tracto urinario y de la vejiga, tendones, intestino y tejidos blandos en general, tales como piel, colágeno y similares. En realizaciones particulares, los bioimplantes incluyen matriz de colágeno descelularizada, matriz de colágeno purificada y matriz de colágeno no purificada. En algunas realizaciones, un bioimplante puede ser un xenoinjerto, un aloinjerto o un autoinjerto. En algunas realizaciones, los bioimplantes también incluyen tejido óseo, especialmente fragmentos óseos y tejido óseo desmineralizado. Aunque el bioimplante con frecuencia será uno que esté hecho de tejidos naturales, que incluyen pero no se limitan a tejidos bovinos, ovinos, porcinos, caprinos, caninos, felinos y posiblemente incluso tejido humano, otros materiales naturales, bien conocidos por los expertos en la materia, también se pueden usar. Dichos materiales adicionales incluyen hidrogeles (por ejemplo, hidrogeles de ácido hialurónico), alginatos y quitosano.

El término "reticulación", como se usa en el presente documento, se refiere a la formación de enlaces de varias longitudes dentro del tejido, es decir, dentro y/o entre las moléculas (especialmente las proteínas) del tejido, resultando tales enlaces de la formación de enlaces (a) entre dos restos reactivos del tejido, formando así enlaces covalentes cortos dentro y entre las moléculas del tejido, o (b) entre restos reactivos en el tejido y un agente de reticulación bifuncional unido covalentemente. Aunque la reticulación y la "conjugación" son sucesos diversos (formando la primera enlaces dentro del tejido biológico, formando la segunda enlaces entre el tejido biológico y una molécula de aditivo), en muchos casos la reticulación y la conjugación pueden llevarse a cabo en la misma etapa del proceso, como se analiza con más detalle en el presente documento.

La expresión "agente de reticulación" se usa en el presente documento para describir un reactivo bifuncional capaz de reaccionar con dos o más grupos funcionales en el tejido biológico. Un reactivo bifuncional es un reactivo que tiene al menos dos grupos funcionales capaces de reaccionar con grupos reactivos en el tejido biológico. Dichos grupos funcionales incluyen aminas, hidroxilos y tioles ácidos (grupos sulfhidrido). Así, los reactivos bifuncionales incluyen diaminas, diácidos o un  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ -,  $\zeta$ -aminoácido o un aminoácido de orden superior u otros agentes bifuncionales, tales como anhídridos (p.ej., anhídrido succínico). Los reactivos bifuncionales se eligen de forma que reaccionen con grupos reactivos en el tejido biológico. Dichos grupos reactivos incluyen aminas (p.ej. aminas N-terminales y grupos de lisina generalmente ubicuos), diferentes a los grupos  $-NH_2$  (como los de los grupos guanilo de los restos de arginina), grupos carboxilo libres (p. ej., los del extremo C y los grupos ácido aspártico y glutámico), grupos hidroxilo (p.ej. los encontrados en serina, treonina y tirosina) y tioles (p.ej. encontrado en restos de cisteína). Así, en algunas realizaciones, los enlaces cruzados comprenden enlaces covalentes, tales como amidas (formadas entre aminas reactivas bifuncionales y grupos carboxilo en el tejido biológico, o entre ácidos o anhídridos reactivos bifuncionales y aminas proteicas). En algunas realizaciones, los enlaces cruzados comprenden ésteres, tales como los formados entre grupos carboxilo del reactivo bifuncional y grupos hidroxilo de la proteína o los formados entre

grupos hidroxilo del reactivo bifuncional y grupos carboxilo de la proteína. En otras realizaciones adicionales, los enlaces cruzados comprenden enlaces disulfuro, p.ej. entre tioles en el reactivo bifuncional y cisteína en la proteína. De los tipos de enlaces que se pueden formar, las amidas son particularmente ventajosas ya que se pueden formar fácilmente usando los métodos descritos en el presente documento usando un agente de acoplamiento, opcionalmente junto con un potenciador del acoplamiento, como se describe con más detalle en el presente documento.

En algunas realizaciones, el agente de reticulación es una cadena lineal o un compuesto ramificado que tiene de 4 a 12 átomos de carbono. En algunas realizaciones, el agente de reticulación es un compuesto carbocíclico en el que los grupos funcionales reactivos están en el anillo carbocíclico o están unidos al anillo carbocíclico por una cadena de carbono intermedia. En algunas realizaciones, los grupos funcionales reactivos pueden incluir aminas, grupos hidroxilo, ácidos carboxílicos, anhídridos, cloruros ácidos, tioles, etc. En realizaciones particulares, el agente de reticulación, es una alcanodiamina C<sub>4</sub>-C<sub>12</sub>, alquenodiamina, alquinodiaminoalcano, ácido aminoalcanoico, ácido aminoalquenoico o ácido aminoalquinoico. En realizaciones específicas, el agente de reticulación es 1,6-diaminohexano, 1,7-diaminoheptano, ácido succínico (C<sub>4</sub>), ácido glutárico (C<sub>5</sub>), ácido adípico (C<sub>6</sub>) o ácido pimélico (C<sub>7</sub>), o uno de los anhídrido seleccionados de: anhídrido succínico, glutárico, adípico y pimélico. En otras realizaciones particulares, el agente de reticulación, es 2,4,6-triaminobenceno, 1,4-diaminobenceno, ácido o-ftálico, ácido *p*-ftálico, ácido 4-aminobenzoico y anhídrido ftálico. En algunas realizaciones, un agente de reticulación di- o triamino que tiene un peso molecular de aproximadamente 190 o menos, y aproximadamente 150 o menos, se emplea para asegurar una penetración adecuada en el tejido fresco. En realizaciones particulares, el agente de reticulación es una cadena lineal de 6 a 8 átomos de carbono de longitud con una amina reactiva ubicada en cada extremo. Aunque el agente de reticulación puede tener sustituciones opcionales a lo largo de su longitud, en realizaciones específicas, es un hidrocarburo que está sustituido solo con las aminas reactivas, p.ej. un alcano de cadena recta que tiene aminas en cada extremidad. Ejemplos de agentes de reticulación son 1,6-hexanodiamina y 1,7-heptanodiamina.

Las expresiones "agente de acoplamiento" y "potenciador del acoplamiento", como se usa en el presente documento, se refieren a reactivos que promueven y potencian respectivamente la formación de enlaces, especialmente enlaces amida, entre proteínas dentro del tejido de bioimplante o entre grupos funcionales (por ejemplo, aminas o carboxilos) y el agente de reticulación. Estos enlaces pueden formarse entre una amina reactiva y un carboxilo reactivo (COOH o COO<sup>-</sup>) del tejido (uniendo así dos grupos reactivos tan cercanos), o entre una amina o carboxilo reactivo en un agente de reticulación y un carboxilo o amina reactivo sobre o dentro del tejido. Los expertos en la síntesis de péptidos y la técnica relacionada estarán familiarizados con dichos reactivos, p.ej. carbodiimidas y succinimidas, especialmente sus variedades solubles en agua.

En algunas realizaciones, la reacción de reticulación se facilita mediante el uso de un agente de acoplamiento. En algunas realizaciones más particulares, el agente de acoplamiento es clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC), aunque también pueden usarse otros agentes de acoplamiento adecuados tales como N-hidroxisuccinimida (NHS). En realizaciones particulares, el agente de acoplamiento se usa junto con un potenciador del acoplamiento, tal como N-hidroxisulfosuccinimida (sulfo-NHS) aunque otros potenciadores del acoplamiento adecuados, tales como 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) y dimetilaminopiridina (DMAP), también se pueden usar. La concentración del agente de acoplamiento y del potenciador del acoplamiento puede variar. Sin embargo, Sin embargo, las concentraciones apropiadas son fácilmente determinables por los expertos en la materia. En algunas realizaciones, el agente de acoplamiento se usa en una concentración entre aproximadamente 10 mM y 500 mM, a una concentración de 100 mM o menos, especialmente a una concentración entre aproximadamente 20 mM y 50 mM. En algunas realizaciones, el potenciador del acoplamiento se emplea a una concentración de entre 0.5 mM y aproximadamente 50 mM, especialmente a una concentración de aproximadamente 10 mM o menos.

En algunas realizaciones de la presente invención, los agentes de reticulación, el agente de acoplamiento y el potenciador del acoplamiento, así como sus productos de reacción, son solubles en agua. En realizaciones particulares, el agente de reticulación seleccionado, el agente de acoplamiento y el potenciador del acoplamiento optimizan la reticulación del tejido, a la vez que se minimizan los riesgos de daño al tejido biológico durante el proceso de reticulación, y de toxicidad, inflamación, calcificación, etc., después de la implantación. En realizaciones específicas, todas las soluciones utilizadas para la reticulación se filtran antes de su uso, p.ej. a través de filtros de 0.45 µm o menos para eliminar contaminantes microbianos y, por lo tanto, reducir el riesgo de contaminar el tejido durante la reticulación y/o la esterilización.

