



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 323 661**

(51) Int. Cl.:

A61F 2/82 (2006.01)

A61L 27/24 (2006.01)

A61L 27/36 (2006.01)

A61L 27/40 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **99927195 .0**

(96) Fecha de presentación : **04.06.1999**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1082071**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **14.03.2001**

(54) Título: **Método de preparación de una prótesis vascular.**

(30) Prioridad: **05.06.1998 US 88198 P**
17.02.1999 US 120547 P

(73) Titular/es: **ORGANOGENESIS Inc.**
150 Dan Road
Canton, Massachusetts 02021, US

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
22.07.2009

(72) Inventor/es: **Abraham, Ginger, A.;**
Murray, James y
Bachrach, Nathaniel, M.

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
22.07.2009

(74) Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

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

DESCRIPCIÓN

Método de preparación de una prótesis vascular.

5 **1. Campo de la invención**

Esta invención se encuentra en el campo de la ingeniería de tejidos. La invención está dirigida a prótesis de injerto producidas por bioingeniería preparadas a partir de material tisular limpio obtenido a partir de fuentes animales. Las prótesis de injerto producidas por bioingeniería de la invención se preparan utilizando métodos que conservan la compatibilidad celular, firmeza y capacidad de biorremodelación de la matriz tisular procesada. Las prótesis de injerto producidas por bioingeniería se utilizan para implante, reparación o para utilizarse en un anfitrión mamífero.

10 **2. Descripción breve de los antecedentes de la invención**

15 El campo de la ingeniería de tejidos combina los métodos de ingeniería con los principios de la ciencia de la vida para entender las relaciones estructurales y funcionales en los tejidos de mamíferos normales y patológicos. El objetivo de la ingeniería de tejidos es el desarrollo y aplicación final de sustitutos biológicos para restaurar, mantener y mejorar las funciones tisulares.

20 El colágeno es la proteína estructural principal en el cuerpo y constituye aproximadamente un tercio de la proteína corporal total. Comprende la mayoría de la materia orgánica de la piel, tendones, huesos y dientes y aparece como inclusiones fibrosas en la mayoría de las demás estructuras corporales. Algunas de las propiedades del colágeno son su alta resistencia a la tensión; su baja antigenicidad, debida en parte al enmascaramiento de determinantes antigenicos potenciales por la estructura helicoidal; y su baja extensibilidad, semipermeabilidad y solubilidad. Además, el colágeno es una sustancia natural para la adhesión celular. Estas propiedades y otras hacen que el colágeno sea un material adecuado para la ingeniería de tejidos y la fabricación de sustitutos biológicos que se pueden implantar y prótesis biorremodelables.

25 Los métodos para obtener tejido y estructuras tisulares colagenosas a partir de tejidos de mamíferos extirados y los procesos para construir prótesis a partir de tejido, se han investigado ampliamente para la reparación quirúrgica o para el reemplazo de tejidos u órganos. Todavía es un objetivo irresoluto de los investigadores el desarrollo de prótesis que puedan utilizarse con éxito para reemplazar o reparar tejidos de mamíferos. El documento US-A-5 733 337 describe un método de preparación de una prótesis de acuerdo con los puntos a, c y d de la reivindicación 1.

30 **35 Compendio de la invención**

35 Los materiales colagenosos biológicos tales como la submucosa intestinal han sido propuestos por muchos investigadores para utilizarse en la reparación o reemplazo de tejidos. Se describen métodos para el procesamiento mecánico y químico del yeyuno proximal porcino para generar una capa única acelular de colágeno intestinal (ICL) que puede utilizarse para formar laminados para aplicaciones bioprostéticas. El procesamiento elimina las células y los restos celulares a la vez que mantiene la estructura nativa del colágeno. La lámina resultante de matriz tisular procesada se utiliza para fabricar construcciones laminadas con múltiples capas con unas especificaciones deseadas. Hemos investigado la eficacia de parches laminados para la reparación de tejidos blandos así como la utilización de ICL entubada como un injerto vascular. Este material proporciona el soporte físico necesario mientras que genera mínimas diferencias y es capaz de integrarse en el tejido nativo circundante y resultar infiltrado con células anfítrionas. La remodelación *in vivo* no afecta a la integridad mecánica. Las propiedades intrínsecas y funcionales del implante, tales como el módulo de elasticidad, retención de sutura y UTS son parámetros importantes que pueden manipularse para requerimientos específicos variando el número de capas de ICL y las condiciones de entrecruzamiento.

40 **50 Descripción detallada de la invención**

45 Esta invención está dirigida a un método de preparación de una prótesis producida por ingeniería de tejidos, que, cuando se implanta en un anfitrión mamífero, puede servir como una parte corporal o estructura tisular de reparación, aumento o reemplazo funcional y que sufrirá una biodegradación controlada que se produce de manera concomitante con la remodelación por las células del anfitrión. La prótesis obtenida por el método de esta invención, cuando se utiliza como un tejido de reemplazo, tiene así propiedades dobles: en primer lugar, funciona como una parte corporal sustitutiva y, en segundo lugar, aún funcionando como una parte corporal sustitutiva, funciona como un molde de remodelación para el crecimiento de las células anfítrionas hacia el interior del tejido receptor. Con el fin de hacer esto, el material prostético es una matriz tisular procesada desarrollada a partir de tejido colagenoso obtenido de mamíferos que es capaz de unirse a sí misma o a otra matriz tisular procesada para formar una prótesis para ser injertada en un paciente.

55 La invención está dirigida hacia métodos para hacer prótesis producidas por ingeniería de tejidos a partir de material tisular limpio en los que los métodos no requieren adhesivos, suturas o grapas para unir las capas entre sí a la vez que se mantiene la capacidad de biorremodelación de la prótesis. Los términos "matriz tisular procesada" y "material tisular procesado", quiere decir nativo, normalmente tejido celular que ha sido obtenido de una fuente animal, preferiblemente de un mamífero, y mecánicamente limpiado de tejidos circundantes y químicamente limpiado de células, de restos de células, y convertido sustancialmente en libre de componentes de matriz extracelular no-colagenosa. La matriz tisular

