



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 272 607**

51 Int. Cl.:
A61L 27/28 (2006.01)
A61L 27/56 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **02011899 .8**
86 Fecha de presentación : **29.05.2002**
87 Número de publicación de la solicitud: **1275405**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **15.01.2003**

54 Título: **Injerto con matriz proteínica porosa y procedimiento para su elaboración.**

30 Prioridad: **13.07.2001 DE 101 35 275**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.05.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.05.2007

73 Titular/es: **JOTEC GmbH**
Im Lotzenacker 3
72379 Hechingen, DE

72 Inventor/es: **Simmoteit, Robert y**
Fischer, Heike

74 Agente: **Isern Jara, Jorge**

ES 2 272 607 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

Injerto con matriz proteínica porosa y procedimiento para su elaboración.

El invento hace referencia a un injerto y al procedimiento para su elaboración.

Del estado actual de la técnica ya se conocen varios tipos de injertos y de procedimientos para su elaboración.

Las estructuras injertables en combinación con células se aplican sobre todo en el ámbito de la ingeniería tisular, un campo de investigación interdisciplinario que se ocupa de las metodologías y los materiales para la elaboración de sistemas de tejidos y órganos "artificiales". Así pues, es posible aplicar injertos, por ejemplo, de piel, de hueso, de cartílago, de cristalino o de vasos, fabricados artificialmente.

En la cirugía vascular se aplican injertos de luz pequeña sobre todo cuando los vasos propios del paciente no son viables. Esto ocurre, por ejemplo, cuando se necesita una longitud de vaso determinada o cuando los vasos autólogos no son aplicables por sus características patofisiológicas. En dicho caso se aplican prótesis vasculares artificiales, para las que se usan materiales tales como hilados de politereftalato de etileno (PET) (nombre comercial del dacrón) o de politetrafluoretileno expandido (ePTFE).

Se prefiere utilizar injertos vasculares fabricados a partir de estas sustancias, puesto que poseen propiedades beneficiosas en cuanto a estructura y biocompatibilidad. Así, por un lado se permite el crecimiento del tejido circundante y por otro se impide la salida de plasma sanguíneo a través de los poros. En el caso de los injertos de ePTFE, eso se consigue ajustando el tamaño de los poros, mientras que los injertos de hilado de PET se impregnan con una membrana de material reabsorbible como, por ejemplo, colágeno o gelatina. Tras la implantación, la membrana queda reabsorbida en la medida en que el tejido nuevo circundante crezca hacia el interior de la capa porosa de colágeno.

Si se emplean materiales artificiales recubiertos de colágeno por una sola cara, en el caso de las prótesis vasculares de luz pequeña, por ejemplo, se corre el riesgo de que, debido a que la superficie extraña de la luz interior queda expuesta, se induzca la coagulación sanguínea y el vaso implantado se ocluya muy rápidamente. Esto sucede porque el contacto de una corriente sanguínea lenta con una superficie artificial puede provocar la activación del sistema de coagulación, del sistema del complemento y del sistema inmune.

Por ese motivo, no pueden utilizarse dichas prótesis para vasos de luz pequeña ($\varnothing < 6$ mm), ya que existe el riesgo de una oclusión rápida del vaso.

Otros enfoques más desarrollados prevén para evitar la coagulación una colonización de los injertos con células, por ejemplo, células endoteliales o fibroblastos.

Las células endoteliales revisten la superficie de los vasos sanguíneos humanos. La colonización de la luz de la prótesis vascular con este tipo de célula proporciona a la corriente sanguínea una superficie con unas características que reducen la activación de los sistemas de coagulación y del complemento. El cultivo de prótesis vasculares con fibroblastos y células endoteliales -como se muestra, por ejemplo, en el documento PCT 98/01782- fomenta el arraigo del injerto en el tejido circundante y la estabilización de la capa de células endoteliales en la luz interior.

Así pues, resulta de gran importancia para la funcionalidad de los injertos la interacción de los distintos tipos de células que están presentes, por ejemplo, en los vasos naturales. Aparte de una elevada biocompatibilidad, también debe garantizarse que la estructura del implante pueda ajustarse a las características de las distintas células.

Otro enfoque consiste en la utilización de vasos acelularizados de origen animal. En el documento US 5.899.936 se colonizan vasos con células autólogas, después de haberlos desprovisto de sus componentes celulares, y luego se injertan.

Una desventaja importante de estos enfoques la representa el hecho de que los injertos no pueden fabricarse de forma adaptada al paciente, sino que su longitud y tamaño dependen del animal donante. Además, no están del todo claros los riesgos de transmisión de enfermedades por virus o priones a través de dichos tejidos.

Otro inconveniente consiste en el hecho de que no es posible insertar una estructura de apoyo adicional en un injerto fabricado de este modo para aumentar la estabilidad. Asimismo, las estructuras acelularizadas sólo pueden conservarse en determinadas circunstancias. El nuevo debate sobre los xenotransplantes agrega un nuevo motivo para preferir las prótesis vasculares fabricadas tecnológicamente.

En otros enfoques experimentales se pretende desarrollar injertos completamente reabsorbibles compuestos por materiales artificiales como son el ácido poliglicólico o el poliláctido. Estos materiales son sustituidos por tejido propio del cuerpo en el proceso de curación de heridas. Una ventaja de estos injertos consiste en el hecho de que los materiales se regeneran completamente y no queda rastro de los materiales artificiales, los cuales podrían provocar infecciones, en el interior del cuerpo. El inconveniente de estos injertos es que afectan al crecimiento celular durante la reabsorción, por ejemplo, desplazando el pH en la descomposición del poliláctido, y dificultando el control de la regeneración del tejido ya que una reabsorción temprana puede provocar el fracaso del injerto.