Las condiciones de reacción para la reticulación del tejido biológico pueden variar, dependiendo de los agentes de reticulación, acoplamiento y potenciadores utilizados. En general, el proceso de reticulación se lleva a cabo en un tampón acuoso seleccionado entre los conocidos por los expertos en esta técnica para proporcionar la reacción de reticulación más eficaz, a la vez que se minimizan los riesgos de calcificación. Los ejemplos de tampones adecuados incluyen, pero no se limitan a, ácido N-2-hidroxiethylpiperazina-N'-etanosulfónico (HEPES) y ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico (MOPS), y similares.

El pH y la concentración de la solución tamponada pueden variar, nuevamente dependiendo de los agentes de

reticulación, acoplamiento y potenciadores utilizados. La concentración del tampón y el pH se eligen para proporcionar la reacción de reticulación más efectiva siendo al mismo tiempo los menos perjudiciales para el tejido biológico. Por ejemplo, con EDC como agente de acoplamiento y sulfo-NHS como potenciador del acoplamiento, el pH de la solución de tratamiento se mantiene entre aproximadamente 6,0 y aproximadamente 7,4. La temperatura de reacción puede estar entre aproximadamente 40 °C y 0 °C; p.ej. entre aproximadamente 21 °C y 25 °C. Los tampones de pH aceptables para su uso en realizaciones de la invención incluyen los tampones de pH HEPES, TRIS y MOPS comúnmente conocidos.

En general, un tejido biológico fresco o conjugado con aditivo a reticular según la presente invención se mantiene en hielo hasta que se puede enjuagar varias veces en solución salina al 0,85 % enfriada con hielo o alguna otra solución adecuada. En general, dicho lavado o enjuague se lleva a cabo inmediatamente después de que se haya extirpado tejido biológico fresco del animal donante o dentro de las 48 horas posteriores. En el caso del tejido biológico conjugado con aditivo, la etapa de enjuague puede omitirse si el tejido se reticula inmediatamente después de que el aditivo se haya conjugado con el tejido biológico. Si se necesita un tiempo de almacenamiento adicional, el tejido enjuagado puede almacenarse durante no más de 24 horas, en un tampón apropiado a baja temperatura, como aproximadamente 4 °C.

En algunas realizaciones, la concentración del agente de reticulación de diamina está entre aproximadamente 80 y aproximadamente 135 milimolar, entre aproximadamente 90 y 130 milimolar, entre aproximadamente 95 y 125 milimolar, o entre aproximadamente 100 y 125 milimolar. En realizaciones particulares, el agente de reticulación de diamina tiene una longitud de cadena de carbono no mayor que 12 átomos de carbono, p.ej. entre 4 y 8 átomos de carbono. En realizaciones específicas, el agente de reticulación es un alcano de cadena lineal que tiene grupos amina en sus respectivos extremos, especialmente 1,6-hexanodiamina. El tratamiento del tejido biológico se lleva a cabo poniendo en contacto el tejido con una solución, especialmente una solución acuosa, que contiene el agente de acoplamiento, el potenciador del acoplamiento y la diamina reticulante. Las concentraciones del agente de acoplamiento, EDC y el potenciador del acoplamiento, Sulfo-NHS, son como se discutió previamente, p.ej. entre aproximadamente 10 mM y aproximadamente 100 mM de EDC y entre aproximadamente 0.5 mM y aproximadamente 10 mM de sulfo-NHS.

#### Conjugación de moléculas de aditivo con el tejido biológico

Como se ha analizado anteriormente, los bioimplantes de la invención están hechos de tejido biológico natural, tal como dermis, pericardio, tendones, ligamentos, fascia y colágeno, tal como colágeno purificado, colágeno reconstituido y colágeno solubilizado, así como fragmentos óseos y hueso desmineralizado. Todos los tejidos contemplados dentro del alcance de la invención tienen una o más proteínas, tales como colágeno. Los tejidos no desculturizados también comprenden otros componentes, como células vivas, que tienen varias proteínas en la superficie celular, tales como receptores, canales iónicos y otras proteínas que tienen numerosos grupos funcionales que pueden reaccionar con diversos reactivos para formar enlaces covalentes.

Varias moléculas de aditivo también tienen uno o más grupos funcionales que pueden reaccionar con un reactivo para formar enlaces covalentes. Ejemplos de moléculas de aditivo incluyen proteínas, péptidos pequeños, ácidos ribonucleicos, ácidos desoxirribonucleicos, polisacáridos, glucosaminoglucanos (GAG) y antibióticos. Cada una de estas clases de moléculas de aditivo posee miembros que tienen al menos un grupo reactivo capaz de formar una unión covalente intermolecular (conjugación) entre las moléculas de aditivo y las proteínas del tejido biológico. Dichos grupos reactivos incluyen grupos carboxilo, sulfonatos, aminas, ureas, carbamatos, guanidilos, tioles (sulfhidrilos) e hidroxilos. De estos grupos reactivos, los más favorables para preparar bioimplantes de la invención se consideran grupos carboxilo y grupos amina, ya que pueden usarse para formar grupos amida lábiles *in vivo* con carboxilo sobre proteína o agente de reticulación bifuncional.

Se entenderá que un grupo funcional de un tipo particular puede transformarse en un tipo diferente mediante métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, un grupo amina se puede convertir en un grupo carboxilo haciendo reaccionar la amina con, por ejemplo, un diácido o anhídrido diácido. La reacción de la amina con un grupo carboxilo del diácido, o la apertura del anillo del anhídrido del anhídrido diácido, da como resultado que se forme un enlace amida entre la molécula de reactivo y la amina, así como un grupo ácido libre que puede reaccionar con otro reactivo. Como otro ejemplo, un grupo cisteína puede transformarse en un sitio reactivo de ácido carboxílico mediante el acoplamiento de un ácido tiolacanoano al grupo cisteína, formando así un puente disulfuro entre la molécula de aditivo y el reactivo, al mismo tiempo que proporciona un grupo ácido como grupo funcional en la molécula de aditivo. En algunas realizaciones, una molécula de aditivo puede tener un grupo funcional que es un éster de un ácido que puede liberarse por hidrólisis del enlace éster para producir un ácido libre, que después puede conjugarse a través de un agente conjugante de amina. Este enfoque es especialmente útil cuando el ácido libre representa el metabolito activo *in vivo*. Así, como se usa en el presente documento, la expresión "molécula de aditivo" incluye tales moléculas derivatizadas, especialmente cuando la liberación de la molécula de aditivo después de la implantación se efectúa mediante la escisión de los enlaces formados por los reactivos y los aditivos *in vivo*, liberando así una molécula activa.

En general, la conjugación implica poner en contacto un aditivo con al menos un reactivo de conjugación. Dichos reactivos de conjugación incluyen uno o más de los siguientes: agentes de reticulación, agentes de acoplamiento y/o potenciadores del acoplamiento. En algunas realizaciones, el reactivo de conjugación incluye solo agente de reticulación. En otras realizaciones preferidas, el reactivo de conjugación incluye agente de acoplamiento (tal como EDC). En realizaciones más preferidas, el reactivo de conjugación incluye un agente de acoplamiento (tal como EDC) y un potenciador del acoplamiento (tal como NHS o Sulfo-NHS). En algunas realizaciones, el reactivo de conjugación incluye agente de acoplamiento y potenciador del acoplamiento pero no agente de reticulación. En otras realizaciones, el reactivo de conjugación incluye agente de acoplamiento, potenciador del acoplamiento y agente de reticulación. En algunas realizaciones, el agente de reticulación, el agente de acoplamiento y el potenciador del acoplamiento son los mismos que los descritos anteriormente con respecto a la reticulación del tejido biológico.

En algunas realizaciones preferidas, el reactivo de conjugación comprende un agente de acoplamiento y opcionalmente un potenciador del acoplamiento. En algunas realizaciones particularmente preferentes, el agente de acoplamiento es una carbodiimida, tal como EDC. En algunas realizaciones particularmente preferentes, el potenciador del acoplamiento es NHS o Sulfo-NHS. Los agentes de acoplamiento y los potenciadores del acoplamiento se han descrito con más detalle anteriormente. El uso de agentes de acoplamiento solos o en combinación con potenciadores de acoplamiento da como resultado enlaces amida directos entre las moléculas de aditivo y las proteínas del tejido biológico.