- procesada, mientras que esté sustancialmente libre de componentes no-colagenosos, mantiene mucha de su resistencia, forma y estructura matriz nativa. Las composiciones preferidas para preparar los injertos producidos por bioingeniería son los tejidos animales que contienen colágeno. Fuentes de tejidos colagenosos, incluyendo, pero no limitándose a: intestino, fascia-lata, pericardio, dura-mater, y otros tejidos planos o de estructura plana que contiene una matriz tisular colagenosa. La estructura de esas matrices de tejidos las hace capaces de ser fácilmente limpiadas, manipuladas y reunidas para preparar los injertos producidos por bioingeniería. Otras fuentes apropiadas con la misma estructura plana y composición de matriz pueden ser identificadas, obtenidas y tratadas en otras fuentes animales por los expertos en la técnica de acuerdo con la invención.
- 5 Una composición preferida más para preparar los injertos producidos por bioingeniería es una capa de colágeno intestinal obtenida de la túnica submucosa del intestino delgado. Las fuentes adecuadas del intestino delgado son organismos mamíferos tales como ser humano, vaca, cerdo, oveja, perro, cabra o caballo aunque la fuente preferida es el intestino delgado de cerdo.
- 10 La composición más preferida para preparar la prótesis es una capa de colágeno intestinal procesada obtenida de la túnica submucosa del intestino delgado de cerdo. Para obtener la ICL procesada, se recoge el intestino delgado de un cerdo y los tejidos mesentéricos relacionados se diseccionan groseramente del intestino. La túnica submucosa se separa, o deslamina, preferiblemente de las otras capas del intestino delgado estrujando mecánicamente el material intestinal bruto entre rodillos opuestos para eliminar las capas musculares (túnica muscularis) y la mucosa (túnica mucosa). La túnica submucosa del intestino delgado es más dura y rígida que el tejido circundante y los rodillos estrujan los componentes más blandos y los separan de la submucosa. En los ejemplos siguientes, la túnica submucosa se reconoció mecánicamente a partir del intestino delgado porcino utilizando una máquina limpiadora de intestino Bitterling y posteriormente se limpió químicamente para rendir una matriz tisular limpia. Esta capa de colágeno intestinal limpia mecánicamente y químicamente se refiere en la presente memoria como "ICL".
- 15 20 25 La ICL procesada es esencialmente telopeptido de colágeno acelular; alrededor del 93% en peso seco, con menos de alrededor del 5% en peso seco de glicoproteínas, glicosaminoglicanos, proteoglicanos, lípidos, proteínas no colagenosas y ácidos nucleicos tales como ADN y ARN y básicamente no contiene células ni restos celulares. La ICL procesada retiene la mayor parte de su estructura de matriz y su firmeza. De manera importante, la capacidad de biorremodelación de la matriz tisular se conserva en parte por el proceso de limpieza ya que no contiene restos de detergente unidos que afectarían adversamente la capacidad de biorremodelación del colágeno. Además, las moléculas de colágeno han retenido sus regiones de telopeptido ya que el tejido no se ha sometido a tratamiento con enzimas durante el proceso de limpieza.
- 30 35 Las capas de colágeno procesadas del dispositivo prostético pueden ser del mismo material colágeno, tal como dos o más capas de ICL, o de diferentes materiales colágenos, tal como uno o más capas de ICL y una o más capas de fascia-lata.
- 40 45 Las matrices tisulares procesadas pueden tratarse o modificarse, bien físicamente o químicamente, antes de la fabricación de una prótesis de injerto producida por bioingeniería. Pueden realizarse modificaciones físicas tales como moldeado, acondicionamiento por extensión y relajación, o perforando las matrices tisulares limpias así como modificaciones químicas tales como la unión de factores de crecimiento, componentes de la matriz extracelular seleccionados, material genético, y otros agentes que afectarían la biorremodelación y reparación de la parte corporal que se está tratando, reparando o reemplazando.
- 50 Ya que la ICL es el material de partida más preferido para la fabricación de prótesis de injertos producidas por bioingeniería, los métodos descritos en adelante son los métodos preferidos para fabricar prótesis de injertos producidas por bioingeniería que contienen ICL.
- 55 En la realización más preferida, la túnica submucosa del intestino delgado porcino se utiliza como un material de partida para la prótesis de injerto producida por bioingeniería. El intestino delgado del cerdo se recoge, se eliminan sus tejidos circundantes y se limpia mecánicamente utilizando una máquina limpiadora de intestinos que elimina energéticamente las capas de grasa, músculo y mucosa de la túnica submucosa utilizando una combinación de acción mecánica y lavado o enjuagado utilizando agua. La acción mecánica puede describirse como una serie de rodillos que comprimen y eliminan las capas sucesivas de la túnica submucosa cuando el intestino intacto se pone entre ellos. La túnica submucosa del intestino delgado es comparativamente más dura y rígida que el tejido circundante y los rodillos estrujan los componentes más blandos y los separan de la submucosa. El resultado de la limpieza con la máquina fue tal que sólo permaneció la capa submucosal del intestino.
- 60 Despues de la limpieza mecánica, se empleó una limpieza química para eliminar los componentes celulares y de la matriz y se realizó preferiblemente en condiciones asépticas a temperatura ambiente. El intestino se corta longitudinalmente hacia el lumen y después se corta en secciones de lámina de aproximadamente 15 cm de largo. El material se pesó y se puso en contenedores o recipientes en una proporción de aproximadamente 100:1 v/v de disolución respecto al material intestinal. En el tratamiento de limpieza química más preferido, tal como el método descrito en la Solicitud Internacional PCT WO 98/49969, el tejido colagenoso se pone en contacto con un agente quelante, tal como sal de tetrasodio del ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) en condiciones alcalinas, preferiblemente mediante la adición de hidróxido de sodio (NaOH); después se pone en contacto con un ácido en el que el ácido contiene una sal, preferiblemente ácido clorhídrico (HCl) que contiene cloruro de sodio (NaCl); después se pone en contacto con una

ES 2 323 661 T3

disolución salina tamponada tal como 1 M cloruro de sodio (NaCl)/10 mM disolución salina tamponada con fosfato (PBS); seguido finalmente de una etapa de lavado o enjuagado utilizando agua.

Cada etapa del tratamiento se realiza preferiblemente utilizando una plataforma giratoria o de agitación. Después 5 del lavado o enjuagado, la ICL es sacada de cada contenedor o recipiente y la ICL es cuidadosamente condensada del exceso de agua. En este punto, la ICL puede almacenarse congelada a -80°C, a 4°C en tampón fosfato estéril o secarse hasta su utilización en la fabricación de una prótesis. Si se almacena seca, las láminas de ICL se aplana en una superficie tal como una placa plana, preferiblemente una lámina o membrana porosa, tal como una membrana de polícarbonato, y se elimina cualquier etiqueta linfática del lado abluminal del material utilizando un escalpelo y se 10 deja que las láminas de ICL se sequen en una campana de flujo laminar a temperatura y humedad ambiente.

La ICL es una estructura laminar plana que puede utilizarse para fabricar varios tipos de construcciones que se 15 pueden utilizar como una prótesis dependiendo la forma de la prótesis de su utilización pretendida. Para formar prótesis obtenibles mediante el método de la invención, las láminas deben fabricarse utilizando un método que mantenga la capacidad de biorremodelación del material de matriz procesado pero que también sea capaz de mantener sus 20 características de firmeza y estructurales en su comportamiento como un tejido de reemplazo. Las láminas de matriz tisular procesadas se ponen en capas para contactar otra lámina o en forma de tubos y se enrollan sobre sí mismas. El área de contacto es una región de unión en la que las capas entran en contacto. La región de unión debe ser capaz de aguantar la sutura y la extensión cuando se manipulan en la clínica, en el momento del implante y durante la fase de cicatrización inicial mientras que funciona como una parte de sustitución del cuerpo hasta que las células del paciente se dividan y biorremodelen posteriormente la prótesis para formar un tejido nuevo.

En una realización preferida, el dispositivo prostético que se puede obtener por el método de esta invención tiene dos o más capas de colágeno superimpuestas que están unidas entre sí. Tal y como se utiliza en la presente memoria, 25 "capas de colágeno unidas" significa compuestas por dos o más capas del mismo o diferente material de colágeno tratado de una manera tal que las capas están superimpuestas una sobre otra y están lo suficientemente unidas entre sí por auto-laminación y unión química.

Por ejemplo, una construcción de ICL de múltiples capas se utiliza para reparar estructuras de pared corporales. 30 También puede utilizarse, por ejemplo, como un parche pericárdico, un parche vascular, un parche de pared de vejiga, o un dispositivo de reparación de hernia o utilizarse como una eslinga para soportar órganos hipermóviles o prolap-sados. Además, puede implantarse plana, enrollada, o plegada para aumentar el tamaño y volumen del tejido. Pueden incorporarse varias capas de ICL en la construcción para indicaciones de volumen y firmeza. Antes del implante, las 35 capas pueden tratarse o recubrirse adicionalmente con colágeno u otros componentes de la matriz extracelular, ácido hialurónico, heparina, factores de crecimiento, péptidos o células cultivadas.

