



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

A61F 2/08 (2018.05); A61L 27/36 (2018.05); A61L 27/50 (2018.05)

(21)(22) Заявка: 2014150029, 14.03.2013

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
14.03.2013

Дата регистрации:
29.08.2018

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
11.05.2012 US 61/646,229

(43) Дата публикации заявки: 10.07.2016 Бюл. № 19

(45) Опубликовано: 29.08.2018 Бюл. № 25

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 11.12.2014

(86) Заявка РСТ:
US 2013/031427 (14.03.2013)

(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2013/169366 (14.11.2013)

Адрес для переписки:
129090, Москва, ул. Б. Спасская, 25, строение
3, ООО "Юридическая фирма Городисский и
Партнеры"

(72) Автор(ы):

ПЕДРОСО Дэниел (US),
ЭЛИ Мишель (US)

(73) Патентообладатель(и):

АрТиАй СЕРДЖИКАЛ, ИНК. (US)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: US 20020087211 A1, 04.07.2002.
AARON SETO, MS et al., Radioprotection of
Tendon Tissue via Crosslinking and Free
Radical Scavenging, Clic Orthp Relat Res
(2008) 466 : 1788-1795. US 20090269741 A1,
29.10.2009. A CHAUVEAU, The comparative
anatomy of the domesticaled animals, New
York, D Appleton and company, 1890. NELIA
PATRICIA GARCIA-MORALES, (см. прод.)

(54) КСЕНОГЕННЫЕ ИМПЛАНТАТЫ МЯГКИХ ТКАНЕЙ И СПОСОБЫ ИЗГОТОВЛЕНИЯ И
ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

(57) Реферат:

Изобретение относится к химико-фармацевтической промышленности и представляет собой способ обработки коровьего ксеногенного имплантата сухожилия, включающий этапы извлечения ксеноантигена из сухожилия, усиления прочности сухожилия, включающего обработку сахарным раствором глюкозы, стерилизацию сухожилия и химическое ополаскивание сухожилия, где один или более указанных этапов состоят из введения в контакт

указанного коровьего ксеногенного сухожилия с очищающими средствами, в то время как к сухожилию прикладывают натяжение, и при этом величина указанного натяжения составляет между 267 и 334 Ньютонов, и, дополнительно, где имплантат при обработке погружают внутрь указанных очищающих средств в камере для обработки. Изобретение позволяет сделать очищение ксеногенного имплантата более эффективным и уменьшить его повреждения,

которые могут быть вызваны очищающими средствами. 8 з.п. ф-лы, 20 ил., 2 табл., 3 пр.

(56) (продолжение):

Effects of Muscle Architecture in Response to Gradual Lengthening, December 2007, Biomedical sciences. WO 2009079211 A1, 25.06.2009. RU 2440057 C1, 20.01.2012. В. И. ЧУЕШОВ, Промышленная технология лекарств, том 1, Харьков, издательство НФАУ, 2002.

R U 2 6 6 5 3 6 6 C 2

R U 2 6 6 5 3 6 6 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

A61F 2/08 (2018.05); A61L 27/36 (2018.05); A61L 27/50 (2018.05)(21)(22) Application: **2014150029, 14.03.2013**(24) Effective date for property rights:
14.03.2013Registration date:
29.08.2018

Priority:

(30) Convention priority:
11.05.2012 US 61/646,229(43) Application published: **10.07.2016** Bull. № 19(45) Date of publication: **29.08.2018** Bull. № 25(85) Commencement of national phase: **11.12.2014**(86) PCT application:
US 2013/031427 (14.03.2013)(87) PCT publication:
WO 2013/169366 (14.11.2013)

Mail address:

**129090, Moskva, ul. B. Spasskaya, 25, stroenie 3,
OOO "Yuridicheskaya firma Gorodisskij i
Partnery"**

(72) Inventor(s):

**PEDROSO Deniel (US),
ELI Mishel (US)**

(73) Proprietor(s):

ArTiAj SERDZHIKAL, INK. (US)(54) **XENOGRAFT SOFT TISSUE IMPLANTS AND METHODS OF MAKING AND USING**

(57) Abstract:

FIELD: medicine; pharmaceuticals.