En el documento WO 00/47129 se describe un procedimiento para fabricar una membrana reabsorbible mediante un patrón con una estructura tridimensional. En este caso, la membrana también puede estar constituida con material artificial no reabsorbible y, en su caso, estar recubierta con una matriz proteínica.

Este procedimiento tiene la desventaja de que la fabricación de la membrana de estructura tridimensional es muy costosa. En primer lugar, deben fabricarse los patrones para las distintas membranas necesarias en cada caso antes de poder producir la estructura de apoyo en sí misma.

El documento US 4.787.900 describe un procedimiento en el que se recubre una estructura interna de material reabsorbible con una capa externa también de material descomponible. Ambas capas pueden colonizarse con células posteriormente. El inconveniente de este procedimiento es el hecho de que la estructura externa no puede adaptarse a las características del entorno en el que se va a implantar. Además, la fabricación de la capa externa en este procedimiento está ligada a pasos muy costosos, ya que la estructura externa, después de un proceso de liofilización, debe recortarse al grosor de capa deseado, lo que supone un desperdicio de material considerable.

Los injertos deben poseer también determinadas características mecánicas y estructurales. Así, aparte de presentar una estabilidad estructural suficiente, deben demostrar un comportamiento de fuerza y extensión en concordancia con el tejido al que sustituyen. Asimismo, los injertos deben poseer distintas formas, longitudes y diámetros. Además, la microestructuración, como, por ejemplo, la estructura porosa, desempeña una función importante para la colonización con células o para el crecimiento del nuevo tejido. Los injertos deben destacar además por el hecho de que no desencadenen alergias ni reacciones inmunológicas y que puedan adaptarse al tejido en cuestión sobre el que se van a implantar.

Así pues, el objetivo del invento consiste en idear un injerto y un procedimiento para elaborarlo en el que el injerto se coloniza con distintos tipos de células y se impide un encapsulamiento de la estructura extraña o (en caso de una prótesis vascular) un taponado.

En el proceso mencionado al principio este objetivo se soluciona según el invento mediante la fabricación de un injerto con una estructura extraña estructurada y una matriz proteínica porosa anclada, al menos parcialmente, en la estructura extraña con una estructura de poros orientada; en dicho injerto se utiliza como estructura extraña un material que se ha seleccionado entre un material artificial, resistente y estructurado, un material artificial, reabsorbible y estructurado y un material natural estructurado o una combinación de los materiales mencionados; el procedimiento por su parte incluye los siguientes pasos: a) preparación de la estructura extraña, b) aplicación de una suspensión, dispersión o pasta con colágeno o componentes solubles no colagénicos, c) colocación, al menos parcial, de la suspensión, la dispersión o la pasta en la estructura extraña por presión, vacío o centrifugación, d) refrigeración por una cara de una superficie de la suspensión, la dispersión o la pasta y aislamiento simultáneo de la otra superficie.

Además, el objetivo se soluciona a través de un injerto con una matriz proteínica anclada, al menos parcialmente, en una estructura extraña estructurada con una estructura porosa orientada, en el cual se utiliza para la estructura extraña un material seleccionado entre un material artificial resistente y estructurado, un material artificial, reabsorbible y estructurado y un material natural estructurado o una combinación de los materiales mencionados.

La estructura extraña puede desempeñar varias funciones, como, por ejemplo, una función de apoyo o la función de barrera contra la pérdida de humedad y las infecciones. Esto último, por ejemplo, puede ser necesario en el caso de un injerto de piel. Otra posible función de la estructura extraña es el abastecimiento de alimento en injertos de luz grande. En ese caso la estructura extraña puede adquirir la forma de red de fibras huecas o como mínimo poseer algunas fibras huecas.

En la colonización del injerto según el invento con células, éstas pueden emigrar progresivamente a lo largo de las fibras proteínicas hacia la matriz, ya que la estructura porosa y el tamaño de los poros puede adaptarse específicamente a cada tipo de célula.

Con el anclaje de la matriz proteínica de estructura porosa orientada en la estructura extraña además se garantiza una estabilidad suficiente del injerto en su totalidad.

En una realización preferente del procedimiento según el invento se utiliza como estructura extraña un material artificial resistente que se selecciona a partir de un grupo que comprende politetrafluoretileno, poliuretano, poliestirol, poliéster, cerámica o metales.

En los últimos años se ha impuesto el uso de politetrafluoretileno expandido (ePTFE) como el material artificial preferido para los injertos. Este material es poroso y tiene una estructura que permite que, en caso de implante, no crezcan las células en él. En estos injertos vasculares correspondientes al estado de la técnica se consigue, gracias a la composición de los poros, que no escape por ellos ningún líquido (incluida sangre).

En otra realización preferente del procedimiento según el invento, se emplea como estructura extraña estructurada un material artificial reabsorbible que se selecciona a partir de un grupo que incluye poliláctido, ácido poliglicólico, polihidroxialcanoato o copolímeros de éstos.

En dicha realización no se excluye la utilización de otros materiales naturales reversibles como material extraño estructurado seleccionados a partir de un grupo que comprende la quitina, la celulosa, el colágeno o la hidroxilapatita (fosfato cálcico). Estos pueden aplicarse, por ejemplo, como material extraño en forma de película estructurada superficialmente. Entre los compuestos de fosfato cálcico se encuentran, por ejemplo, la apatita, el fosfato tricálcico y el trifosfato tetracálcico, combinado con hidróxido cálcico.

De manera alternativa, la estructura extraña estructurada puede estar compuesta por combinaciones de los materiales mencionados anteriormente.

La forma de la estructura extraña puede seleccionarse libremente. Así, puede adoptar una forma plana para injerto de piel o tubular en el caso de los injertos vasculares, pudiendo adquirir esta forma tubular distintas configuraciones como, por ejemplo, de tubo bifurcado o no bifurcado, etc. Para otras finalidades de aplicación como, por ejemplo, cartílagos o huesos, puede conformarse también como cilindro, rectángulo o válvula cardíaca. Cuando la estructura extraña posee fibras huecas, éstas pueden estar insertadas en la matriz proteínica y servir de conductos para el abastecimiento de nutrientes a las células con las que ésta puede colonizarse.