La realización de la invención según la reivindicación 1 está dirigida a métodos para hacer prótesis de lámina plana, que comprenden dos o más capas de ICL unidas y entrecruzadas para utilizarse como un biomaterial implantable capaz 40 de ser biorremodelado por las células del paciente. Debido a la estructura de lámina plana de ICL, la prótesis se fabrica fácilmente para comprender cualquier número de capas, preferiblemente entre 2 y 10 capas, más preferiblemente entre 2 y 6 capas, dependiendo el número de capas de la firmeza y volumen necesarios para la utilización final pretendida 45 de la construcción. La ICL tiene fibras de matriz estructurales dispuestas en la misma dirección general. Cuando se ponen en capas, las orientaciones de las capas pueden variarse para aprovechar las orientaciones generales de las fibras de tejido en las capas de tejido procesadas. Las láminas pueden ponerse en capas de manera que las orientaciones de las fibras son paralelas o están en diferentes ángulos. Las capas también pueden estar superimpuestas para formar una construcción con capas continuas a lo largo del área de la prótesis. Alternativamente, como el tamaño final de 50 una disposición superimpuesta está limitado por la circunferencia del intestino, las capas pueden intercalarse, en una disposición en colage para formar una construcción de lámina con un área superficial mayor que las dimensiones del material de partida pero sin capas continuas a lo largo del área de la prótesis. Pueden introducirse características complejas tales como un conducto o red de conductos o canales dispuestos entre las capas o atravesando las capas, por ejemplo.

En la fabricación de una construcción de múltiples capas que comprende ICL, se emplean preferiblemente un entorno aséptico y herramientas estériles para mantener la esterilidad de la construcción cuando se empieza con material 55 ICL estéril. Para formar una construcción de ICL de múltiples capas, se puso un primer miembro que es un soporte rígido estéril, tal como una lámina rígida de polícarbonato, en el campo estéril de una cabina de flujo laminar. Si las láminas de ICL todavía no están en un estado hidratado después de los procesos de limpieza mecánica y química, se hidratan en una disolución acuosa, tal como agua o disolución salina tamponada con fosfato. Las láminas de ICL se secan con paños absorbentes estériles para absorber el exceso de agua del material. Si todavía no se ha hecho, se quita 60 del material de ICL cualquier etiqueta linfática en la superficie serosal, del lado abluminal. Se pone una primera lámina de ICL limpia en la lámina de polícarbonato y se alisa manualmente en la lámina de polícarbonato para eliminar las burbujas de aire, plegamientos y arrugas. Una segunda lámina de ICL limpia se pone en la parte superior de la primera lámina, de nuevo eliminando manualmente las burbujas de aire, plegamientos y arrugas. Esto se repite hasta que se obtiene el número deseado de capas para una aplicación específica, preferiblemente entre 2 y 10 capas.

65 La ICL tiene una cualidad de lateralidad derivada de su estado tubular nativo: una superficie mucosal interna que da al lumen intestinal en el estado nativo y una superficie serosal externa opuesta recubre el ablumen. Se ha encontrado que estas superficies tienen características que pueden afectar al rendimiento post-operatorio de la prótesis pero que

ES 2 323 661 T3

- pueden aprovecharse para un rendimiento incrementado del dispositivo. Actualmente con la utilización de dispositivos sintéticos, la formación de adhesión puede requerir la necesidad de re-operación para liberar las adhesiones del tejido circundante. En la formación de un parche pericárdico o prótesis para la reparación de hernias que tienen dos capas de ICL, se prefiere que la región de unión de las dos capas esté entre las superficies serosas ya que se ha demostrado
- 5 que las superficies mucosales son capaces de resistir la formación de adhesión postoperatoria después del implante. En otras realizaciones, se prefiere que una superficie de la prótesis de parche de ICL sea no adhesiva y que la otra superficie tenga una afinidad para adherirse al tejido del anfitrión. En este caso, la prótesis tendrá una superficie mucosal y la otra superficie serosal. En otra realización más, se prefiere que las superficies opuestas sean capaces de crear adhesiones para crecer tejidos juntas que estén en contacto en cada lado, así la prótesis tendrá superficies serosas en ambos
- 10 lados de la construcción. Debido a que sólo las dos láminas exteriores se ponen en contacto potencialmente con otras estructuras corporales cuando se implantan, la orientación de las capas interiores, si la construcción está comprendida por más de dos, es menos importante ya que no probablemente no contribuirán a la formación de adhesión postoperatoria.
- 15 Despues de poner en capas el número deseado de láminas de ICL, se unen deshidratándolas juntas. Aunque en teoría no se unan, la deshidratación hace que los componentes de la matriz extracelular, tales como fibras de colágeno, se junten en las capas cuando se elimina el agua de entre las fibras de la matriz. Las capas pueden deshidratarse bien abiertas en el primer soporte miembro o, entre el primer soporte miembro y el segundo soporte miembro, tal como una segunda lámina de policarbonato, situada antes del secado por encima de la capa superior de ICL y fijada al
- 20 primer soporte miembro para mantener todas las capas en una disposición planar plana junto con o sin una pequeña cantidad de presión. Para facilitar la deshidratación, el miembro soporte puede ser poroso para permitir que el aire y la humedad pasen a través de él hacia las capas que se van a deshidratar. Las capas pueden secarse al aire, en vacío o por medios químicos tales como con acetona o un alcohol tal como alcohol etílico o alcohol isopropílico. La deshidratación puede hacerse en humedad ambiente, entre aproximadamente 10% Rh a aproximadamente 20% Rh, o
- 25 menos; o aproximadamente 10% a aproximadamente 20% p/p humedad, o menos. La deshidratación puede realizarse fácilmente situando el marco que contiene la lámina de policarbonato y las capas de ICL hacia arriba para recibir el flujo de aire entrante de la cabina de flujo laminar durante al menos aproximadamente 1 hora hasta 24 horas a temperatura ambiente, aproximadamente 20°C y a humedad ambiente.
- 30 Aunque no es necesario, en la realización preferida, las capas deshidratadas se rehidratan antes del entrecruzamiento. Las capas deshidratadas de ICL se desprenden del miembro de soporte poroso juntas y se rehidratan en un agente de rehidratación acuoso, preferiblemente agua, transfiriéndolas a un contenedor que contiene un agente de rehidratación acuoso durante al menos aproximadamente 10 a aproximadamente 15 minutos a una temperatura entre aproximadamente 4°C a aproximadamente 20°C para rehidratar las capas sin separarlas o deslaminarlas.
- 35 Las capas unidas rehidratadas se entrecruzan entre sí poniendo en contacto la ICL en capas con un agente de entrecruzamiento, preferiblemente un agente de entrecruzamiento químico que conserva la biorremodelabilidad del material ICL. Como se ha mencionado anteriormente, la deshidratación junta los componentes de la matriz extracelular de las capas de ICL adyacentes y el entrecruzamiento de estas capas entre sí forma enlaces químicos entre los
- 40 componentes para unir las capas. El entrecruzamiento del dispositivo prostético unido también proporciona firmeza y durabilidad al dispositivo para mejorar las propiedades de manejo. Se conocen en la técnica varios tipos de agentes de entrecruzamiento y pueden utilizarse tal como ribosa y otros azúcares, agentes oxidantes y métodos de hidrotermales (DHT). Un agente de entrecruzamiento preferido es hidrocloruro de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC). En otro método preferido, se añade sulfo-N-hidroxisuccinimida al agente de entrecruzamiento EDC como
- 45 describe Staros, J.V., Biochem. 21, 3950-3955, 1982. Además de los agentes de entrecruzamiento químicos, las capas pueden unirse entre sí con pegamentos basados en fibrina o adhesivos de grado médico tales como poliuretano, acetato de vinilo o poliepoxi. En el método más preferido, EDC se solubiliza en agua a una concentración preferiblemente entre aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 100 mM, más preferiblemente entre aproximadamente 1,0 mM a
- 50 aproximadamente 10 mM, lo más preferiblemente a aproximadamente 1,0 mM. Además de agua, puede utilizarse para disolver el EDC disolución salina tamponada con fosfato o tampón ácido (2-[N-morfolino]etanosulfónico) (MES). Pueden añadirse otros agentes a la disolución, tales como acetona o un alcohol, hasta 99% v/v en agua, típicamente 50%, para hacer que el entrecruzamiento sea más uniforme y eficiente. Estos agentes eliminan el agua de las capas para juntar las fibras de la matriz con el fin de estimular el entrecruzamiento entre estas fibras. La proporción de estos agentes respecto al agua en el agente de entrecruzamiento puede utilizarse para regular el entrecruzamiento. La disolución de entrecruzamiento de EDC se prepara inmediatamente antes de utilizarse ya que EDC perderá su actividad con el tiempo. Para poner en contacto el agente de entrecruzamiento con la ICL, las capas de ICL hidratadas y unidas se transfieren a un contenedor tal como una batea poco profunda y el agente de entrecruzamiento se decanta suavemente en la batea asegurando que las capas de ICL están a la vez cubiertas y flotando libremente y que no están presentes burbujas de aire por debajo o entre las capas de las construcciones de ICL. El contenedor se cubre y se deja que
- 55 las capas de ICL se entrecruzen durante entre aproximadamente 4 a aproximadamente 24 horas, más preferiblemente entre 8 a aproximadamente 16 horas a una temperatura entre aproximadamente 4°C a aproximadamente 20°C. El entrecruzamiento puede regularse con la temperatura: A temperaturas más bajas, el entrecruzamiento es más efectivo porque la reacción se ralentiza: a temperaturas más altas, el entrecruzamiento es menos efectivo al ser el EDC menos estable.
- 60 65 Despues del entrecruzamiento, el agente de entrecruzamiento se decanta y se desecha y las construcciones se lavan en la batea poniéndolas en contacto con un agente de lavado para eliminar el agente de entrecruzamiento residual. Un agente de lavado preferido es agua u otra disolución acuosa. Preferiblemente, se consigue un lavado suficiente