SUBSTANCE: invention relates to the chemical and pharmaceutical industry and is a method of processing a bovine xenogeneic tendon implant comprising the steps of removing a xenoantigen from the tendon, enhancing the strength of the tendon including the treatment with a sugar glucose solution, sterilizing the tendon and chemically rinsing the tendon, wherein one or more of said steps consist of contacting said bovine xenogeneic tendon with cleaning agents,

while tension is applied to the tendon, and the magnitude of said tension is between 267 and 334 Newtons, and, in addition, where the implant is dipped into the inside of said cleaning agents in the processing chamber during processing.

EFFECT: invention provides more efficient purification of the xenogeneic implant and reduced damage, which can be caused by cleaning agents.

9 cl, 20 dwg, 2 tbl, 3 ex

РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] Данная заявка относится и испрашивает преимущества приоритета по предварительной патентной заявке США с регистрационным №61/646229, поданной 11 мая 2012 года, озаглавленной «Ксеногенные имплантаты мягких тканей и способы изготовления и использования». Предварительная заявка '229 включена в настоящее описание посредством ссылки во всей своей полноте.

ФИНАНСИРУЕМЫЕ ИЗ ФЕДЕРАЛЬНОГО БЮДЖЕТА ИССЛЕДОВАНИЯ И РАЗРАБОТКИ

[0002] [Не Применимо]

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[0003] Представленная заявка направлена на область имплантатов тканей и обработки имплантатов тканей для трансплантации, предпочтительно у людей. Имплантатами тканей предпочтительно являются ксеногенные имплантаты мягких тканей, хотя некоторые аспекты представленной заявки могут применяться к костным или твердым тканям и к более сложным структурам, таким как комбинированные костные или твердые имплантаты тканей или даже органы из аллогенных или ксеногенных источников. Представленная заявка предоставляет химический процесс, который нейтрализует, удаляет или по существу подавляет антигены из и стерилизует и/или укрепляет ксеногенные имплантаты. Представленные технологии производят имплантаты мягких тканей, имеющие превосходную структурную, механическую и/или биохимическую целостность. Представленная заявка также направлена на способы обработки ксеногенных имплантатов, включающих в себя мягкие ткани, такие как сухожилия и связки, и на имплантаты, создаваемые посредством подобных способов.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0004] Когда пациент сталкивается с ортопедическим повреждением, таким как повреждение передней крестообразной связки (ACL), идеальным решением данного недуга будет восстановление данной структуры или увеличение естественного процесса заживления способом, который восстанавливал бы морфологию, какой она была перед повреждением. К сожалению, было показано, что восстановление и регенерация ACL до настоящего времени является неудачной прежде всего вследствие недостатка заживления/восстановления нативных тканей естественным образом; вследствие этого, стандартным лечением была полная трансплантация. Было подтверждено, что трансплантация ACL посредством донорских человеческих трупных (т.е. аллотрансплантатных) сухожилий является эффективным вариантом предоставления пациентам возможности возврата к своему качеству жизни перед повреждением. Однако, возможности выбора аллотрансплантата обременены проблемой зависимости от исходного материала, который имеет большое непостоянство и ограниченную доступность. Хирурги пробовали уменьшить непостоянство трансплантатов посредством ограничения донорских критериев (например, принимая трансплантаты только от доноров < 45-летнего возраста); однако, подобные ограничения также усугубляются проблемой с доступностью.

[0005] Таким образом, цель состоит в поиске достаточного фонда донорской ткани, с аналогичными генетическими, физическими и физиологическими свойствами, которые могли бы ослаблять или устранять вышеуказанные проблемы. Это может быть сделано посредством использования ксеногенной ткани. С источником ксеногенной ткани генетическое строение донора можно выбирать и регулировать посредством разведения и управления стадом, можно отслеживать и регулировать производство для обеспечения наилучшего здоровья и мышечного тонуса, и можно планировать и выбирать возраст

донора. Подобные доноры таким образом имели бы исключительные биомеханические структуры, доступные для создания высококачественных трансплантатов, которые получали бы от них в их пиковом возрасте.