En el procedimiento según el invento la matriz proteínica se fabrica a partir de una suspensión, dispersión o pasta con colágeno y componentes solubles no colagénicos.

El colágeno es la proteína más abundante en el cuerpo humano y forma parte esencial de la matriz extracelular de la piel, los vasos, los huesos, los tendones, los cartílagos, los dientes, etc. Es preferible la utilización de colágeno nativo puesto que el colágeno como biomaterial presenta toda una serie de propiedades positivas.

Las sustancias acompañantes no colagénicas pueden ser factores de crecimiento, principios activos u otros componentes de la matriz extracelular como la elastina, la laminina, la fibronectina, el ácido hialurónico o el glucosaminoglucano. Los componentes solubles comprenden, por un lado, ácidos como el HCl, el ácido acético o el ácido ascórbico, puesto que, como ya se sabe, el rango de pH óptimo para la fabricación de esponjas de colágeno liofilizadas se encuentra entre 2,5 y 3,5. Por otro lado, los aditivos solubles como la glicerina o el etanol o finamente dispersos

como el fosfato cálcico, etc., pueden emplearse como sustancias acompañantes ya que, gracias a su concentración, puede ajustarse la morfología de los cristales de hielo y, con ello, la estructura porosa.

En el procedimiento según el invento, se aplica uniformemente la suspensión sobre la estructura extraña y por medio de presión, vacío o centrifugación se inserta en ésta, como mínimo de forma parcial.

Mediante la aplicación uniforme de la suspensión se garantiza la formación de un grosor de capa unitario, lo cual hace innecesario el corte o el procesamiento posteriores y ahorra pasos de trabajo complementarios. En este proceso, se pueden obtener grosores de entre 0,1 y 5 cm. Los procedimientos de presión, vacío o centrifugación se pueden regular de tal manera que se controle la suspensión y se introduzca en la estructura extraña estructurada/porosa con una profundidad determinada. Al llevar a cabo esta acción es beneficioso controlar la temperatura del ensayo, ya que la viscosidad de la suspensión depende de esta magnitud.

Además, en el procedimiento según el invento, la estructura porosa orientada de la matriz proteínica se forma por refrigeración unilateral de una superficie y el aislamiento simultáneo de la otra superficie. Durante el proceso se controla por una cara la refrigeración de la suspensión proteínica de forma continuada o escalonada, mientras que la otra cara se limita con un aislante como, por ejemplo, aire, gases o teflón. Durante el proceso de congelación la suspensión puede cristalizarse parcial o completamente. Los colágenos y las sustancias disueltas son apartadas en su gran parte del frente celular en la fase de hielo que es cada vez mayor, mientras que las proteínas suspendidas y las sustancias disueltas o dispersadas se concentran arriba, entre los cristales de hielo. Mediante la velocidad de congelación y la composición química de la suspensión proteínica se puede establecer ventajosamente la estructura y el tamaño de los cristales de hielo a un grosor de capa determinado.

El documento WO 99/27315 expone un procedimiento de congelación en el cual, a diferencia de lo descrito anteriormente, se congelan a la vez dos caras opuestas entre sí. Este impreso, no obstante, parte de la base de que la congelación unilateral es negativa y que no produce una estructura porosa orientada.

Sin embargo, como se pudo demostrar en el procedimiento según el invento, durante el proceso de congelación unilateral los cristales de hielo también crecen casi al mismo tiempo que el gradiente térmico y de forma orientada a través de la muestra. Estando la suspensión proteínica insertada en la estructura extraña, los cristales de hielo también crecen parcialmente en dicha estructura extraña.

Se prefiere una estructura porosa orientada ya que así puede adaptarse óptimamente la estructura a cualquier tejido. La adaptación de la estructura y el tamaño de los poros mejora la migración del tejido circundante.

También es preferible establecer el tamaño de los poros de la matriz proteínica entre 5 μm y 500 μm .

En el proceso de liofilización los cristales de hielo se subliman originando espacios vacíos que se corresponden con la estructura de poros orientados. De este modo, al implantarse, las células del tejido circundante pueden crecer a lo largo de las fibras penetrando en el injerto. Por la deshidratación durante la sublimación, se forman enlaces covalentes entre las moléculas

de colágeno, con lo que la matriz adquiere la estabilidad deseada. En este caso es positivo que se pueda determinar específicamente el grado de reticulación mediante el proceso de liofilización o mediante manipulación química del producto liofilizado. La matriz proteínica obtenida tras el proceso de liofilización se ancla directamente en la estructura extraña y ya no se precisan más pasos para unir la estructura extraña con la matriz proteínica.

Por otro lado, es preferible esterilizar la estructura tras el proceso de liofilización. Se trata de un requisito deseable para el almacenamiento o la utilización directa de las estructuras.

A partir de ese momento, puede injertarse directamente la estructura o, en una realización preferible del procedimiento según el invento, colonizarse con células. Para ello pueden emplearse y, seguidamente, cultivarse células donantes, células madre o líneas celulares xenogénicas, alogénicas o autólogas. Esta colonización se realiza preferentemente en un biorreactor con carga fisiológica, empleando en función del uso final un cocultivo de los tipos celulares presentes en el tejido natural, los cuales pueden aplicarse a la estructura en momentos diferentes.

La estructura puede cultivarse hasta que se produzca la adhesión firme de las células o bien puede incubarse hasta el momento en que ocurra una descomposición o una conversión de los componentes reabsorbidos. La duración del cultivo dependerá en cada caso de la forma de la estructura y de las células aplicadas.