El experto en la materia reconocerá que el reactivo de acoplamiento y el potenciador del acoplamiento divulgados en el presente documento para acoplar el aditivo al tejido biológico son, de acuerdo con la presente invención, los mismos que el agente esterilizantes y el potenciador del esterilizante, respectivamente, como se ha divulgado anteriormente. Un experto en la materia reconocerá que la presente invención implica la esterilización y la conjugación en la misma etapa, usando un agente esterilizante como agente de acoplamiento y opcionalmente un potenciador de la esterilización como potenciador del acoplamiento. En algunas realizaciones preferidas, entonces, e acoplamiento también se lleva a cabo en presencia de un potenciador de la penetración, como se ha divulgado anteriormente. En algunas realizaciones preferidas, el tejido y el aditivo se combinan y luego se ponen en contacto con una solución de esterilización que comprende un agente esterilizante y opcionalmente un potenciador de la esterilización y/o potenciador de la penetración. En las realizaciones particularmente preferidas, el tejido y el aditivo se combinan, congelan, liofilizan y luego se ponen en contacto con dicha solución de esterilización. En otras realizaciones preferidas, el tejido se pone en contacto con una solución de esterilización que comprende una molécula de aditivo y un agente esterilizante y opcionalmente un potenciador de la esterilización y/o potenciador de la penetración. En las realizaciones particularmente preferidas, el tejido se congela y liofiliza primero y luego se pone en contacto con una solución de esterilización que comprende una molécula de aditivo y un agente esterilizante y opcionalmente un potenciador de la esterilización y/o potenciador de la penetración.

En algunas realizaciones, se usa un agente de reticulación. En dichos casos, al menos un grupo funcional en el agente de reticulación es capaz de formar un enlace covalente con un grupo funcional en la molécula de aditivo. Al menos otro grupo funcional es capaz de formar un enlace covalente con un grupo funcional en la proteína del tejido biológico. En dichos casos, el grupo activo en la molécula de aditivo es uno que forma fácilmente un enlace covalente con un grupo funcional en el agente de reticulación. Ejemplos de grupos activos que se pueden encontrar en las moléculas de aditivo incluyen grupos carboxilo, sulfonatos, aminas, guaninas, ureas, carbamatos, amidas, imidas y tioles (por ejemplo, grupos cisteína en proteínas, como proteínas de factor de crecimiento). Los grupos activos especialmente adecuados incluyen grupos carboxilo y aminas.

En algunas realizaciones, los grupos funcionales del agente de reticulación adecuados incluyen grupos funcionales que forman enlaces amida o éster con al menos un grupo carboxilo del aditivo. Dichos grupos funcionales incluyen aminas e hidroxilos. En algunas realizaciones, los grupos funcionales de agente de conjugación adecuados incluyen grupos funcionales que forman enlaces amida o éster con al menos una amina o hidroxilo de la molécula de aditivo. Dichos grupos funcionales incluyen grupos carboxilo y anhídridos de ácido.

Algunos agentes de reticulación que pueden usarse para conjugar un aditivo a una proteína en un tejido biológico incluyen los reactivos homobifuncionales, solubles en agua: bis(sulfosuccinimidil)suberato, tartrato de disulfosuccinimidilo y etilenglicol-bis-(sulfosuccinimidil succinato). Otros agentes de conjugación incluyen los reactivos heterobifuncionales, solubles en agua: N-sulfosuccinimidil(4-yodoacetil)aminobenzoato, sulfosuccinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato, sulfosuccinimidil-4-(p-maleimidofenil)butirato, 3-maleimidobenzo-N-hidroxisulfosuccinimida éster. Si bien los reactivos solubles en agua se consideran superiores a los reactivos no solubles en agua, también es posible utilizar agentes de reticulación bifuncionales no solubles en agua, como el bis-(succinimidil)suberato, tartrato de disuccinimidilo y etilenglicol-bis-(succinimidil succinato). Otros agentes de reticulación que se pueden mencionar incluyen: dimetil-3,3'-ditiobispropionimidato, dimetil-4,4'-ditiobisbutirimidato y dimetil-6-6'-ditiobiscaproimidato.

Algunos agentes de reticulación bifuncionales especialmente adecuados incluyen diaminas, diácidos y aminoácidos, y en particular diaminas, diácidos y aminoácidos que tienen de 4 a 12 carbonos entre los grupos funcionales. Cuando se usan diaminas, diácidos o aminoácidos como agentes de conjugación, es ventajoso usar un agente de

acoplamiento (como una carbodiimida o una imida cíclica) y/o un potenciador del acoplamiento (como una imida cíclica, HOBt o DMAP), como se describe con más detalle en el presente documento.

### Esterilización

- 5 Antes de implantar el bioimplante en un mamífero; especialmente un ser humano, debe realizarse la esterilización, y esto normalmente se realiza antes del envasado. Las condiciones para la esterilización se han analizado en detalle anteriormente. La esterilización y la conjugación tienen lugar en la misma etapa del proceso, y en particular usando la misma solución de reactivo que comprende un agente esterilizante y opcionalmente un potenciador de la esterilización y/o un potenciador de la penetración. En algunas realizaciones particularmente preferentes, la solución de esterilización comprende agente esterilizante y potenciador de la penetración y opcionalmente un potenciador de la esterilización. En algunas otras realizaciones preferidas, la solución de esterilización comprende agente esterilizante, potenciador de la esterilización y potenciador de la penetración. En otras realizaciones, la solución de esterilización comprende agente esterilizante, un agente de reticulación y opcionalmente un potenciador de la esterilización y/o potenciador de la penetración.

### ESQUEMAS DE PREPARACIÓN

- 15 A continuación se presentan descripciones de esquemas particulares para preparar un bioimplante reticulado conjugado con un aditivo y esterilizado de la invención. El experto en la materia reconocerá que otras realizaciones pueden desarrollarse dentro del alcance de la presente invención y no se pretende una exención de responsabilidad de dicha invención más amplia mediante la presentación de estos ejemplos ilustrativos.

### RETICULACIÓN/CONJUGACIÓN ASISTIDA POR EDC

- 20 Como se ha analizado anteriormente, la reticulación del tejido biológico y la conjugación de moléculas de aditivo con tejido biológico se pueden llevar a cabo en presencia de una variedad de agentes de reticulación. En algunas realizaciones, la presente invención comprende la reticulación de tejido biológico con una diamina, tal como una diamina C<sub>4</sub>-C<sub>12</sub> lineal que tiene grupos amina con al menos aproximadamente cuatro carbonos entre ellos. En realizaciones particulares, la diamina es soluble en agua, aunque se pueden usar diaminas no solubles en agua o ligeramente solubles en agua en algunas realizaciones si se usa un detergente, especialmente un detergente no iónico, para favorecer la solubilización de la diamina. Ejemplos de diaminas solubles en agua contempladas dentro del alcance de la presente invención incluyen la 1,5-pentano diamina, 1,6-hexano diamina y 1,7-heptano diamina.

- 30 En algunas realizaciones, la presente invención comprende la reticulación de tejido biológico con un diácido, tal como un diácido lineal C<sub>4</sub>-C<sub>12</sub> que tiene grupos carboxilos con al menos cuatro carbonos entre ellos. En realizaciones particulares, el diácido es soluble en agua, aunque se pueden usar diácidos no solubles en agua o ligeramente solubles en agua en algunas realizaciones si se usa un detergente, especialmente un detergente no iónico, para favorecer la solubilización del diácido. Ejemplos de diácidos solubles en agua contempladas dentro del alcance de la presente invención incluyen el ácido 1,5-pentano dicarboxílico, ácido 1,6-hexano dicarboxílico y ácido 1,7-heptano dicarboxílico.