[0006] Имплантаты, включающие в себя мягкие ткани, могут быть имплантированы реципиенту для замены и/или восстановления существующих мягких тканей. Например, наследственные дефекты, заболевание и/или травма могут повреждать мягкие ткани таким образом, что необходима трансплантация и/или восстановление. Данными имплантатами могут быть аллотрансплантаты, аутоотрансплантаты или ксенотрансплантаты, а реципиентом может быть реципиент-человек, млекопитающее или животное. Имплантаты часто используют, когда реципиентом является пациент-человек. Имплантаты, содержащие мягкие ткани, используются, в том числе, у пациентов-людей, для замены среди других тканей сердечных клапанов, связок, сухожилий и кожи.

[0007] Необходимо обрабатывать имплантаты, особенно аутоотрансплантаты, аллотрансплантаты и ксенотрансплантаты, для нейтрализации, удаления или существенного уменьшения одного или более нежелательных компонентов и/или для привнесения одного или более необходимых компонентов. Например, имплантаты можно пассивировать или обрабатывать для удаления или инактивирования бактерий, вирусов, грибов и других патогенных микроорганизмов и антигенных составляющих.

[0008] Имплантаты, содержащие мягкие ткани, можно обрабатывать очищающими средствами и/или гамма-излучением. Однако существующие технологии страдают от одного или более недостатков. Нежелательные результаты излучения могут включать образование радикалов, водорода и углеводов с низкой молекулярной массой; повышенную ненасыщенность; обесцвечивание; и окисление. Использование некоторых химических стерилизующих средств (например, глутаральдегида) увеличивает риск того, что будет вызвана токсическая реакция. Кроме того, некоторые химические стерилизующие средства (например, пероксиды) могут повреждать имплантат, особенно мягкие ткани, которые имеют тенденцию к несколько большей хрупкости, чем костные и твердые ткани. Особое беспокойство в связи с пассивацией имплантатов, включающих в себя мягкие ткани, состоит в том, что обработанная мягкая ткань может страдать от повышенной слабости, пониженной жесткости, пониженной прочности или пониженной биосовместимости, что может приводить к непостоянной эффективности имплантата. Необходимо иметь способы обработки, включая способ пассивации, который не вызывает излишней слабости или уменьшение жесткости или прочности или биосовместимости мягкой ткани.

[0009] Гамма-излучение, для того чтобы обеспечить уничтожение патогенных микроорганизмов, таких как вирус иммунодефицита человека (ВИЧ), используется в дозах, которые приводят к разрушению ткани (например, 3,5 миллирадиан; см. например, Rasmussen, et al. J. Arthroscopic and Related Surgery, 10(2):188-197, (1994); Goertzen, et al. British Soc. of Bone and Joint Surg. 77:204-211 (805); Loty, et al. International Orthopaedics, 14:237-242, (1990)). Было обнаружено, что использование этиленоксида приводит к тому, что имплантаты создают воспалительные реакции (Kudryk, et al. J. Biomedical Materials, 26:1477-1488, (1992); Thoren, et al. Clin. Orthopaedics, 318:259-263, (1995); Simonian, et al. Clin. Orthopaedics, 302:290-296, (1994); Jackson, et al. Am. J. Sports Medicine, 18:1-9, (1990)). Стандартные обработки химическим раствором, являясь эффективными при стерилизации поверхностей, с которыми растворы вводят в контакт, имеют тенденцию к недостаточному проникновению для достижения в промежуточные пространства тканей, где могут находиться потенциально патогенные микроорганизмы. Что касается

стерилизации мягкой ткани, особую озабоченность вызывает возможность повреждения мягкой ткани за счет излучения, этиленоксида или обработки химическим раствором, потому что мягкие ткани более подвержены повреждению, чем костная ткань. Даже более мягкие стерилизаторы, такие как пероксиды, могут вызывать повреждение

5 вследствие набухания тканей и присутствия остаточных побочных продуктов реакции.