Esto tiene la ventaja de que, por ejemplo, los injertos vasculares pueden proveerse con una capa interna de células epiteliales evitando así la generación de trombos o la calcificación del injerto, sobre todo al emplear células donantes autólogas.

Asimismo, según convenga, antes de la implantación puede cargarse o recubrirse la estructura con principios activos como, por ejemplo, hirudina, aspirina, heparán sulfato, albúmina o similares. La emisión de los principios activos puede controlarse, preferentemente, mediante una capa adicional aplicada de hidrogel o mediante el tipo de enlace de los principios activos.

Gracias al invento, se consigue con medios simples que el injerto pueda adaptarse de forma fácil y eficiente a las necesidades específicas del tejido circundante mediante la formación de una estructura porosa orientada. Al mismo tiempo, los injertos fabricados conforme al procedimiento que describe el presente invento destacan por su estabilidad mecánica y su compatibilidad biológica. Además, la estructura puede fabricarse en muy diversas formas geométricas y utilizarse, además de otros campos, en aplicaciones farmacéuticas o cosméticas o en la reconstrucción tisular.

El procedimiento ofrece la posibilidad de fabricar injertos con un buen grado de reabsorbibilidad en pocos pasos y sin un gasto técnico o material excesivo, y con una proporción de material extraño limitada.

Las cantidades de material aplicable, en especial en la matriz proteínica, pueden calcularse con exactitud de forma que se evite un gasto de material innecesario. Al mismo tiempo puede obtenerse el grosor de capa deseado del injerto. Con el procedimiento es posible fabricar matrices proteínicas con grosores de capa de entre 0,1 y 5 cm.

Resulta muy sencillo calcular la forma deseada de

una estructura porosa y puede fabricarse con medios simples, de modo que se evitan construcciones costosas, como los patrones, y se obtiene una ventaja considerable en cuanto a tiempo y dinero.

A continuación, se describe el resto de ventajas con ayuda de los dibujos adjuntos.

Se entiende que las características que se han mencionado anteriormente y que se presentarán a continuación no tienen por qué emplearse en la combinación aquí expuesta, sino que pueden utilizarse en otras combinaciones o de forma independiente sin que por ello se superen los límites del presente invento.

En los dibujos se representan ejemplos de realización del invento, los cuales se describen a continuación con mayor detalle. Las figuras muestran lo siguiente:

La figura 1 muestra una representación detallada en sección de un ejemplo de realización de un injerto según el presente invento;

La figura 2 muestra una sección transversal de otro ejemplo de realización de un injerto según el presente invento, en concreto, una prótesis vascular;

La figura 3 muestra un ejemplo de régimen de temperatura correspondiente a una congelación unilateral controlada;

La figura 4 muestra un dispositivo para la fabricación de un injerto con estructura porosa orientada;

La figura 5 muestra una representación en sección aumentada del dispositivo de la figura 4.

En la figura 1 se representa globalmente con el número 10 un injerto con una estructura extraña interna 11 con poros cerrados 12 y poros abiertos 13, que atraviesan toda la estructura, y además con una matriz proteínica 14 compuesta por fibras largas de proteínas 15. Las fibras de proteínas 15 están dispuestas en finas películas de proteínas 16 y en fibras de proteínas cortas 17, las cuales forman juntas los poros 18.

Durante el proceso de fabricación, se ancla la matriz proteínica 14 en la estructura extraña 11, la cual está estructurada en poros cerrados 12 y abiertos 13. La matriz proteínica 14 está compuesta de fibras proteínicas 15 en enlace covalente que, debido al procedimiento de fabricación que se describirá más adelante y la anisotropía del hielo, que forman películas proteínicas 16 muy finas y están unidas entre sí por medio de varias fibras proteínicas cortas 17. Los poros abiertos 13 de la estructura extraña 11 son grandes en comparación con los poros 18 de la matriz proteínica 14, de modo que la estructura de la matriz proteínica 14 puede prolongarse sin obstáculos en los poros 13 de la estructura extraña 11. La matriz proteínica 14 queda estabilizada frente a influencias mecánicas por medio de la unión directa con la estructura extraña 11. En los poros 18 de la matriz proteínica 14 pueden absorberse células y fluidos, actuando la película proteínica 16 y las fibras proteínicas cortas 17 como superficies de adhesión para dichas células. Al utilizarse colágeno como componente proteínico, las células fijadas pueden convertir el material de apoyo reabsorbible en una matriz extracelular perteneciente al propio cuerpo.

En la figura 2 se muestra una prótesis vascular 20 que se ha fabricado según el procedimiento conforme al presente invento. En este injerto, se ha anclado profundamente una matriz proteínica 21 en una estructura extraña 22. La pared interna 23 de la prótesis vascular 20 conforma el límite de la luz 24. La matriz proteínica 21 está compuesta por fibras proteínicas 25 con poros 26. Las fibras proteínicas 25 están en con-

tacto directo con la luz 24 a través de los poros 27 de la estructura extraña 22.

La estructura extraña 22 proporciona a la prótesis 20 una estabilidad suficiente. En el interior de los poros orientados 26 de la matriz proteínica 21 pueden crecer ininterrumpidamente células como, por ejemplo, los fibroblastos. Adicionalmente, la pared interior 23 de la prótesis vascular 20 puede colonizarse con células endoteliales para evitar la trombogenicidad de la prótesis.

En este punto debe hacerse notar que la prótesis vascular mostrada en la figura 2 sólo es una realización de ejemplo. El invento se puede aplicar en otras formas y para otras funciones, por ejemplo, como parches en injertos de piel, en forma de cilindro o rectángulo en injertos de cartílagos y huesos o en válvulas cardíacas.

Mediante el procedimiento pueden fabricarse injertos con matrices proteínicas de distintos grosores de capa. Para obtener un grosor de capa determinado, se debe aplicar un régimen de temperatura específico.