ES 2 323 661 T3

poniendo en contacto la construcción unida químicamente tres veces con volúmenes iguales de agua estéril durante aproximadamente cinco minutos para cada lavado. Utilizando un escalpelo y regla, las construcciones se cortan al tamaño deseado: un tamaño utilizable es aproximadamente 15,2 cm x 15,2 cm (un cuadrado de aprox. 6 pulgadas de lado) pero puede prepararse cualquier tamaño y utilizarse para injertarlo en un paciente.

5 Las construcciones se esterilizan finalmente utilizando medios conocidos en la técnica de la esterilización de dispositivos médicos. Un método preferido para la esterilización es poner en contacto las construcciones con tratamiento de ácido peracético (PA) al 0,1% estéril neutralizado con una cantidad suficiente de hidróxido de sodio (NaOH) 10 N, según la Patente de EEUU No. 5.460.962. La descontaminación se realiza en un contenedor o recipiente sobre una 10 plataforma agitadora, tal como contenedores o recipientes Nalge de 1 L, durante aproximadamente 18 ± 2 horas. Las construcciones se lavan poniéndolas en contacto con tres volúmenes de agua estéril durante 10 minutos cada lavado o enjuagado.

15 Otro medio de esterilización preferido es mediante la irradiación gamma. Las construcciones se envasan en bolsas hechas de material adecuado para irradiación gamma y se sellan utilizando un sellador de vacío, que se pusieron a su vez en bolsas herméticas para irradiación gamma entre 25,0 y 35,0 kGy. La irradiación gamma disminuye significativamente, pero no perjudicialmente, el módulo de Young, la fuerza de tensión final y la temperatura de contracción. Las propiedades mecánicas después de la irradiación gamma son todavía suficientes para utilizarse en un espectro 20 de aplicaciones y gamma es un medio preferido para esterilizar ya que se utiliza ampliamente en el campo de los dispositivos médicos implantables.

25 En otra realización preferida más, después de que la ICL se vuelve a conformar en una construcción para la reparación o reemplazo tisular, puede poblarla con células para formar una construcción tisular celular que comprende capas unidas de ICL y células cultivadas. Las construcciones tisulares celulares pueden formarse para mimetizar los órganos que van a reparar o reemplazar.

30 Los cultivos celulares se establecen a partir de fuentes de tejidos de mamíferos disociando el tejido o por el método del explante. Los cultivos primarios se establecen y se conservan en frío en bancos de células principales de los que partes del banco se descongelan, siembran y subculturivan para aumentar el número de células. Para poblar una construcción de ICL acelular con células, la construcción se pone en una placa o matraz de cultivo y se pone en contacto por inmersión con medio que contiene células suspendidas. Como el colágeno es una sustancia natural para la adhesión celular, las células se unen a la construcción de ICL y proliferan sobre y dentro de la matriz colagenosa de la construcción.

35 Los tipos de células preferidos para utilizarse en esta realización se obtienen a partir del mesénquima. Los tipos de células más preferidos son fibroblastos, células del estroma y otras células de tejido conectivo de soporte o fibroblastos dérmicos humanos. Las cepas de células de fibroblastos humanos pueden obtenerse de varias fuentes, incluyendo, pero sin estar limitadas a, prepucio neonatal, dermis, tendón, pulmón, cordones umbilicales, cartílago, uretra, estroma de la córnea, mucosa oral e intestino. Las células humanas pueden incluir pero no necesitan estar limitadas a: fibroblastos, 40 células de músculo liso, condrocitos y otras células de tejido conectivo de origen mesenquimal. Se prefiere, pero no se requiere, que el origen de la célula que produce la matriz utilizada en la producción de una construcción de tejido se obtenga a partir de un tipo de tejido al que debe parecerse o mimetizarse después de emplear métodos de cultivo. Por ejemplo, una construcción de lámina de múltiples capas se cultiva con fibroblastos para formar una construcción de tejido conectivo vivo; o mioblastos, para una construcción de músculo esquelético. Puede utilizarse más de un tipo 45 de célula para poblar una construcción de ICL, por ejemplo, una construcción de ICL tubular puede cultivarse en primer lugar con células de músculo liso y después el lumen de la construcción poblado con el primer tipo de células se cultiva con células endoteliales vasculares como segundo tipo de células para formar un dispositivo de reemplazo celular vascular. De manera similar, una prótesis de parche de la pared de la vejiga urinaria se prepara de manera similar en construcciones de lámina de ICL de múltiples capas utilizando células de músculo liso como primer tipo 50 de células y células endoteliales urinarias como segundo tipo de células. Los donantes de células pueden variar en el desarrollo y la edad. Las células pueden obtenerse a partir de tejidos donantes de embriones, neonatos o individuos de más edad incluyendo adultos. Las células progenitoras embrionarias tales como células madre mesenquimales pueden utilizarse y se inducen para diferenciarse y convertirse en el tejido deseado.