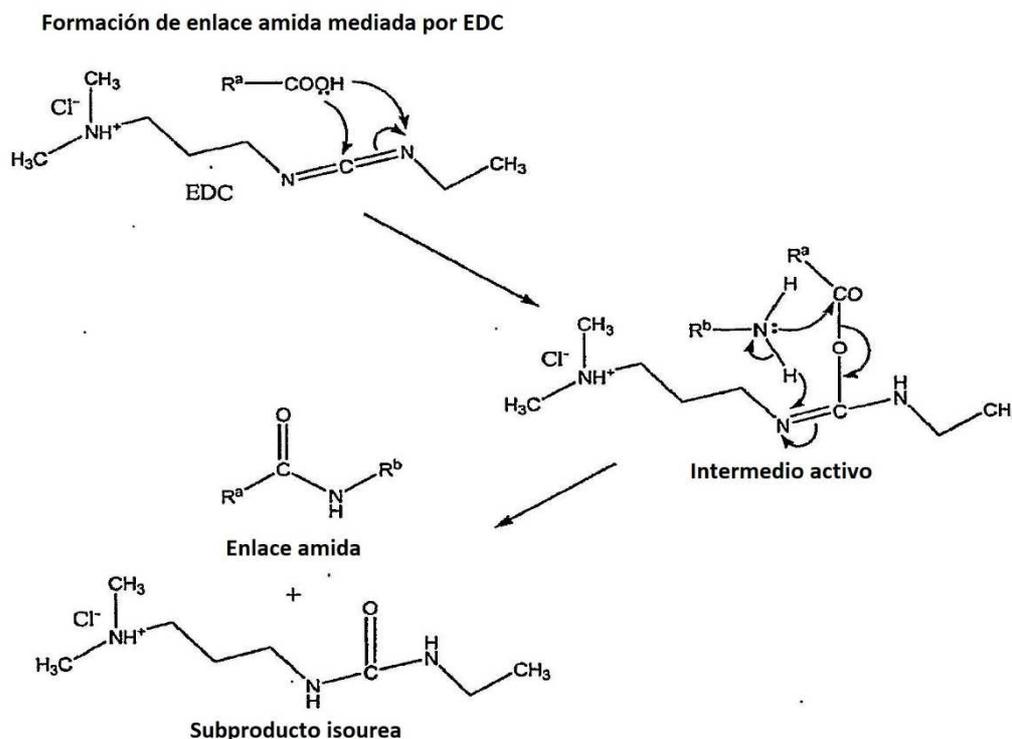
- 35 En lugar de un diácido, puede sustituirse por un anhídrido diácido, tal como un anhídrido diácido C<sub>4</sub>-C<sub>12</sub> que tiene grupos carboxilos con al menos cuatro carbonos entre ellos. En realizaciones particulares, el anhídrido diácido es soluble en agua, aunque se pueden usar anhídridos diácidos no solubles en agua o ligeramente solubles en agua en algunas realizaciones si se usa un detergente, especialmente un detergente no iónico, para facilitar la solubilización del anhídrido diácido. Ejemplos de anhídridos diácidos solubles en agua contemplados dentro del alcance de la presente invención incluyen el anhídrido del ácido 1,5-pentano dicarboxílico, anhídrido del ácido 1,6-hexano-dicarboxílico y anhídrido del ácido 1,7-heptano-dicarboxílico.

- 45 En lugar de un diácido o diamina, puede sustituirse un aminoácido, tal como un aminoácido C<sub>4</sub>-C<sub>12</sub> que tiene un grupo carboxilo y una amina con al menos cuatro carbonos entre ellos. En realizaciones particulares, el aminoácido es soluble en agua, aunque se pueden usar aminoácidos no solubles en agua o ligeramente solubles en agua en algunas realizaciones si se usa un detergente, especialmente un detergente no iónico, para favorecer la solubilización del aminoácido. Ejemplos de aminoácidos solubles en agua contemplados dentro del alcance de la presente invención incluyen ácido 5-aminopentan-1-ico, ácido 6-aminohexan-1-ico y ácido 7-amino-heptan-1-ico. Se pueden usar otros aminoácidos como se ha descrito anteriormente.

- 50 Las diaminas forman enlaces amida entre grupos carboxilo dentro del tejido biológico, uniendo así los grupos carboxilo a través de un enlazador alquileo. Los diácidos y los anhídridos diácidos forman enlaces amida con grupos amina (incluida la guanina) de las proteínas dentro del tejido biológico. De forma análoga, las funciones amina de los aminoácidos forman enlaces amida con grupos carboxilo proteicos, mientras que los grupos carboxilo de los aminoácidos forman enlaces amida con grupos amina en el tejido biológico.

- 5 Se considera ventajoso usar un agente de acoplamiento para favorecer la formación de enlaces amida dentro del tejido biológico y entre el tejido biológico y el. Los agentes de acoplamiento adecuados incluyen EDC o N-hidroxisuccinimida (NHS), que potencian la formación de enlaces amida cuando se usan junto con diamina, diácido o aminoácido. Se cree que el potenciador del acoplamiento EDC aumenta la velocidad de reacción entre una amina y un grupo carboxilo formando un intermediario activo, que disminuye la barrera de energía de reacción de la formación del enlace amida. La formación de un enlace amida usando EDC se muestra en el Esquema 1, a continuación.

### Esquema 1



- 10 Como se puede observar en el Esquema 1, la formación de un enlace amida se efectúa a través de un intermedio activo. En particular, un resto de ácido carboxílico en una molécula representado por  $R^a\text{-COOH}$  ataca al carbón de la diimida, formando un intermedio o-acilisourea relativamente inestable. El ataque del carbono del carbonilo por un grupo libre de electrones del grupo funcional amina de  $R^b\text{-NH}_2$  da como resultado la formación del enlace amida entre  $R^a$  y  $R^b$ . Además, se forma como un subproducto, una isourea soluble en agua, que se lava del tejido biológico después de la conjugación y/o reticulación.
- 15 En algunas realizaciones,  $R^a$  representa una proteína de un tejido biológico y  $R^b$  representa un aditivo con amina. En algunas realizaciones específicas,  $R^a$  representa una proteína de un tejido biológico que tiene uno o más carboxilos libres ( $\text{COOH}$ , o  $\text{COO}^-$ ), mientras que  $R^b$  representa una proteína, péptido, un antibiótico, ADN o ARN que tiene una amina libre o un polisacárido, glucosaminoglucano (GAG) o derivado que tiene una amina libre. En algunas realizaciones,  $R^a$  representa un grupo carboxilo u otro grupo ácido de un aditivo y  $R^b$  representa una amina libre (tal como una cadena lateral de lisina) de una proteína en el tejido biológico. En algunas realizaciones particulares,  $R^a$  es un carboxilo libre de una proteína, un péptido, un antibiótico o un ADN, ARN o un polisacárido, glucosaminoglucano (GAG), derivatizado para tener un carboxilo libre y  $R^b$  representa una amina libre de una cadena lateral de lisina de una proteína del tejido biológico.
- 20
- 25 En algunas realizaciones, el tejido biológico se acopla al aditivo mediante un agente de reticulación. En algunas de dichas realizaciones, el ácido  $R^a$  es una proteína, especialmente una proteína del tejido biológico que tiene uno o más restos de ácido carboxílico (p.ej.  $\text{COOH}$  C-terminal o grupos carboxilo de restos de ácido aspártico y/o glutámico) disponibles para la reacción. En algunas de dichas realizaciones,  $R^a$  es el resto de un aditivo que lleva ácido, tal como una proteína, un péptido o un antibiótico; o puede ser un polisacárido derivatizado, glucosaminoglucano (GAG), ADN o ARN. También, en algunas de dichas realizaciones,  $R^a$  también puede ser un agente de reticulación, ácido, tal como un diácido, un anhídrido diácido o un aminoácido. Donde  $R^a$  es una proteína,  $R^b$  es, en algunas realizaciones, un agente de reticulación amino, tal como un agente de reticulación diamina. Donde  $R^a$  es un agente de reticulación,  $R^b$  es, en algunas realizaciones, una proteína que tiene grupos amina expuestos (p.ej. amina N-terminal o aminas de cadena lateral de restos de lisina). Donde  $R^a$  representa el resto de un aditivo
- 30

que lleva ácido, R<sup>b</sup> es, en algunas realizaciones, un reticulante o reactivo de acoplamiento que lleva amina o <sup>b</sup> puede ser una proteína que lleva amina.

En general, la reticulación y conjugación mediadas por EDC son conceptualmente muy similares, ya que la reticulación, la conjugación o ambas se pueden llevar a cabo utilizando un agente bifuncional (reticulación/conjugación) capaz de formar enlaces amida con los materiales deseados.