[0010] Необходимый способ обработки включает один или более следующих признаков: эффективное удаление или инактивирование широкого диапазона бактериальных, вирусных и грибковых патогенных микроорганизмов; отсутствие токсичности трансплантата; сохранение или улучшение необходимых характеристик

10 тканей, таких как биомеханическая прочность или индуцирующие рост свойства; эффективность в широком диапазоне рабочих модификаций и/или для большого множества типов тканей; возможность заключения процесса в контейнере для ткани финального имплантата, для обеспечения стерильной упаковки и доставки для имплантации; возможность применения систем автоматического управления и

15 мониторинга и разработки автоматического и согласованного процесса.

[0011] Проблемой, связанной с разработкой ксеногенного имплантата, является достаточное удаление чужеродных ксеноантигенов. Присутствие подобных эпитопов, особенно Gal α 1-3Gal $_1$ -4GlcNAc-R (часто упоминаемых, как альфа-Gal) является важным для нейтрализации, удаления или существенного уменьшения благодаря организму

20 человека, имеющему антитела, которые выделяют конкретно данный гликоконъюгат. Трансплантаты, полученные из ксеногенных источников, которые содержат данный ксеноантиген, остро отторгаются организмом человека после имплантации.

РАСКРЫТИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0012] В одном аспекте, представленная заявка направлена на ксеногенный тканевый

25 имплантат для применения у пациента-человека.

[0013] Кроме того, представленная заявка направлена на имплантат мягкой ткани, предпочтительно для трансплантации ACL, и предпочтительно, выполненный из ксеногенной ткани. Материал-источник ксенотрансплантата является регулируемым и не содержит губчатую энцефалопатию крупного рогатого скота (BSE) или другое

30 специфическое или неспецифическое для ксенотрансплантата заболевание, которое может представлять угрозу для человека-реципиента. Трансплантаты, полученные после обработки, являются биосовместимыми для людей-реципиентов, по существу без вредной иммунной реакции или отторжения вследствие ксеногенных антигенов.

Трансплантаты, полученные после обработки, в некоторых вариантах осуществления являются биоактивными, с улучшенным заживлением, ремоделированием и

35 инкорпорированием.

[0014] Представленная заявка дополнительно направлена на способы получения имплантата, содержащего мягкую ткань, более подходящие для имплантации реципиенту. Мягкие ткани (такие как сухожилия и связки), обработанные согласно

40 представленным технологиям, целиком или частично пассивированы за счет контакта с очищающими средствами, такими как растворы, заключающие в себе любой из окисляющего стерилизатора (например, перекиси водорода), одного или более моющих средств, солевого раствора, углевода, спирта, кислотных или щелочных компонентов и/или их комбинаций. Ткани для имплантации людям предпочтительно получают из

45 ксеногенных источников. В некоторых вариантах осуществления, предпочтительным является использование стадии обработки по меньшей мере одним углеводом (например, сахаром).

[0015] Предпочтительные способы включают колебание давления в камере,

закрывающей в себе материал имплантата в присутствии различных чистящих растворов, с необязательным использованием обработки ультразвуком. Для нейтрализации, удаления или существенного уменьшения количества ксеноантигенов осуществляют специфические стадии способа, также в то же время усиливая механические свойства и предпочтительно улучшая скорость заживления имплантата. Полученный в результате имплантат может быть даже прочнее, чем нативная ткань, имеет пониженные уровни микрофлоры, а также может иметь более быстрое инкорпорирование после имплантации по сравнению с другими доступными тканевыми трансплантатами.

[0016] В некоторых вариантах осуществления обработка может происходить в открытом или закрытом сосуде. Например, определенные аспекты представленной заявки могут осуществляться целиком или частично внутри металлического, стеклянного или полимерного лабораторного сосуда или ванны с гладким ободом для легкого манипулирования тканями и наливания химических препаратов в сосуд и из него. Определенные аспекты заявки также могут быть осуществлены на практике с использованием сосуда с крышкой с посадкой на резьбе или с натягом, которые привинчивают или защелкивают, обеспечивая закрывание для предотвращения распыливания или загрязнения в процессе обработки, погрузки-разгрузки, транспортировки или хранения ткани. Некоторые или все элементы обработки могут осуществляться с циклическим изменением давления или без него, и с обработкой ультразвуком или без него.