55 Aunque se prefieren las células humanas para ser utilizadas, las células que se van a utilizar en el método de la técnica no están limitadas a células de fuentes humanas. Pueden utilizarse células de otras especies de mamíferos incluyendo, pero sin limitarse a, fuentes equina, canina, porcina, bovina, ovina y murina. Además, también pueden utilizarse, células modificadas por ingeniería genética transfectadas espontáneamente, químicamente o viralmente. Para las realizaciones que incorporan más de un tipo de células, pueden utilizarse mezclas de células normales y 60 modificadas genéticamente o transfectadas y pueden utilizarse mezclas de células de dos o más especies o fuentes de tejido, o ambas.

65 Pueden utilizarse células recombinantes o modificadas por ingeniería genética en la producción de la construcción de la matriz celular para crear una construcción de tejido que actúe como un injerto de administración de fármaco para un paciente que necesite unos niveles incrementados de productos celulares naturales o tratamiento con un agente terapéutico. Las células pueden producir y administrar al paciente a través del injerto productos celulares recombinantes, factores de crecimiento, hormonas, péptidos o proteínas durante una cantidad continuada de tiempo o como se necesite cuando esté indicado biológicamente, químicamente o termalmente debido a las condiciones presentes en

ES 2 323 661 T3

el paciente. Las células también pueden modificarse por ingeniería genética para expresar proteínas o diferentes tipos de componentes de la matriz extracelular que son bien “normales” pero expresados a niveles altos o modificados de alguna manera para hacer un dispositivo de injerto que comprende matriz extracelular y células vivas que es ventajoso terapéuticamente para mejorar la cicatrización de heridas, o la neovascularización facilitada o dirigida. Estos procedimientos se conocen generalmente en la técnica y están descritos en Sambrook *et al*, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (1989). Todos los tipos de células mencionados anteriormente pueden utilizarse para la producción de una construcción tisular celular formada a partir de una construcción acelular formada a partir de capas de ICL unidas.

5 Las prótesis que se pueden obtener con el método de esta invención, que funcionan como una parte corporal sustituta, pueden ser planas, tubulares o de una geometría compleja. La forma de la prótesis formada se decidirá según su utilización pretendida. Así, cuando se forman las capas unidas de la prótesis que se puede obtener con el método de esta invención, el miembro soporte del molde o placa puede formarse para acomodar la forma deseada.

10 Las prótesis plana de múltiples capas pueden implantarse para reparar, aumentar o reemplazar órganos enfermos o dañados, tales como la pared abdominal, pericardio, hernias y varios órganos y estructuras más incluyendo, pero sin limitarse a, hueso, periosteо, pericondrio, disco intervertebral, cartílago articular, dermis, intestino delgado, ligamentos y tendones. Además, las prótesis planas de múltiples capas pueden utilizarse como un parche vascular o intracardiaco o como una válvula cardíaca de reemplazo.

15 20 Las láminas planas pueden utilizarse también para soporte de órganos, por ejemplo, para soportar órganos hipermóviles o herniados utilizando las láminas como una eslinga o cabestrillo para los órganos, tales como vejiga o útero. Las prótesis tubulares pueden utilizarse, por ejemplo, para reemplazar secciones transversales de órganos tubulares tales como vasculatura, esófago, traquea, intestino y trompas de falopio. Estos órganos tienen una forma básica tubular con una superficie exterior y una superficie interior luminal. Además, las láminas planas y las estructuras tubulares pueden 25 formarse juntas para formar una estructura compleja para reemplazar o aumentar las válvulas cardíacas o venosas.

30 35 Las prótesis de injerto obtenidas por bioingeniería de la invención pueden utilizarse para reparar o reemplazar estructuras corporales que se han dañado o enfermas en el tejido anfitrión. A la vez que funciona como una parte o soporte corporal sustitutivo, la prótesis también funciona como un armazón de matriz biorremodelable para el crecimiento de células anfitrionas hacia el interior del tejido receptor. “Biorremodelado” se utiliza en la presente memoria para significar la producción de colágeno estructural, vascularización y repoblación celular mediante el crecimiento de células anfitrionas hacia el interior del tejido receptor a una velocidad funcional igual aproximadamente a la velocidad de biodegradación, reformado y reemplazo de los componentes de la matriz de la prótesis implantada por las células y enzimas del anfitrión. La prótesis de injerto retiene sus características estructurales mientras que se remodela por el anfitrión completamente, o sustancialmente, en tejido del anfitrión y como tal es funcional como un análogo del tejido que repara o al que reemplaza.

40 El Módulo de Young (MPa) se define como la constante lineal proporcional entre esfuerzo y deformación. La Resistencia Última a la Tracción (N/mm) es una medida de la resistencia a lo largo de la prótesis. Estas dos propiedades son una función del número de capas de ICL en la prótesis. Cuando se utiliza como un dispositivo de carga o de soporte, debería ser capaz de resistir los rigores de la actividad física durante la fase de cicatrización inicial y a lo largo del remodelado.

45 50 La resistencia de la laminación de las regiones de unión se mide utilizando un ensayo de desprendimiento. Inmediatamente después del implante quirúrgico, es importante que las capas no se deslaminen bajo estrés físico. En los estudios con animales, ningún material explantado mostró ninguna evidencia de deslaminación. Antes del implante, la resistencia de la adhesión entre dos capas opuestas es aproximadamente $8,1 \pm 2,1$ N/mm para una construcción de múltiples capas entrecruzada con EDC 1 mM.

55 60 La temperatura de contracción ($^{\circ}$ C) es un indicador del grado de entrecruzamiento de la matriz. Cuanto más alta sea la temperatura de contracción más entrecruzado está el material. La ICL no entrecruzada, irradiada por rayos gamma tiene una temperatura de contracción de aproximadamente $60,5 \pm 1,0$. En la realización preferida, las prótesis entrecruzadas con EDC deberían tener preferiblemente una temperatura de contracción entre $64,0 \pm 0,2^{\circ}$ C y $72,5 \pm 1,1^{\circ}$ C para dispositivos que están entrecruzados con EDC de 1 mM con aproximadamente EDC de 100 mM al 50% de acetona, respectivamente.

65 70 Las propiedades mecánicas incluyen la integridad mecánica de manera que la prótesis resista la fluencia durante el biorremodelado y adicionalmente es flexible y suturable. El término “flexible” significa buenas propiedades de manejo para facilitar el uso en la clínica.

75 80 El término “suturable” significa que las propiedades mecánicas de la capa incluyen la retención de la sutura que permite que las agujas y los materiales de sutura atraviesen el material de la prótesis en el momento de la sutura de la prótesis a secciones del tejido nativo. Durante la sutura, dichas prótesis no deben romperse como resultado de las fuerzas de tensión aplicadas en ellas por la sutura, ni deben romperse cuando se anuda la sutura. La suturabilidad de las prótesis, es decir, la capacidad de las prótesis para resistir la rotura cuando se suturan, está relacionada con la fuerza mecánica intrínseca del material de la prótesis, el espesor del injerto, la tensión aplicada a la sutura y la velocidad con la que el nudo se cierra. La retención de la sutura para una prótesis plana altamente entrecruzada de 6

ES 2 323 661 T3

capas entrecruzada en 100 mM EDC y 50% acetona es aproximadamente $6,7 \pm 1,6$ N. La retención de la sutura para una prótesis de 2 capas entrecruzada en 1 mM EDC en agua es aproximadamente $3,7 N \pm 0,5$ N. La fuerza más baja de la retención de la sutura preferida es aproximadamente 2 N para una prótesis plana entrecruzada de 2 capas; la fuerza de un cirujano cuando sutura es aproximadamente 1,8 N.