En algunas realizaciones, se considera ventajoso reticular un tejido biológico en una etapa y conjugar la molécula de aditivo al tejido biológico en otra etapa. En algunas de dichas realizaciones, se considera ventajoso usar un agente enlazador homobifuncional, tal como una diamina, un diácido o un anhídrido diácido como el agente de reticulación. En algunas realizaciones particulares, el agente de enlace homobifuncional es una diamina, que se usa junto con EDC y opcionalmente un potenciador del acoplamiento, tal como sulfo-NHS o NHS. En dichos casos, la reticulación del tejido biológico con una diamina bloquea los grupos ácido carboxílico de las proteínas del tejido, dejando grupos amina de las proteínas del tejido disponibles para la conjugación con una molécula de aditivo a través de un enlazador de conjugación adecuado. Dicha conjugación se lleva a cabo con un agente de conjugación que tiene al menos dos grupos funcionales. El primer grupo funcional debe ser un grupo funcional capaz de reaccionar con las aminas de las proteínas del tejido para formar enlaces amida. Los agentes de conjugación adecuados incluyen diácidos, anhídridos diácidos y aminoácidos, especialmente tales agentes de conjugación que tienen 4-12 carbonos en los que los dos grupos funcionales están separados por al menos cuatro átomos de carbono. Cuando el agente de conjugación es un diácido o un anhídrido diácido, el aditivo debe ser uno que tenga, o haya sido modificado para tener, al menos una amina libre para la formación de un enlace amida con el agente de conjugación. Cuando el agente de conjugación es un aminoácido, el aditivo debe ser uno que tenga, o haya sido modificado para tener, al menos un resto de ácido carboxílico disponible para la formación de un enlace amida con el agente de conjugación. En cualquier caso, la conjugación puede tener lugar favorablemente al poner en contacto el aditivo, el material biológico reticulado y el agente de conjugación, opcionalmente junto con un agente de acoplamiento (p.ej. EDC o NHS) y/o un potenciador del acoplamiento (p.ej. NHS o sulfo-NHS).

Los Esquemas 2 y 2A, mostrados en las FIG. 1 y 2, muestran cómo se efectúa la reticulación seguida de conjugación del aditivo, en un tejido biológico. Con referencia al Esquema 2 de la FIG. 1; en la primera etapa, se muestra la proteína Pr, que tiene múltiples restos carboxilo y al menos un resto amina. La proteína se reticula poniéndola en contacto con el agente de reticulación **diam**, que es una diamina, en presencia de un agente de acoplamiento (EDC) y un potenciador del acoplamiento (sulfo-NHS), que produce la proteína reticulada **XLPr**.

En una primera reacción alternativa (A) mostrada en el Esquema 2, la proteína reticulada **XLPr** reacciona con una molécula de aditivo **a-adi** (R<sup>1</sup>CO<sub>2</sub><sup>-</sup>), que tiene un grupo carboxilo libre, en presencia de un agente de acoplamiento (EDC) y un potenciador del acoplamiento (sulfo-NHS), que produce la proteína reticulada conjugada con el aditivo **1**. El experto en la materia reconocerá que, aunque R<sup>1</sup>CO<sub>2</sub><sup>-</sup> puede ser una molécula de aditivo que tiene un carboxilo libre en su estado nativo (como una proteína, un péptido o un antibiótico como una de las penicilinas o cefalosporinas), también puede representar una molécula de aditivo que se ha modificado para tener un grupo carboxilo, p.ej. haciendo reaccionar un aditivo que contiene amina con un diácido, anhídrido diácido, etc., como se ha descrito anteriormente. En algunas realizaciones, el aditivo puede tener un grupo sulfonato (SO<sub>3</sub>) en lugar de un grupo carboxilo, en cuyo caso el resultado esperado será un enlace sulfonamida entre la proteína y el aditivo.

En otra reacción alternativa (B1) mostrada en el Esquema 2, la proteína reticulada **XLPr** reacciona con un agente de conjugación aminoácido **aa** (H<sub>2</sub>N-R<sup>2</sup>-CO<sub>2</sub><sup>-</sup>) en presencia de un agente de acoplamiento (EDC) y un potenciador del acoplamiento (sulfo-NHS), que produce la proteína reticulada intermedia **2**. Este intermedio **2** reacciona a continuación (B2) con una molécula de aditivo que lleva un grupo carboxilo **a-adi** (R<sup>3</sup>-CO<sub>2</sub><sup>-</sup>), para formar la proteína reticulada conjugada **3**. El experto en la materia reconocerá que las dos etapas de reacción pueden unirse en una sola etapa, como se ilustra en la primera secuencia de reacción (B) ilustrada en el Esquema 2A de la FIG. 2, en la que la proteína reticulada **XLPr** reacciona con el aminoácido aa y el aditivo que lleva carboxilo **a-adi** en presencia de EDC y sulfo-NHS para formar la proteína reticulada conjugada con el aditivo **3**.

En otra reacción alternativa más mostrada en el Esquema 2, la proteína reticulada **XLPr** reacciona (C1) con un diácido **dia** o anhídrido diácido **diaan** en presencia de EDC y sulfo-NHS para formar el intermedio **4**, que tiene un grupo carboxilo libre disponible para una posterior reacción. Este grupo carboxilo libre puede formar un enlace amida (C2) con la amina en una molécula de aditivo **b-adi** (R<sup>5</sup>-NH<sub>2</sub>), p.ej. en presencia de EDC y sulfo-NHS para formar la proteína reticulada conjugada **5**. El experto en la materia reconocerá que estas dos etapas pueden llevarse a cabo en la misma mezcla de reacción, como se representa en la segunda secuencia de reacción (C) mostrada en el Esquema 2A de la FIG. 2.

Los Esquemas 3 y 3A, mostrados en las FIG. 3 y 4, respectivamente, muestran cómo se efectúa la reticulación seguida de conjugación del aditivo, en un tejido biológico. Haciendo referencia primero al Esquema 3 de la FIG. 3, en la primera etapa, se muestra la proteína Pr, que tiene múltiples restos amina y al menos un resto carboxilo. La proteína se reticula a continuación poniéndola en contacto con el agente de reticulación **diácido**, que es un diácido (o, como podrá apreciar el experto en la materia, un dianhídrido), en presencia de un agente de acoplamiento (EDC)

y un potenciador del acoplamiento (sulfo-NHS), que produce la proteína reticulada **XLPr**.

En una primera reacción alternativa (A) mostrada en el Esquema 3, la proteína reticulada **XLPr** reacciona con una molécula de aditivo **b-adi** ( $R^1-NH_2$ ), en presencia de un agente de acoplamiento (EDC) y un potenciador del acoplamiento (sulfo-NHS), que produce la proteína reticulada conjugada con el aditivo **6**. El experto en la materia  
5 reconocerá que, aunque  $R^1-NH_2$  puede ser una molécula de aditivo que tienen una amina libre en su estado nativo (tal como una proteína o un péptido), también puede representar una molécula de aditivo que se ha modificado para tener un grupo amina, p.ej. haciendo reaccionar un aditivo que lleva carboxilo (como una penicilina o cefalosporina) con una diamina como se describió anteriormente.

En otra reacción alternativa mostrada en el Esquema 3, la proteína reticulada **XLPr** reacciona (B1) con un agente de conjugación aminoácido ( $H_2N-R^2-CO_2^-$ ), en presencia de un agente de acoplamiento (EDC) y un potenciador del acoplamiento (sulfo-NHS), que produce la proteína reticulada intermedia **7**. Este intermedio **7** reacciona a  
10 continuación (B2) con una molécula de aditivo **b-adi** ( $R^3-CO_2^-$ ), para formar la proteína reticulada conjugada con aditivo **8**. El experto en la materia reconocerá que las dos etapas de reacción pueden unirse en una sola etapa, como se ilustra en la primera secuencia de reacción (B) ilustrada en el Esquema 3A de la FIG. 4.

En otra reacción alternativa mostrada en el Esquema 3, la proteína reticulada **XLPr** reacciona (C1) con una diamina **diam** en presencia de EDC y sulfo-NHS para formar el intermedio **9**, que tiene un grupo amina libre disponible para una posterior reacción. Este grupo amina libre puede formar un enlace amida (C2) con el grupo carboxilo en una molécula de aditivo **a-adi** ( $R^5-NH_2$ ), p.ej. en presencia de EDC y sulfo-NHS para formar la proteína reticulada  
15 conjugada con aditivo **10**. El experto en la materia reconocerá que estas dos etapas pueden llevarse a cabo en la misma mezcla de reacción, como se representa en la segunda secuencia de reacción (C) mostrada en el Esquema 3A de la FIG. 4.

De acuerdo con la presente invención, la reticulación del tejido y la conjugación del aditivo con el tejido tienen lugar en la misma etapa. Si bien se puede usar un reticulante en tales procesos, en algunas realizaciones se considera  
25 preferiblemente conjugar directamente el aditivo con la proteína. Como las proteínas de los tejidos tienden a tener grupos carboxilo libres y aminas libres, se considera posible conjugar adyuvantes que tienen al menos un carboxilo, al menos una amina, o ambos al menos un carboxilo y al menos una amina como cadenas laterales.