La figura 3 muestra el régimen de temperatura de una suspensión de colágeno a una velocidad constante de enfriamiento de -9 K/min para distintos grosores de capa, expresado en función del tiempo. Los regímenes de temperatura se han medido para los siguientes grosores de capa d: 2,5; 2; 1,5; 1 y 0,5 cm. El punto de medición 30 del régimen de temperatura está representado esquemáticamente en la sección situada a la derecha del diagrama. La zona d delimitada por las flechas 31 representa el grosor de la matriz proteínica (en este caso compuesta de colágeno). El número 32 designa una sustancia artificial que hace las funciones de estructura extraña. Las flechas 33 indican la dirección de la refrigeración. Así pues, tenemos que para un grosor de pared de 1 cm son necesarios entre 10 y 15 min para alcanzar una temperatura de -50°C. La curva inferior 33 del diagrama muestra el régimen de temperatura para un grosor de pared de < 1 mm. Para estos grosores de pared se obtiene por extrapolación un tiempo de refrigeración de 5-10 min para obtener -50°C. En estas condiciones se forman cristales de hielo de un diámetro aproximado de 35 µm a través de la suspensión de colágeno.

La figura 4 muestra un dispositivo para la fabricación de un ejemplo de realización del procedimiento según el presente invento, en concreto, de una prótesis vascular. Se tensa una estructura extraña 40 preformada en forma de tubo por sus extremos a dos conductos metálicos 41 y 42; en el conducto metálico 41 se fija un anillo 43, mientras que el conducto metálico 42 presenta una brida. El anillo 43 y la brida 42 están separados respectivamente del extremo de los conductos metálicos 45 y 46 a una distancia a determinada.

El dispositivo muestra además una película 47 que posee depresiones 48 y 49 que la atraviesan completamente y cuyas dimensiones se corresponden con el anillo 43 y la brida 44. La distancia b de las depresiones se corresponde con la longitud que va desde el anillo 43 hasta la brida 44 incluyendo la extensión intermedia de la estructura extraña 40. La película 47 puede estar recubierta en la superficie 50 comprendida entre las depresiones 48 y 49 por una suspensión de proteínas y, finalmente, puede enrollarse alrededor de los conductos metálicos 41 y 42 y la estructura extraña 40; esto se señala mediante una flecha 51. Los conductos metálicos 41 y 42 pueden estar conectados

por su extremo libre a una bomba de vacío indicada por las flechas 52 y 53.

En la figura 5 se muestra una representación en sección ampliada del dispositivo de la figura 4. Se han utilizado los mismos números que en la figura 4, siempre y cuando éstos hicieran referencia a las mismas características.

La brida 44 del conducto metálico 42 se introduce en la depresión 49 de la película 47. Por encima del extremo 46 del conducto 42 se inserta la estructura extraña 40 con forma de tubo. En la figura, se introduce el conducto metálico 42 a través del anillo 43 en la estructura extraña 40 con forma de tubo hasta el extremo del conducto metálico 46. Entre la superficie 50 de la película 47 y la estructura extraña 40 en forma de tubo se determina por medio de la medida d el grosor de la capa de la suspensión proteínica, que se establece por la distancia entre la película 47 y la estructura extraña 40 en forma de tubo. El grosor de la capa puede modificarse libremente cambiando la profundidad de las depresiones 48 y 49 o la longitud de la brida 44 y el anillo 43.

Por medio del ejemplo descrito a continuación, se ilustrará la aplicación del dispositivo.

Ejemplo

Fabricación de una prótesis vascular según el invento

Se fabrica según los procedimientos conocidos una estructura extraña 40 en forma de tubo a partir de politetrafluoretileno expandido (ePTFE) con un diámetro interno de 4 mm y un grosor de pared de 100 μm . Por medio del estirado se consigue una porosidad muy elevada, estando el tamaño medio de los poros de 60 μm determinado por la separación de los nudos del PTFE.

Los extremos del tubo, cuya longitud total es de 340 mm, se deslizan cada uno 15 mm sobre conductos metálicos 41 y 42 con un diámetro exterior de 4,1 mm y con dos luces concéntricas. El conducto metálico 42 posee a una distancia de 15 mm de su extremo una brida 44. Sobre el segundo conducto se encuentra un anillo 43 que puede fijarse al conducto mediante un manguito. El anillo 43 presenta un dispositivo de agarre 54 en el que puede fijarse un extremo de la estructura extraña 40 al anillo 43. Los extremos libres de los conductos metálicos pueden conectarse a una bomba de vacío.

Por otro lado, se fabrica una suspensión colagénica acuosa con una viscosidad de 8 Pa x s a 25°C a partir de colágeno insoluble tipo 1 al 2%, aislado de piel bovina, y ácido ascórbico al 2%. El pH de la suspensión se establece en 3,4 con ácido clorhídrico. Esta suspensión se aplica con una cuchilla dosificadora sobre una película rectangular 47 con unas dimensiones de 350 mm x 19 mm y un grosor uniforme de 1 mm.

La película 47 presenta una firmeza suficiente y está hecha, por ejemplo, de teflón. Resulta ventajoso que las caras más cortas de la película 47 estén provistas de sendas depresiones 48 y 49 cuya distancia se corresponda con la del anillo 43 y la brida 44, en-

tre los cuales se extiende la estructura extraña 40 con forma de tubo. Por otro lado, puede determinarse el grosor de pared de la muestra a partir de la profundidad de las depresiones 48 y 49 y modificando la brida 44 y el anillo 43.