5 Tal y como se utiliza en la presente memoria, el término “anti-fluencia” significa que las propiedades biomecánicas de la prótesis imparten durabilidad de manera que la prótesis no se alargue, distienda o expanda más allá de los límites normales después del implante. Como se describe más adelante, la extensión total de la prótesis implantada de esta invención está dentro de los límites aceptables. La prótesis de esta invención adquiere una resistencia al alargamiento 10 como función del biorremodelado celular posterior al implante por el reemplazo del colágeno estructural por las células anfítrionas a una velocidad mayor que la pérdida de fuerza mecánica de los materiales implantados debida a la biodegradación y remodelado.

15 El material tisular procesado de la presente invención es “semipermeable”, incluso si se ha hecho capas y unido. La semipermeabilidad permite el crecimiento de células anfítrionas hacia el interior del tejido receptor para el remodelado o para la deposición de agentes y componentes que afectarán la capacidad de biorremodelación, crecimiento celular hacia el interior del tejido receptor, prevención o estimulación de la adhesión o flujo sanguíneo. La cualidad “no porosa” de la prótesis previene el paso de fluidos que quieren retenerse mediante el implante de la prótesis. A la inversa, los poros pueden formarse en la prótesis si se requiere una cualidad porosa o perforada para una aplicación de 20 la prótesis.

La integridad mecánica de la prótesis de esta invención está también en su aptitud para ser recubierta o plegada, así como la capacidad de cortar o recortar la prótesis obteniendo un borde limpio sin deslaminar o deshilachar los bordes de la construcción.

25 Los ejemplos siguientes se proporcionan para explicar mejor la práctica de la presente invención y no deberían interpretarse de ninguna manera como límite del alcance de la presente invención. Se apreciará que el diseño del dispositivo en su composición, forma y espesor debe seleccionarse dependiendo de la indicación final para la construcción. Los expertos en la técnica reconocerán que pueden hacerse varias modificaciones a los métodos descritos 30 aquí, sin alejarse del espíritu y alcance de la presente invención.

Ejemplos

Ejemplo 1

Limpieza Química del Intestino Delgado Porcino Limpiado Mecánicamente

El intestino delgado de un cerdo se recogió y se limpió mecánicamente utilizando una máquina limpiadora de intestino Bitterling (Nottingham, UK) que elimina enérgicamente las capas de grasa, músculo y mucosales de la túnica 40 submucosa utilizando una combinación de acción mecánica y lavado o enjuagado utilizando agua. La acción mecánica puede describirse como una serie de rodillos que comprimen y arrancan las capas sucesivas de la túnica submucosa cuando el intestino intacto pasa entre ellos. La túnica submucosa del intestino delgado es comparativamente más dura y rígida que el tejido circundante y los rodillos estrujan los componentes más blandos eliminándolos de la submucosa. 45 El resultado de la limpieza de la máquina fue tal que sólo permaneció la capa submucosal del intestino.

El resto del procedimiento, limpieza química según la Solicitud Internacional PCT No. WO 98/49969 de Abraham, *et al.*, se realizó en condiciones asépticas y a temperatura ambiente. Todas las disoluciones químicas se utilizaron a temperatura ambiente. El intestino se cortó longitudinalmente hacia el lumen y se cortó en secciones de 15 cm. El material se pesó y se puso en contenedores en una proporción de aproximadamente 100:1 v/v de disolución respecto 50 al material intestinal.

A. A cada contenedor o recipiente que contiene intestino se añadió aproximadamente 1 L de disolución de etilenodiaminetetraacético sal tetrasodio (EDTA) 100 mM/disolución de hidróxido de sodio (NaOH) 10 mM esterilizada con un filtro de 0,22 μ m (micrómetros). Los contenedores o recipientes se pusieron en una mesa agitadora durante 55 aproximadamente 18 horas a aproximadamente 200 rpm. Después de agitar, la disolución EDTA/NaOH se eliminó de cada botella.

B. A cada contenedor o recipiente se añadió aproximadamente 1 L de disolución de ácido clorhídrico (HCl) 1 M/disolución de cloruro de sodio (NaCl) 1 M esterilizada con un filtro de 0,22 μ m. Los contenedores o recipientes se pusieron en una mesa agitadora durante entre 6 y 8 horas a aproximadamente 200 rpm. Después de agitar, la disolución HCl/NaCl se eliminó de cada contenedor o recipiente.

C. A cada contenedor o recipiente se añadió aproximadamente 1 L de disolución de cloruro de sodio (NaCl) 1 M/disolución salina tamponada con fosfato (PBS) 10 mM esterilizada con un filtro de 0,22 μ m. Los contenedores o recipientes se pusieron en una mesa agitadora durante aproximadamente 18 horas a 200 rpm. Después de agitar, la disolución NaCl/PBS se eliminó de cada contenedor o recipiente.

ES 2 323 661 T3

D. A cada contenedor o recipiente se añadió aproximadamente 1 L de disolución de PBS 10 mM esterilizada con un filtro de 0,22 µm. Los contenedores o recipientes se pusieron en una mesa agitadora durante aproximadamente dos horas a 200 rpm. Después de agitar, la disolución salina tamponada con fosfato se eliminó de cada contenedor o recipiente.

5 E. Finalmente, a cada contenedor o recipiente se añadió aproximadamente 1 L de agua esterilizada con un filtro de 0,22 µm. Los contenedores o recipientes se pusieron en una mesa agitadora durante aproximadamente una hora a 200 rpm. Después de agitar, el agua se eliminó de cada contenedor o recipiente.

10 Las muestras de ICL procesadas se cortaron y se fijaron para análisis histológicos. La tinción con hemotoxilina y eosina (H y E) y tricrómico de Masson se realizó tanto en las muestras de sección transversal como longitudinal de los tejidos control y de los tratados. Las muestras de ICL procesadas aparecieron sin células ni restos celulares mientras que las muestras control no tratadas aparecieron como era normal y esperado con muchas células.

15 Ejemplo 2

Estudio Comparativo de Otros Tratamientos de Limpieza para Tejido Colagenoso

20 Se compararon otros métodos para desinfectar y esterilizar tejidos colagenosos descritos en la Patente de EEUU No. 5.460.962 de Kemp con métodos similares descritos por Cook, *et al.* en la solicitud PCT Internacional WO 98/22158. Se hicieron los ejemplos 1,2 y 3, de Kemp, además de un método con ácido peracético no tamponado.

25 Se recogieron los intestinos delgados de 4 cerdos grandes. Los intestinos se obtuvieron, se eliminó la capa mesentérica exterior y los intestinos se limpian con agua.

30 El estudio incluyó siete condiciones: la Condición A se realizó según la descripción del Ejemplo 1 en Cook *et al.* en la Solicitud PCT Internacional WO 98/22158. La Condición B fue una variación de A respecto a que el material intestinal se limpió mecánicamente antes de emplear el tratamiento químico descrito. Las Condiciones C, D y E se realizaron según los métodos de los Ejemplos 1, 2 y 3 de la Patente de EEUU No. 5.460.962 de Kemp. En todas las condiciones, se utiliza una proporción de diez a uno de disolución a material, esto es, 100 g de material tisular se trata con 1 L de disolución.

35 A. Se puso material de cada uno de los 4 intestinos en botellas separadas (n=5) que contienen un litro de disolución de ácido peracético al 0,2% en etanol al 5% (pH 2,56) y se agitó en una plataforma agitadora. Después de dos horas de agitación, la condición A se limpió mecánicamente en la máquina limpiadora de intestinos Bitterling.