### Ejemplos

Los siguientes ejemplos se presentan como realizaciones ilustrativas, no limitantes de la presente invención. Aunque  
30 estos ejemplos se refieren a aditivos, tipos de tejidos y métodos específicos para unir los aditivos a los tejidos, el experto en la materia reconocerá que la presente invención no se limita a estos ejemplos ilustrativos, y se puede poner en práctica con aditivos, tipos de tejido y métodos de unión adicionales como se describe en el presente documento.

#### Ejemplo de referencia 1: Unión de glucosaminoglucanos a tejidos pericárdicos

El tejido pericárdico se estabilizó (reticuló) utilizando las técnicas definidas en la Patente de los EE. UU. N.º  
35 5.447.536 y en la Solicitud de Patente de los EE. UU. 11/276.398, presentada el lunes 27 de febrero de 2006. Después de la etapa de reticulación, los tejidos pericárdicos se expusieron a una solución del glucosaminoglucano (GAG) sulfato de condroitina 0,5 %-2,0 %) en presencia de EDC durante períodos de tiempo (2h durante la noche). Los tejidos se enjuagaron posteriormente y se esterilizaron usando los métodos descritos en las patentes de EE. UU. números 6.521.179; 6.506.339; y 5.911.951. Los niveles de fijación de GAG (glucosaminoglucano) en los tejidos se  
40 evaluaron por medios histológicos (tinción diferencial de cortes con PAS-azul alcian, donde los GAG se tiñen de azul, mientras que el colágeno se tiñe de rosa). Las imágenes de las FIG. 5A-5C, indican la unión de los GAG a través de la membrana pericárdica. La FIG. 5A muestra esencialmente la ausencia de tinción azul, que concuerda con la ausencia de unión de GAG al pericardio. La FIG. 5B muestra la tinción azul y rosa mixta, que concuerda con la unión parcial de GAG al pericardio. La FIG. 5C muestra una tinción azul casi completa, que es indicativa de la  
45 unión completa de GAG al pericardio.

#### Ejemplo de referencia 2: Evaluación de las etapas de unión

A continuación se evaluaron las diferentes etapas de procesamiento (reticulación, esterilización, etc.) para  
50 determinar las etapas de procesamiento del tejido durante las cuales se podrían unir los aditivos a los tejidos. Específicamente, este ejemplo indica los diversos métodos para generar un tejido estéril con aditivos unidos de forma estable. Una esponja de colágeno Tipo 1 que había sido sometida a varias etapas intermedias de procesamiento se puso en contacto con una solución de sulfato de condroitina (como un ejemplo de aditivo) y EDC. Las FIG. 6A y 6B, muestran cortes histológicos a pequeño y gran aumento de una esponja de colágeno Tipo 1 unida a GAG, en la que la unión a GAG se llevó a cabo durante la esterilización del tejido. La FIG. 7B muestra la esponja de colágeno Tipo 1 unida a GAG, en la que GAG se unió al tejido durante la reticulación. Como se aprecia a partir de

las FIG. 6A, 6B y 7B, la unión de GAG a la esponja de colágeno durante la esterilización dio como resultado una unión difusiva, mientras que la unión del GAG al tejido durante la reticulación produjo una unión ajustada.

### **Ejemplo de referencia 3: Unión de aditivos a diferentes tipos de tejido**

5 Para demostrar la aplicabilidad de los métodos de la presente invención a diversos tipos de tejidos a base de colágeno, se trataron tres tipos diferentes de tejidos de acuerdo con la presente invención. Primero se reticularon tres tipos diferentes de tejidos (pericardio, hueso esponjoso desmineralizado y una esponja de colágeno hecha de colágeno tipo I solubilizado) y a continuación se expusieron a sulfato de condroitina en presencia de EDC. Los tejidos se enjuagaron posteriormente y se esterilizaron usando los métodos descritos en las patentes de EE. UU. 6.521.179; 6.506.339; y 5.911.951. Los niveles de fijación de GAG en los tejidos se evaluaron por medios  
10 histológicos (tinción diferencial de cortes con PAS-azul alcian). Las imágenes de las FIG. 7A y 7B indican una unión uniforme de GAG en tejidos de hueso esponjoso y esponja de colágeno.

### **Ejemplo de referencia 4: Unión de ácido hialurónico a tejidos biológicos**

15 Para demostrar que los métodos de acuerdo con la invención pueden usarse para unir diversos aditivos a los tejidos, se unieron sulfato de condroitina y ácido hialurónico (HA) a la matriz de colágeno estabilizada. Los resultados de la unión de sulfato de condroitina a la matriz de colágeno se han analizado anteriormente en referencia a las FIG. 5A-7B. El ácido hialurónico se unió a la matriz de colágeno esencialmente como se describió anteriormente en los Ejemplos 1-3 para el sulfato de condroitina, sustituyendo el ácido hialurónico por sulfato de condroitina en la etapa de unión. Los cortes histológicos que muestran ácido hialurónico unido a la esponja de colágeno se muestran en las FIG. 8 A y 8B, representando la FIG. 8B una imagen de gran aumento del resultado mostrado en la FIG. 8A. Un  
20 corte histológico de ácido hialurónico unido al pericardio se muestra en la FIG. 8C.

### **Ejemplo de referencia 5: Unión de IGF-1 a una esponja de colágeno**

25 Como otro ejemplo más de unión de un aditivo a una matriz de colágeno, IGF-1, que se considera representativo de los factores de crecimiento, se unió a una esponja de colágeno, esencialmente por los métodos descritos anteriormente con referencia al sulfato de condroitina en los Ejemplos 1-3. El éxito de la unión de IGF a la esponja de colágeno se midió usando un ensayo ELISA inverso. En este modelo, se incubó una solución de anticuerpo anti-IGF-1 en contacto con una esponja de colágeno no unida a IGF-1 (control) y una esponja de colágeno unida a IGF-1. El éxito de la unión de IGF-1 a la esponja de colágeno venía indicada por una reducción de la señal del ELISA para la solución de anticuerpo anti-IGF-1 después del período de incubación. Como puede observarse en la FIG. 8D, el  
30 ensayo ELISA inverso demuestra una señal deprimida de IGF-1 para la esponja unida a IGF-1 en comparación con la esponja de control. Así, los resultados mostrados en la FIG. 8D demuestran que IGF-1 se unió con éxito a la esponja de colágeno en presencia de EDC.

### **Ejemplo de referencia 6: Estabilidad de los tejidos modificados con aditivo**

35 Con el fin de demostrar la estabilidad de los tejidos de colágeno modificados con aditivo de acuerdo con la presente invención, se evaluó la estabilidad del sulfato de condroitina unido al pericardio reticulado y esterilizado (preparado esencialmente como en el Ejemplo 1 anterior) después de 2 meses de almacenamiento a temperatura ambiente. Las tinciones histológicas específicas de los GAG (es decir PAS-azul alcian) indican el éxito de la retención de los GAG unidos a la membrana reticulada y esterilizada. Esto demuestra que los métodos del método de acuerdo con un ejemplo de referencia permiten preparar, esterilizar y almacenar tejidos de colágeno con aditivos unidos que son estables en forma hidratada a temperatura ambiente. Estos resultados se muestran en las FIG. 5A-5C.

### **Ejemplo de referencia 7: Biocompatibilidad de los tejidos modificados con aditivo**

45 Se llevó a cabo el siguiente experimento para demostrar la biocompatibilidad de un tejido preparado por los métodos de acuerdo con un ejemplo de referencia. En particular, se evaluó la biocompatibilidad para la esponja de colágeno esterilizada que tiene aditivo unido a la misma mediante los métodos de acuerdo con un ejemplo de referencia. La esponja de colágeno reticulada y esterilizada que tenía sulfato de condroitina unida a la misma se elaboró mediante métodos de un ejemplo de referencia y se sometió a evaluaciones a base de cultivos celulares. Los condrocitos primarios se sembraron sobre esponjas de colágeno esterilizadas con o sin un aditivo (sulfato de condroitina) unido. Las esponjas de colágeno sembradas se incubaron a continuación en un incubador humidificado (37 °C, con CO<sub>2</sub> al 5 %, medio MEM basal con suero fetal de ternera al 10 %). La viabilidad y la actividad metabólica de las células sembradas se evaluó mediante el ensayo MTT, que mide la actividad mitótica (y, por tanto, la viabilidad) de las células unidas. Los  
50 resultados de la FIG. 9 demuestran una ventaja reconocible en el crecimiento celular, que se confiere por la presencia de sulfato de condroitina (con condrocitos humanos y bovinos, a los 7 días y 14 días de cultivo, respectivamente).