A continuación, se colocan el anillo 43 y la brida 44 de los conductos de metal 41 y 42 en las depresiones 48 y 49 de la película 47 recubierta con la suspensión de colágeno y se enrolla la película 47 sobre una mesa plana alrededor del conjunto de la estructura extraña 40 con forma de tubo y las conexiones de los conductos metálicos. Con ello se obtiene un molde para la prótesis vascular que se va a preparar, con la brida 44 y el anillo 43 como límites laterales y la película 47 como límite exterior y, simultáneamente, como capa de aislamiento. Para ello, los conductos metálicos se conectan por sus extremos libres a una bomba de vacío. Con ayuda de la bomba de vacío se aplica una pequeña subpresión de 100 mbar y se absorbe la suspensión haciendo que se dirija hacia el interior de los poros del tubo de ePTFE. A continuación, uno de los conductos 41, con un diámetro exterior de 4 mm, se desliza a través del anillo 43 hasta el extremo del otro conducto metálico 46. En el extremo del conducto metálico 41 se encuentra una junta 55 que impide que salga el líquido refrigerante en el punto de conexión (entre el conducto 41 y el conducto 42).

Seguidamente se congela la suspensión de colágeno de forma dirigida mediante un procedimiento de congelación controlado aplicado únicamente a una cara. Para ello, se hace descender la temperatura del conducto metálico 41, que ahora cumple la función de un tubo refrigerante, desde la temperatura ambiente (aprox. 25°C) hasta -50°C a un ritmo constante de -6 K/min. Como medio refrigerante se emplea isopropanol; para repartir la temperatura de forma uniforme a lo largo de todo el conducto metálico se divide también el medio refrigerante y se transporta hacia el termostato en contracorriente a través de las luces dispuestas concéntricamente.

Tras la congelación se retira la película 47. Se almacenan las muestras durante un mínimo de 12 horas a una temperatura de -70°C y, a continuación, se liofilizan. Durante este proceso se mantiene la temperatura del condensador a -85°C hasta que el contenido de agua de la matriz de colágeno generada sea inferior a un < 10%. Finalmente, se extrae la matriz de colágeno del molde y se somete a una temperatura de 106°C con una subpresión de 5×10^{-5} bar durante unas 14 horas para que el colágeno se reticule por deshidratación térmica.

Entonces, se separan los extremos de las muestras a una distancia de 20 mm del borde de la muestra.

Tras la subsiguiente esterilización, la prótesis vascular fabricada conforme al procedimiento según el invento a partir de colágeno con refuerzo de ePTFE estará lista para ser colonizada con miofibroblastos y células endoteliales en un reactor celular.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para elaborar un injerto con una estructura extraña estructurada y una matriz proteínica porosa con una estructura de poros dirigida, anclada, como mínimo parcialmente, en dicha estructura extraña, en el cual se emplea como estructura extraña un material seleccionado entre un material artificial resistente y estructurado, un material artificial reabsorbible y estructurado, un material natural estructurado o una combinación de dichos materiales, con los siguientes pasos: a) preparación de la estructura extraña; b) aplicación de una suspensión, una dispersión o una pasta con colágeno y componentes no colagénicos solubles; c) inserción, como mínimo parcial, de la suspensión, la dispersión o la pasta en la estructura extraña por presión, vacío o centrifugación; d) refrigeración por una cara de una de las superficies de la suspensión, la dispersión o la pasta y aislamiento simultáneo de la otra superficie.

2. Procedimiento según la reivindicación 1 **caracterizado** por el hecho de que se emplea como estructura extraña estructurada un material artificial resistente perteneciente a un grupo que abarca politetrafluoretileno, poliuretano, poliestireno o poliéster, cerámica o metal.

3. Procedimiento según la reivindicación 1 **caracterizado** por el hecho de que para la estructura extraña se emplea un material artificial reabsorbible perteneciente a un grupo que abarca poliláctido, ácido poliglicólico, polihidroxialcanoato o copolímeros de éstos.

4. Procedimiento según la reivindicación 1 **caracterizado** por el hecho de que para la estructura extraña se emplea un material natural perteneciente a un grupo que abarca polisacáridos como la quitina, la

celulosa, el colágeno o la hidroxilapatita, como, por ejemplo, el fosfato cálcico.

5. Procedimiento según una de las reivindicaciones de la 1 a la 4 **caracterizado** por el hecho de que el tamaño de los poros de la matriz proteínica es de entre 5 μm y 500 μm .

6. Procedimiento según una de las reivindicaciones de la 1 a la 5 **caracterizado** por el hecho de que la matriz proteínica se liofiliza tras la refrigeración.

7. Procedimiento según una de las reivindicaciones de la 1 a la 6 **caracterizado** por el hecho de que el grosor de capa de la matriz proteínica se encuentra entre 0,1 y 5 cm.

8. Procedimiento según una de las reivindicaciones de la 1 a la 7 **caracterizado** por el hecho de que el injerto se esteriliza tras la liofilización.

9. Procedimiento según una de las reivindicaciones de la 1 a la 8 **caracterizado** por el hecho de que el injerto se coloniza con células antes del implante.

10. Procedimiento según una de las reivindicaciones de la 1 a la 9 **caracterizado** por el hecho de que el injerto se carga o se recubre antes del implante con un principio activo que pertenece a un grupo que comprende hirudina, aspirina, heparán sulfato o albúmina.

11. Injerto con una estructura extraña y una matriz proteínica con estructura porosa dirigida, anclada, como mínimo parcialmente, en la estructura extraña, en el cual se utiliza como estructura extraña un material seleccionado entre un material artificial resistente y estructurado, un material artificial reabsorbible y estructurado, un material natural estructurado o una combinación de dichos materiales.

12. Injerto según la reivindicación 11 **caracterizado** por el hecho de que se fabrica según el procedimiento descrito en una de las reivindicaciones de la 1 a la 10.