[0017] Предусматривается, что ткань может оставаться на своем месте в то время, как различные химические препараты или химические растворы вводят в контакт посредством наливания или протекания через сосуд или по или через ткань, или посредством добавления и удаления растворов или химических препаратов для обработки либо в открытый, либо в закрытый сосуд, камеру или контейнер. Предусматривается, что сосуд можно изменять с открытого на закрытый перед одной или более стадий обработки, в процессе или после одной или более стадий обработки, и что циклическое изменение давления, натяжение и обработка ультразвуком может применяться в способе или исключаться из него перед одной или более стадий обработки, в процессе или после любой одной или более стадий обработки. Дополнительно предусматривается, что ткань можно пропускать через или помещать в раствор, затем извлекать из или вынимать из данного раствора и в другой раствор для следующей стадии обработки.

[0018] Дополнительно предусматривается, что могут быть применены или включены некоторые варианты осуществления представленной заявки наряду со сценариями обработки, не требующими или не выполненными вокруг любого конкретного сосуда для хранения или обработки, способов, опирающихся на поток химических веществ для обработки через ткань, включая костную или твердую ткань и сухожилия или другие мягкие ткани, способов, проходящих внутри открытой или закрытой ультразвуковой ванны, способов хирургической обработки ткани и различных комбинаций изложенного выше, таких как способы, изложенные, например, в патентах США 6837907; 6024735; 5977432; 5977034; 5976104; 5820581; 5797871; и 5556379, которые все включены в данную заявку.

[0019] В частности, необходимо заметить, что способы обработки представленной заявки, относящиеся к регулируемому удалению или уменьшению ксеноантигенов, могут быть осуществлены на практике в отношении ксенотрансплантатов множества типов тканей и могут быть применимы для их изготовления, включая трансплантаты

мягких тканей, таких как сухожилия, связки, кожа, твердая мозговая оболочка, фасция и другие соединительные ткани, а также включая трансплантаты твердых тканей, таких как кость и компоненты - производные кости, такие как кортикальный слой кости, губчатое вещество кости, деминерализованный костный матрикс, сборные костные трансплантаты и трансплантаты либо естественного происхождения, либо сборные комбинации твердой и мягкой ткани, такие как имплантат кость-сухожилие или кость-сухожилие-кость.

[0020] Способ данной заявки предусматривает обработку имплантата, посредством чего костный мозг, кровь, белки и твердые частицы эффективно нейтрализуются, удаляются или существенно уменьшаются, так что то, что остается, представляет собой по существу тканевый матрикс, пассивированный тканевый матрикс, биоинертный тканевый матрикс или биоактивный тканевый матрикс, в котором достигается сильное уменьшение в любом виде эндогенного материала и/или жизнеспособных микроорганизмов. Как описано более подробно ниже, это предпочтительно достигается посредством способа циклического изменения или колебания давления, действующего множество чистящих и стерилизующих растворов, которые обуславливают эффективное взаимопроникновение в матрицу. За счет повторяющегося чередования и изменения чистящих растворов, каналы по существу любой пористой матрицы прочищаются и промываются. Используют определенный запрограммированный (необязательно предварительно определенный, предварительно запрограммированный) цикл промываний, предпочтительно с одновременной обработкой ультразвуком (также известной как ультразвуковая бомбардировка), для достижения проникающей стерилизации имплантата. Есть основания полагать, что комбинация колеблющегося давления текучей среды и ультразвуковой энергии ускоряет взаимопроникновение растворов и удаление эндогенных веществ.