Las Figuras 10A y 10B muestran imágenes de microscopía a pequeño y gran aumento, respectivamente, de los cultivos tras la adición de MTT. Las células viables se tiñen de púrpura y la presencia de una matriz recién sintetizada se ve alrededor de las células como una delgada capa fibrinosa. La Figura 10C es una imagen de gran aumento de la esponja que muestra la apariencia de una matriz recién sintetizada, que ha sido producida por los condrocitos sembrados.

#### **Ejemplo de referencia 8: Implantación de tejidos modificados con aditivo en animales vivos**

La estabilidad y compatibilidad de los tejidos con aditivos añadidos también se probaron después de la implantación en animales pequeños. En resumen, muestras seleccionadas de los ejemplos anteriores se implantaron por vía subcutánea en ratas. Los explantes fueron recuperados 4 semanas después, y se prepararon cortes a partir de los explantes. Estos cortes se procesaron histológicamente y se tiñeron para evaluar la presencia de los aditivos, así como la naturaleza de los infiltrados celulares. La FIG. 11A demuestra la respuesta de una esponja de colágeno modificada con sulfato de condroitina. La tinción diferencial con PAS-azul alcian indica la presencia continua de GAG incluso a las 4 semanas después de la implantación. La liberación lenta de GAG es evidente por la apariencia difusa de la mancha azul en áreas seleccionadas (FIG. 11A). La naturaleza de los infiltrados celulares en las muestras indica una respuesta biocompatible del hospedador (es decir, ausencia de una inflamación patente y activa, aparición de una nueva matriz y vasos sanguíneos entre los soportes de colágeno de los tejidos (Fig. 11B).

La presente invención permite el enlace covalente (unión) de varios aditivos a diversos tipos de tejidos biológicos. Los tejidos biológicos pueden estar totalmente, parcialmente reticulados o sin reticular. Los tejidos biológicos unidos al aditivo son estables en el tiempo y son biocompatibles. Los tejidos biológicos unidos al aditivo estimulan la remodelación, la regeneración y la cicatrización de los tejidos. Así, los tejidos biológicos unidos a aditivos de acuerdo con la presente invención son útiles como implantes para una variedad de usos terapéuticos. Los métodos para unir aditivos a tejidos biológicos de acuerdo con la invención se pueden usar por tanto en una variedad de entornos terapéuticos.

Aunque las realizaciones preferidas de la presente invención se han mostrado y descrito en el presente documento, será obvio para los expertos en la materia que tales realizaciones se proporcionan solo a modo de ejemplo. Numerosas variaciones, cambios y sustituciones se les ocurrirán ahora a los expertos en la materia sin apartarse de la invención. Debería entenderse que se pueden emplear varias alternativas a las realizaciones de la invención descritas en el presente documento para llevar a la práctica la invención.

**REIVINDICACIONES**

1. Un proceso para fabricar un bioimplante esterilizado químicamente que comprende un tejido biológico y heparina, en el que la heparina se conjuga covalentemente directamente con el tejido biológico, y el bioimplante se esteriliza usando una carbodiimida, comprendiendo el método:
- 5     (a) poner en contacto un tejido biológico con heparina para formar una combinación; y  
      (b) esterilizar simultáneamente la combinación usando una carbodiimida y conjugar directamente heparina con el tejido biológico usando la carbodiimida.
2. El proceso de la reivindicación 1, que comprende congelar y luego liofilizar la combinación entre las etapas (a) y (b).
- 10  3. El proceso de las reivindicaciones 1-2, en el que el tejido biológico comprende tejido procesado en forma nativa, tejido procesado en forma no nativa, un composite o un complejo de composite.
4. El proceso de las reivindicaciones 1-3, en el que la carbodiimida es EDC.
5. El proceso de las reivindicaciones 1-4, en el que dicha esterilización se realiza en presencia de un alcohol.
6. El proceso de la reivindicación 5, en el que el alcohol es un alcohol C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>.
- 15  7. El proceso de la reivindicación 5, en el que el alcohol es isopropanol.