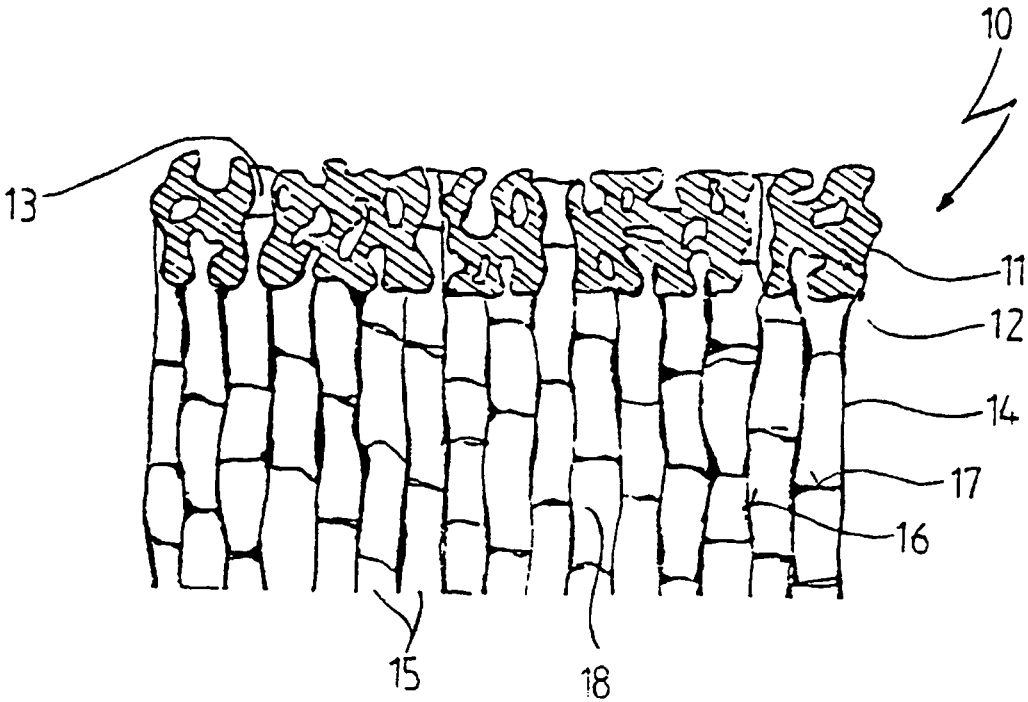


FIG. 1

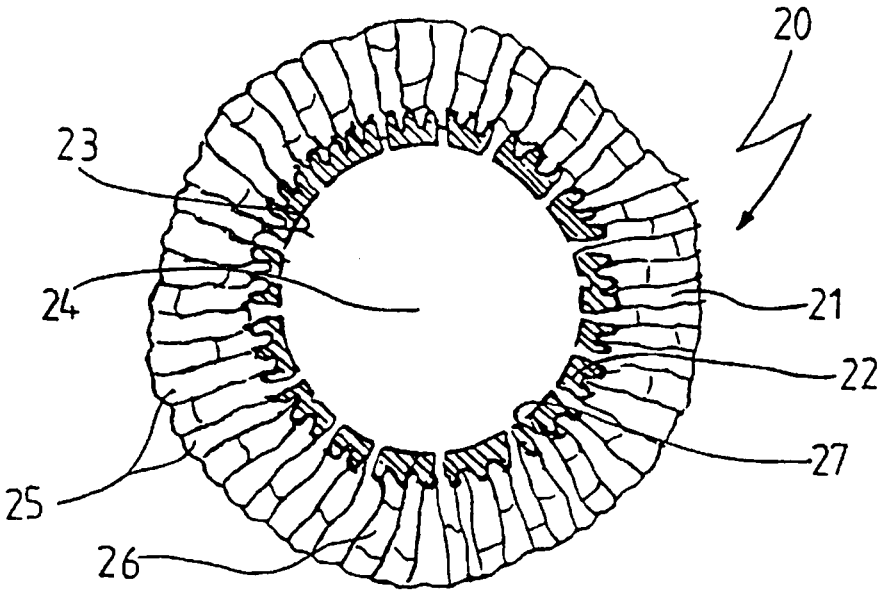


FIG. 2

Regimenes de temperatura para enfriamiento
 regulado por una cara: -9 K/min

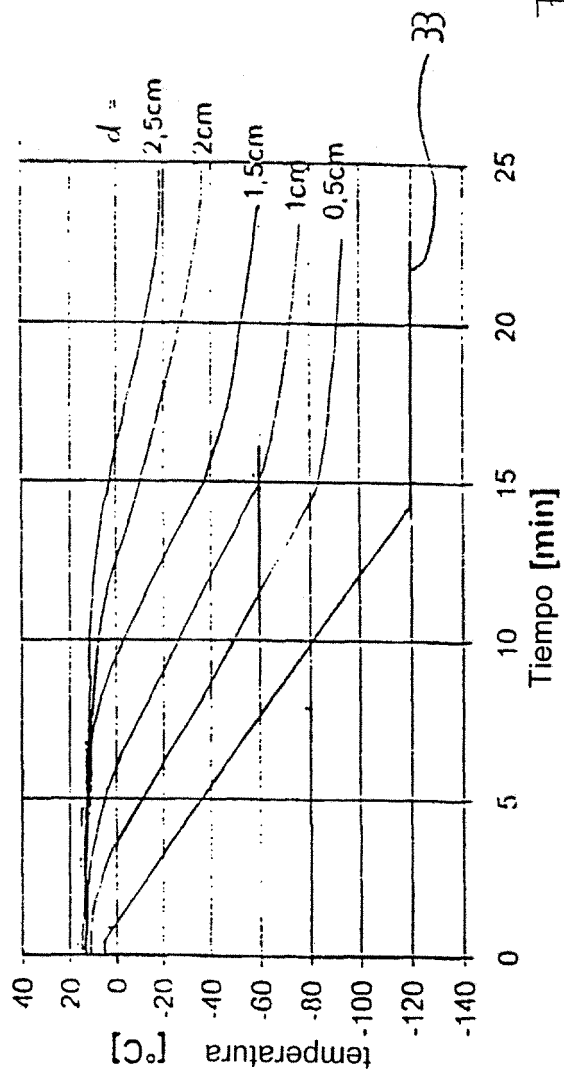
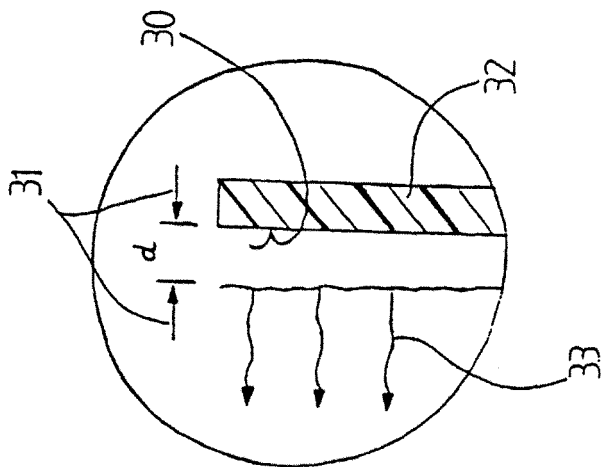