[0021] Дополнительно во время процесса используется осмотический градиент, который генерирует поток в ткань и из нее. Он упоминается также как осмотическое циклическое изменение (переход из гипотонических в гипертонические растворы). Это еще один способ, посредством которого костный мозг, кровь, белки, ксеноантигены и твердые частицы могут быть эффективно нейтрализованы, удалены или существенно уменьшены.

[0022] Предпочтительные способы включают использование кинематического ограничения во время процесса очищения. Применение кинематического ограничения (предпочтительно натяжения) к имплантату в то время, как его вводят в контакт с очищающими средствами (такими как, например, моющее вещество, спирт или пероксид и т.д.) может создавать более эффективное очищение и уменьшать всякое повреждение, вызываемое очищающими средствами.

[0023] Предпочтительные способы также могут включать стадию увеличения итогового pH трансплантата до уровня, который является базовым (pH больше, чем 7, предпочтительно приблизительно 8). Не желая связывать себя теорией, трансплантаты мягких тканей, которые имеют щелочной pH, могут участвовать в усиленном заживлении трансплантатов. Есть основания полагать, что это обусловлено по меньшей мере частично тем фактом, что базовые окружающие условия увеличивают активность остеобластов. Также предусматривается, что в некоторых вариантах осуществления исключается стадия повышения pH. pH трансплантата без дополнительной стадии составляет между 5 и 7, предпочтительно приблизительно 6.

[0024] Предпочтительные имплантаты демонстрируют регулируемое уменьшение по меньшей мере одного ксеноантигена, составляющее приблизительно 60%,

расщепление трипсином меньше, чем приблизительно 10%, и прогнозируемое предельное усилие растяжения (UTF) на основании данных сортировки больше или равно приблизительно 1800 Н.

[0025] В других вариантах осуществления, имплантаты демонстрируют регулируемое уменьшение по меньшей мере одного ксеноантигена больше или равно приблизительно на 55%, расщепление трипсином меньше, чем приблизительно 10%, и прогнозируемое UTF на основании данных сортировки больше или равно приблизительно 2020 Н.

[0026] В некоторых вариантах осуществления данная заявка предоставляет способ изготовления безопасных и эффективных имплантатов мягких тканей (предпочтительно ксенотрансплантата) эффективным экономичным образом. В некоторых вариантах осуществления данная заявка предоставляет способ очищения, перфузии или пассивирования материалов имплантата, не затрагивая в то же время необходимых биологических свойств первоначальных материалов имплантата. В некоторых вариантах осуществления данная заявка создает материалы имплантата уменьшенной антигенности, и предпочтительно имплантаты повышенной биоактивности.

[0027] Один вариант осуществления представленной заявки представляет собой ксеногенный имплантат сухожилия, содержащий ксеногенное сухожилие, обработанное сахарным раствором, который проявляет повышенное послеоперационное заживление и/или прочность по сравнению и с сопоставимым аллогенным и с аутогенным имплантатом.

[0028] Ксеногенный имплантат может быть получен из ряда доступных ксеногенных источников. Например, имплантат может иметь происхождение от крупного рогатого скота. Имплантат может быть взят у коровы Санта-гертруда.

[0029] Ксеногенное сухожилие может быть выбрано из множества различных сухожилий, имеющихся в организме. Например, имплантат может содержать сухожилие переднего разгибателя. Например, имплантат может содержать медиальный разгибатель пальцев.

[0030] Ксеногенное сухожилие может демонстрировать приемлемый pH перед имплантацией. Например, имплантат может демонстрировать pH, составляющий приблизительно 8 перед имплантацией. В качестве альтернативы, имплантат может демонстрировать pH, составляющий приблизительно 8 перед имплантацией.

[0031] Сахаром может быть любой приемлемый сахар. Примеры подобных сахаров включают глюкозу, декстрозу, церелозу, альдозу, кетозу, полуацеталь, пиранозу, фуранозу, эритрозу, треозу, рибозу, арабинозу, маннозу, аллозу, альтрозу, ксилозу, ликсозу, гулозу, идозу, галактозу, талозу, сахарозу и фруктозу.