FIG. 1

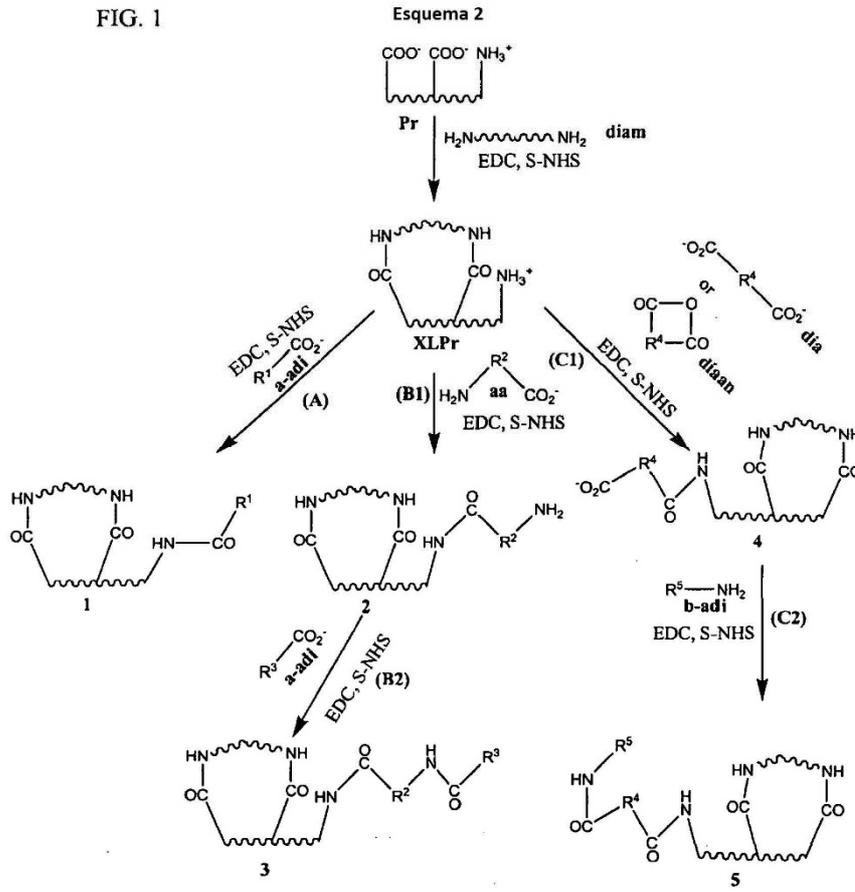


FIG. 2

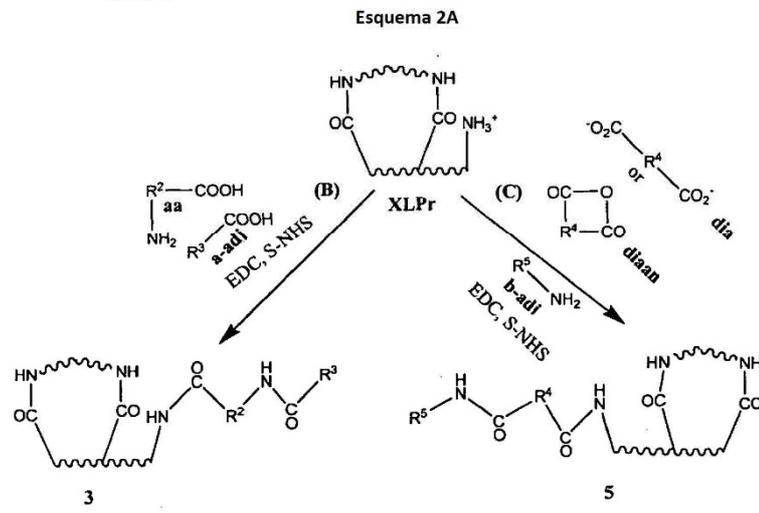


FIG. 3

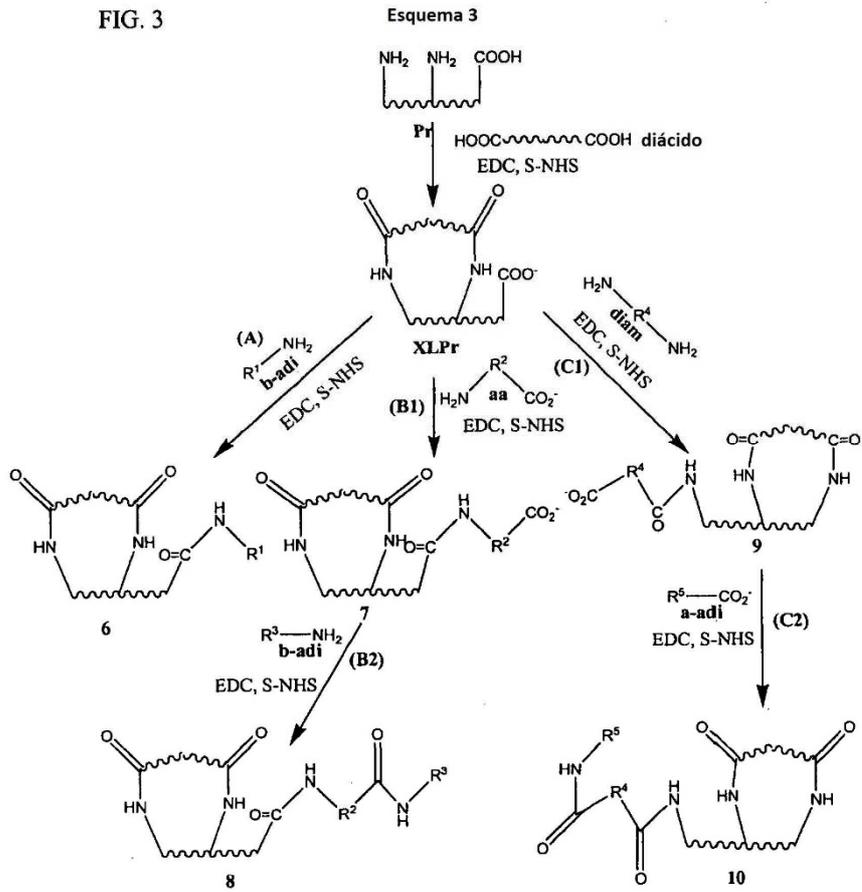
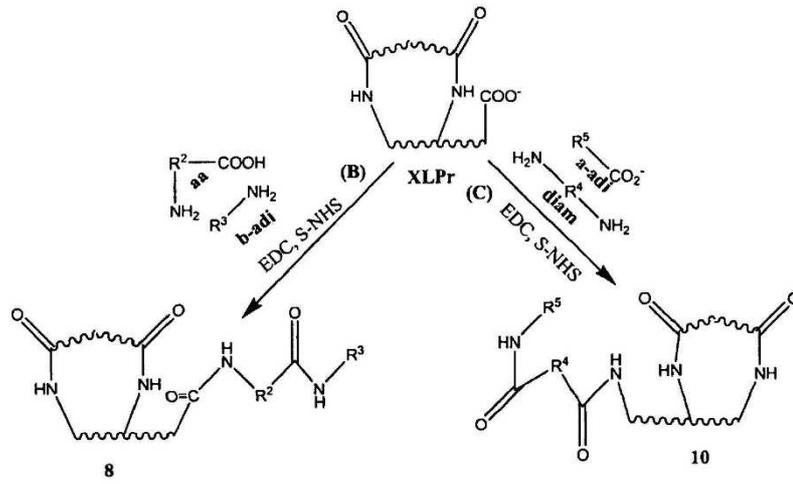
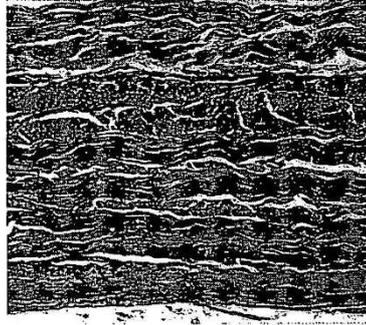


FIG. 4

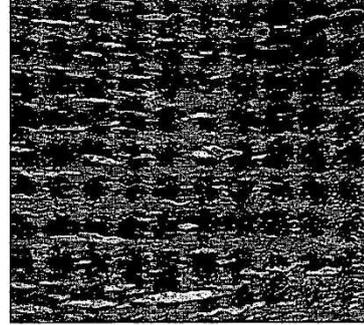
Esquema 3A



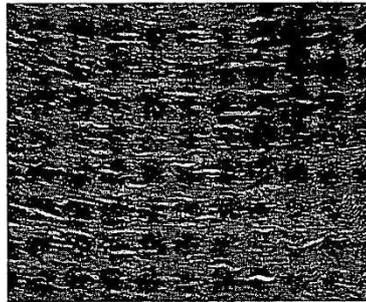
**FIG. 5A** Pericardio control



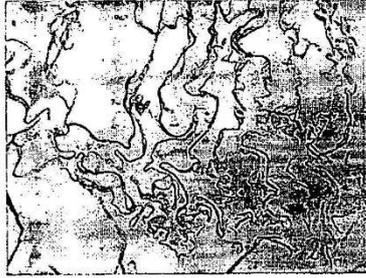
**FIG. 5B** Pericardio GAG parcial



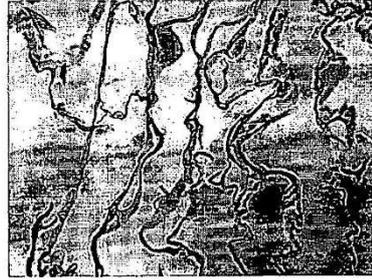
**FIG. 5C** Pericardio GAG completo



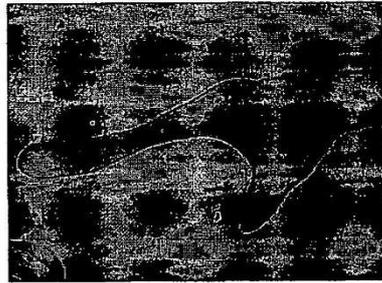
**FIG. 6A**



**FIG. 6B**



**FIG. 7A** GAG-Hueso esponjoso



**FIG. 7B** GAG-Esponja de colágeno Tipo I



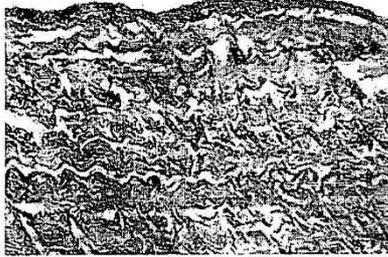
**FIG. 8A** AH-Esponja de colágeno



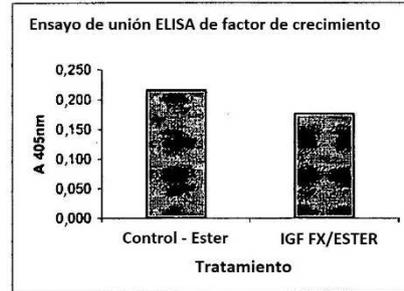
**FIG. 8B** AH-Esponja de colágeno



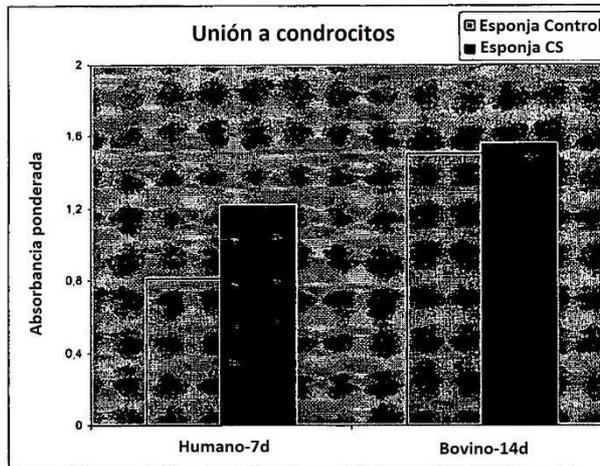
**FIG. 8C** AH-Pericardio



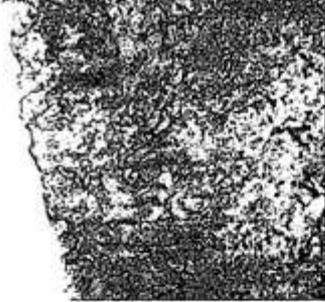
**FIG. 8D** Esponja de IGF-1 Colágeno



**FIG. 9** – Ensayo de viabilidad celular (Ensayo MTT)



**FIG. 10A** GAG-Esponja+Células (Peq aum)



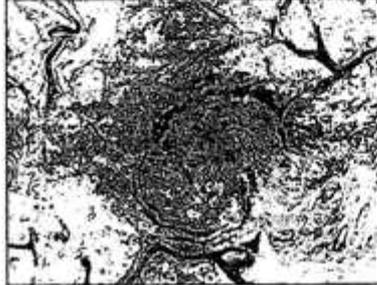
**FIG. 10B** GAG-Esponja+Células (Gran aum)



**FIG. 10C** GAG-Esponja+Células (nueva matriz)



**FIG. 11A** GAG-Esponja 1 mes (PAS-AB)



**FIG. 11B** GAG-Esponja 1 mes (H-E)