40 Para las otras seis condiciones, B a G, el intestino se limpió mecánicamente utilizando la máquina limpiadora de intestinos Bitterling antes del tratamiento químico. Después de la limpieza mecánica, se pusieron piezas representativas de los 4 intestinos en botellas que contienen disolución para el tratamiento químico. Las botellas se agitaron 18 ± 2 horas en una plataforma. Las seis condiciones restantes, B a G, fueron como sigue:

B. Una disolución de un litro de ácido peracético al 0,2% en etanol al 5% (pH 2,56) (n=5).

45 C. Una disolución de un litro de ácido peracético al 0,1% en disolución salina tamponada con fosfato (pH 7,2) (n=3).

D. Una disolución de un litro de ácido peracético al 0,1% y cloruro de sodio 1M (NaCl) (pH 7,2) (n=3).

50 E. Una disolución de un litro de ácido peracético al 0,1% y 1M NaCl (pH 2,9) (n=3).

F. Una disolución de un litro de disoluciones de “limpieza química” como se ha mencionado anteriormente en el Ejemplo 1 (n=4).

55 G. Una disolución de un litro de ácido peracético al 0,1% en agua desionizada, tamponada a pH 7,0 (n=2).

Después de los tratamientos químicos y mecánicos, todas las condiciones se lavaron durante un total de 4 veces con agua purificada esterilizada por filtración. El material tratado mecánicamente y químicamente se tiñó groseramente para examinar los restos celulares con hematoxilina de Mayer. La evaluación morfológica incluyó técnicas de tinción de Hematoxilina y Eosina, Tricrómico de Masson y Rojo de Alizarina. Los resultados histológicos de los diferentes tratamientos muestran que el método de la condición A rindió un material del que fue difícil eliminar las capas mucosales en Bitterling después del tratamiento químico. El material se tuvo que someter a Bitterling aproximadamente 10-12 veces más. El material estaba muy hinchado al principio y tenía una cantidad significativamente grande de restos celulares en la superficie y en la vasculatura del material. El método de la condición B también estaba muy hinchado y también demostró una cantidad significativamente grande de restos celulares en la superficie y en la vasculatura del material. Los métodos de las condiciones C y D rindieron un material no hinchado que tenía restos celulares mínimos en la vasculatura. La condición E rindió un material que estaba ligeramente hinchado y que contenía restos celulares mínimos en la vasculatura.

ES 2 323 661 T3

Se utilizó un kit de aislamiento de ADN/ARN (Amersham Life Sciences) para cuantificar el ADN/ARN residual contenido en los tejidos limpiados. Los resultados se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1: Resultados del kit de Aislamiento de ADN/ARN ($\mu\text{g ADN/mg de tejido}$)							
Condición	A	B	C	D	E	F	G
Media ±	2,16±0,3	2,1±0,48	0,32±0,1	1,92±0,2	0,32±0,2	0±0	1,42±0,03
Dev. Est.	2		1	8	3		

Los análisis morfológicos se correlacionan con la cuantificación de ADN/ARN para mostrar que los regímenes de limpieza de las condiciones A y B resultan en una matriz tisular colagenosa que todavía tiene un alto contenido celular y que contiene ADN residual como resultado de esto. Los métodos de limpieza de Kemp son mucho más eficaces para eliminar las células y restos celulares de las matrices tisulares colagenosas. Finalmente, el método de limpieza química de la Condición F, descrito en la Solicitud PCT Internacional No. WO 98/49969 de Abraham, *et al.* y mostrado en el Ejemplo 1 anterior, elimina todas las células y restos celulares y su ADN/ARN hasta un nivel indetectable por estos métodos.

Ejemplo 3

Método para fabricar una Construcción de ICL multicapa

Se utilizó la ICL procesada según el método del Ejemplo 1 para formar una construcción de múltiples capas que tiene 2 capas de ICL. Se puso una lámina estéril de policarbonato poroso (tamaño de poro, fabricante) en el campo estéril de una cabina de flujo laminar. La ICL se secó con TEXWIPES estériles (LYM-TECH Scientific, Chicopee, MA) para absorber el exceso de agua del material. Se quitaron del material de ICL sus etiquetas linfáticas del lado abluminal y se cortó en partes de aproximadamente 15,2 cm de longitud (aprox. 6 pulgadas). Una primera lámina de ICL limpia se puso en la lámina de policarbonato, con el lado mucosal hacia abajo, eliminando manualmente las burbujas de aire, plegamientos y arrugas. Una segunda lámina de ICL limpia se puso en la parte superior hacia, o lado abluminal, de la primera lámina con el lado abluminal de la segunda lámina en contacto con el lado abluminal de la primera lámina, de nuevo eliminando manualmente las burbujas de aire, plegamientos y arrugas. La lámina de policarbonato con las capas de ICL se situó hacia arriba con las capas de ICL hacia el flujo de aire entrante de la cabina de flujo laminar. Se dejó que las capas se secan durante aproximadamente 18 ± 2 horas en la cabina a temperatura ambiente, aproximadamente 20°C. Las capas secas de ICL se separaron de la lámina de policarbonato juntas sin separarlas o deslaminarlas y se transfirieron a un baño de agua a temperatura ambiente durante aproximadamente 15 minutos para rehidratar las capas.

La disolución de entrecruzamiento química de 100 mM EDC/50% Acetona se preparó inmediatamente antes del entrecruzamiento ya que EDC perderá su actividad con el tiempo. Las capas hidratadas se transfirieron a una batea poco profunda y el agente de entrecruzamiento se decantó suavemente en la batea asegurando que las capas estaban a la vez cubiertas y flotando libremente y que no estaban presentes burbujas de aire por debajo o en el interior de las construcciones. La batea se cubrió y se dejó durante aproximadamente 18 ± 2 horas en una campana de humos. La disolución de entrecruzamiento se decantó y se desecharó. Las construcciones se lavaron en la batea tres veces con agua estéril durante aproximadamente cinco minutos para cada lavado. Utilizando un escalpelo y una regla, las construcciones se cortaron al tamaño deseado.

Las construcciones se descontaminaron con tratamiento con ácido peracético (PA) al 0,1% estéril neutralizado con hidróxido de sodio 10 N NaOH según la Patente de EEUU No. 5.460.962. Las construcciones se descontaminaron en contenedores Nalge de 1 L en una plataforma agitadora durante aproximadamente 18 ± 2 horas. Las construcciones se lavaron con tres volúmenes de agua estéril durante 10 minutos cada lavado y la actividad PA se monitorizó por ensayo de tiras Minncare para asegurar su eliminación de las construcciones.

Las construcciones se envasaron en bolsas de plástico utilizando un sellador de vacío que se pusieron a su vez en bolsas herméticas para irradiación gamma entre 25,0 y 35,0 kGy.

Ejemplo 4

Estudios de Implante Utilizando Construcciones de ICL de Múltiples Capas

Se utilizaron conejos blancos de Nueva Zelanda para los análisis *in vivo* y todos los procedimientos se realizaron cumpliendo las directrices del Animal Care and Use Committee (ACUC). Se creó un defecto de espesor completo de aproximadamente cinco centímetros en el músculo rectus abdominis en cada animal y se reparó con una prótesis de parche de 6 capas. Los parches se eliminaron a los 30, 66, 99 y 180 días después del implante. Se sacrificaron tres

ES 2 323 661 T3

conejos en cada punto de tiempo y se examinaron para detectar cualquier evidencia de hernia, inflamación, infección o adhesiones. Los parches explantados se fijaron en formalina y se tiñeron con hematoxilina y eosina o rojo de alizarina para la evaluación histológica de infiltración celular, respuesta inflamatoria y calcificación. En algunos casos, se evaluaron los parches no fijados para determinar el efecto del implante en las características mecánicas utilizando análisis MTS uniaxial.