Fig 3

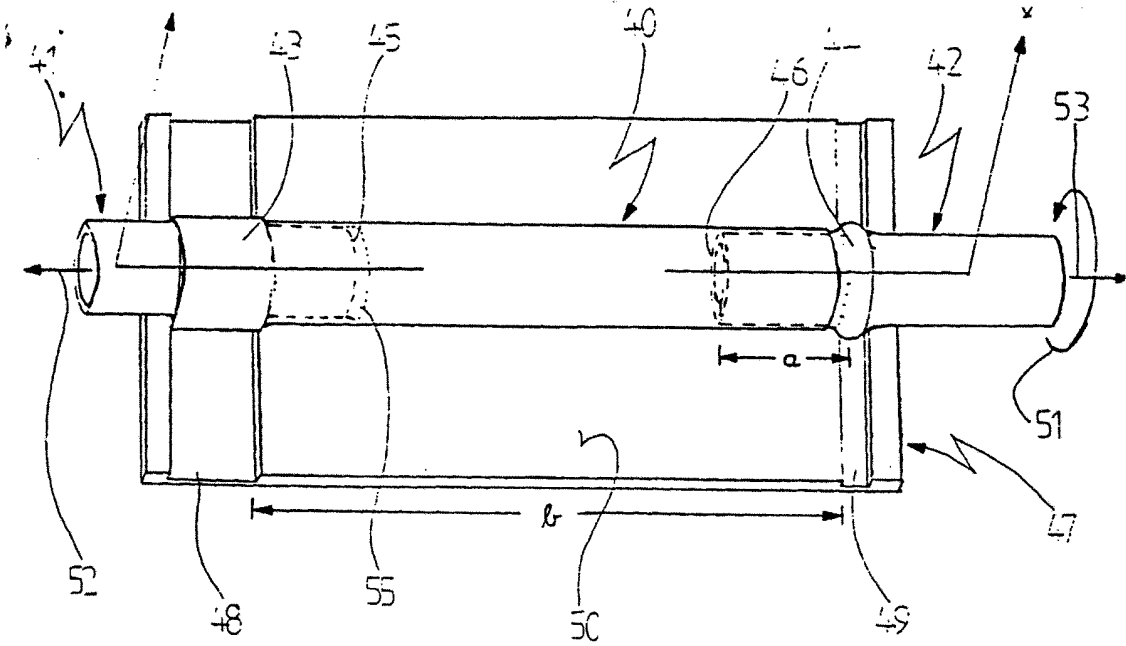


Fig. 4

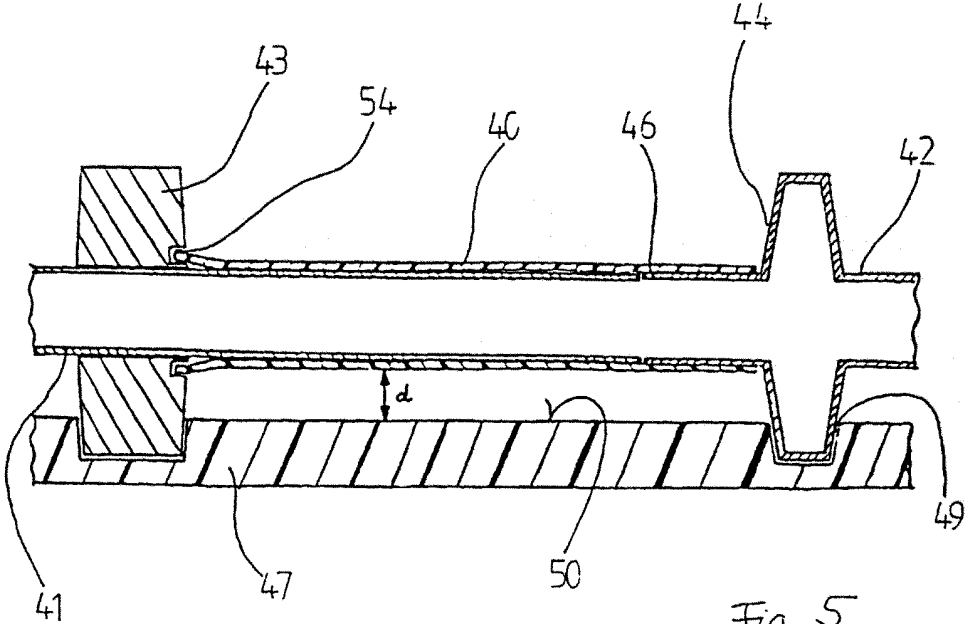


Fig. 5