Todos los animales experimentaron un curso post-operatorio sin eventos sin hinchazón, hernia o inflamación en el sitio de la reparación de la pared abdominal. En el momento del explante, la superficie interior del parche estaba cubierta con una capa de tejido brillante que resultó ser continua con el peritoneo parietal. En un animal explantado 10 después de 30 días, se observó una adhesión de grado uno a la víscera abdominal explantada y resultó estar asociada con la línea de sutura en lugar de con el implante en sí mismo. Se observó neovascularización de la superficie peritoneal de los parches en todos los puntos de tiempo.

En 30 días, la superficie peritoneal del parche estaba cubierta con mesotelio. Las células inflamatorias típicas de una 15 respuesta a un cuerpo extraño estaban presentes a lo largo del explante pero eran más predominantes en la periferia del parche. Las células inflamatorias consistían fundamentalmente en macrófagos y células gigantes multinucleadas con menos linfocitos, heterófilos y fibroblastos. Después de 66 días del implante, la histología fue similar pero con menos células inflamatorias. Además, los parches habían comenzado a incorporarse en el tejido nativo de la pared abdominal. A los 99 y 180 días, la infiltración de los fibroblastos del anfítrion era evidente por tinción con hematoxilina y eosina 20 y por tinción con tricrómico de Masson. La tinción con rojo de alizarina para calcio mostró que no había evidencia de calcificación en el material del parche. Pequeñas áreas focales de calcificación estaban asociadas con el material de sutura.

El Ensayo Mecánico se realizó en el momento del explante para determinar la resistencia última a la tracción (UTS) 25 de la construcción. Brevemente, el tejido se escindió dejando aproximadamente 2,54 centímetros de tejido circundante desde los bordes de la construcción. El tejido circundante en los extremos opuestos de la construcción se sujetó y se extendió hasta la rotura en tensión uniaxial a una proporción de deformación constante de $0,013 \text{ s}^{-1}$ utilizando un sistema de ensayo servohidráulico MTS con programa TestStar-SX. Se calculó la UTS partir de la fuerza mayor. Todas las roturas ocurrieron en la región del tejido de los especímenes de ensayo, lo que sugiere que la construcción era igual 30 o más firme que el tejido circundante, estaba bien integrada en el tejido circundante y mantenía una firmeza suficiente en su comportamiento como un parche de reparación de hernia.

La combinación de propiedades mecánicas y potencial para una buena integración en el tejido del anfítrion hacen 35 de la ICL un material prometedor para la reparación de tejidos blandos. Estos estudios han mostrado que la formación de adhesiones es mínima y que no hay indicación de calcificación en los parches. El análisis preliminar de las características mecánicas sugiere que esta construcción de colágeno puede mantener la firmeza necesaria a la vez que se remodela e incorpora en el tejido circundante. Esta capacidad del parche de remodelación proporciona una ventaja sobre los materiales prostéticos que no se integran bien en el tejido circundante.

40 Ejemplo 5

Técnicas de ensayo mecánico y propiedades de las Prótesis de ICL de Múltiples Capas

45 Se ensayaron las realizaciones preferidas de las construcciones de parches de ICL de múltiples capas formadas por el método del Ejemplo 3, incluyendo irradiación gamma. Las construcciones de 2, 4 y 6 capas de ICL entrecruzada con 100 mM EDC en 50% Acetona (100/50) y las construcciones de 6 capas entrecruzadas con 7 mM EDC/90% acetona v/v en agua (7/90) y 1 mM EDC en agua (1/0) se evaluaron utilizando varias medidas. Los resultados se resumen en la Tabla 2.

50 El ensayo de rotura por tracción se realizó utilizando un sistema de ensayo servohidráulico MTS con programa TestStar-SX. Tiras de 1,25 cm de ancho se extendieron hasta la rotura en tensión uniaxial a una proporción de deformación constante de $0,013 \text{ s}^{-1}$. Se calcularon la pendiente de la región lineal (E_Y) y la resistencia última a la tracción (UTS) a partir de las curvas de esfuerzo deformación.

55 La firmeza de la adhesión entre las capas se ensayó utilizando un protocolo estándar para el ensayo de adhesivos (ASTM D 1876-95). La firmeza de la adhesión es la fuerza media requerida para desprender dos capas de ICL laminada a una velocidad constante de 0,5 cm/seg.

60 Se utilizó un calorímetro de barrido diferencial para medir el flujo de calor hacia y desde una muestra en condiciones termales controladas. La temperatura de contracción se definió como la temperatura de inicio del pico de desnaturización en el gráfico temperatura-energía. La retención de la sutura no se realizó en las construcciones de 2 ó 4 capas entrecruzadas en 100 mM EDC y 50% acetona porque la retención de la sutura ($3,7 \text{ N} \pm 0,5 \text{ N}$) para una construcción de 2 capas entrecruzada en 1 mM EDC y sin acetona (mucho menos entrecruzada) estaba muy por encima de la especificación mínima de 2 N. La firmeza de la laminación entre las capas de ICL y la temperatura de contracción son dependientes de la concentración de entrecruzamiento y la adición de acetona en lugar de del número 65 de capas en una construcción.

ES 2 323 661 T3

Tabla 2: Propiedades Mecánicas de Construcciones ICL de Múltiples Capas					
Análisis Mecánico	2 Capas 100/50	4 Capas 100/50	6 Capas 100/50	6 Capas 7/90	6 Capas 1/0
Resistencia Última a la Tracción (N/mm)	$0,6 \pm 0,1$	$3,1 \pm 0,2$	$2,0 \pm 0,2$	$2,7 \pm 0,2$	$1,3 \pm 0,4$
Módulo de Young (MPa)	$38,0 \pm 5,8$	$49,5 \pm 4,0$	$35,9 \pm 2,6$	$43,0 \pm 1,2$	$14,5 \pm 7,8$
Resistencia de la Laminación (N/m)	$39,7 \pm 6,1$			$63,1 \pm 24,4$	$8,1 \pm 2,1$
Retención de la Sutura (N)	no ensayada	no ensayada	$6,6 \pm 1,6$	$10,6 \pm 2,2$	$10,9 \pm 2,8$
Temperatura de Contracción (°C)	$72,5 \pm 1,1$			$69,5 \pm 0,1$	$64,0 \pm 0,2$

Aunque la invención anterior se ha descrito en algún detalle mediante ilustración y ejemplo para propósitos de claridad y comprensión, será obvio para el experto en la técnica que pueden practicarse determinados cambios y modificaciones en el alcance de las reivindicaciones adjuntas.

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. El método de preparar una prótesis que tiene dos o más capas superimpuestas unidas de matriz de tejido procesada, que comprende:

- (a) poner en capas dos o más láminas de capas de tejido hidratadas procesadas;
- (b) deshidratar dichas capas de tejido para adherir las capas entre sí;
- 10 (c) entrecruzar dichas capas de tejido con un agente de entrecruzamiento para unir las capas entre sí; y,
- (d) lavar dichas capas para eliminar el agente de entrecruzamiento;

15 en el que la matriz de tejido procesada es biorremodelable.

2. El método de la reivindicación 1 en el que dicha matriz de tejido procesada se obtiene de la túnica submucosa del intestino delgado.

20 3. El método de la reivindicación 2 en el que la túnica submucosa es esencialmente telopéptido de colágeno acelular.

4. El método de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la deshidratación se hace aproximadamente a 20°C.

25 5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la deshidratación se hace en aire, en vacío o por medios químicos.

6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la deshidratación es entre 10% Rh a 20% Rh o menos ó 10% a 20% p/p humedad o menos.

30 7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que las capas se rehidratan antes del entrecruzamiento.

35

40

45

50

55

60

65