[0032] В одном варианте осуществления имплантат демонстрирует регулируемое уменьшение по меньшей мере одного ксеноантигена, составляющее приблизительно 60%, расщепление трипсином меньше, чем приблизительно 10%, и прогнозируемое UTF на основании данных сортировки больше или равно приблизительно 1800 Н.

Редуцированным ксеноантигеном может быть α -Gal. В альтернативном варианте осуществления, имплантат демонстрирует регулируемое уменьшение по меньшей мере одного ксеноантигена большее или равное приблизительно 55%, расщепление трипсином меньше, чем приблизительно 10%, и прогнозируемое UTF на основании данных сортировки больше или равно приблизительно 2020 Н.

[0033] Один вариант осуществления представленной заявки представляет собой способ обработки ксеногенного сухожилия, включающий: извлечение ксеноантигена из сухожилия, усиление прочности сухожилия, стерилизацию сухожилия, химическое ополаскивание сухожилия, необязательно разложение остаточной перекиси из сухожилия

и необязательно стимулирование щелочных свойств сухожилия. Данные стадии могут осуществляться в данном порядке или другом порядке.

[0034] Способ может дополнительно включать одну или более стадий контакта оговоренного химического раствора для обработки с сухожилием.

5 [0035] Фаза или фазы удаления ксеноантигена могут иметь соотношение воды и химических веществ (WCR) больше или равно приблизительно 1. Фаза или фазы усиления молекулярной силы могут иметь соотношение воды и химических веществ (WCR) меньше, чем приблизительно 1. Фаза или фазы стерилизации могут иметь соотношение воды и химических веществ (WCR) меньше или равно приблизительно 1. Весь процесс
10 может иметь соотношение воды и химических веществ (WCR), составляющее по существу приблизительно 0,90.

[0036] Один вариант осуществления представленной заявки представляет собой трансплантат крупного рогатого скота для трансплантации сухожилия, содержащий обработанное сухожилие переднего разгибателя, полученное от (1) породистого
15 животного породы Санта-гертруда, Браман, Абердин-ангусская (т.е. 100% только одной из них), (2) помеси с происхождением от 25% до 100% породы Санта-гертруда, Браман или Абердин-ангусская или их комбинации; (3) помеси с происхождением от 50% до 100% породы Санта-гертруда, Браман или Абердин-ангусская или их комбинации; или (4) любых помесей, включая по меньшей мере одного предка,
20 выбранного из породы Санта-гертруда, Браман или Абердин-ангусская; при этом трансплантат получают от животного между приблизительно 18 месяцев и приблизительно 36 месяцев и по меньшей мере приблизительно 200 кг стандартной массы туши в парном состоянии (HSCW) перед извлечением.

[0037] Трансплантат может использоваться для трансплантации передней
25 крестообразной связки (ACL) у человека. Трансплантатом может быть трансплантат, который имеет прочность разрушения больше, чем у средней нативной ACL человека

[0038] В одном варианте осуществления, сухожилием переднего разгибателя может быть медиальный разгибатель пальцев (EDM). В одном варианте осуществления, возраст животного составляет между приблизительно 18 месяцев и приблизительно 24 месяцев.
30 В одном варианте осуществления, HSCW животного перед извлечением составляет по меньшей мере приблизительно 295 кг.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[0039] Фиг. 1 показывает метод расчета одноцепной корреляции для сортировки сухожилий.

35 [0040] Фиг. 2 показывает данные тянущего усилия согнутого в петлю имплантата. Показано сухожилие, полученное с помощью способа заявки, против стерильно обработанного коровьего сухожилия, по сравнению с человеческим сухожилием.

[0041] Фиг. 3А-3С показывают различные гистологические картины для вскрытия в 3 месяца, 40х. Фиг. 3А показывает коровье сухожилие, полученное с помощью способа
40 заявки после имплантации бабуину. Фиг. 3В показывает необработанное коровье сухожилие (контроль). Фиг. 3С показывает нативное ACL для сравнения.

[0042] Фиг. 4А-4С показывают сравнение различных гистологических картин. Фиг. 4А показывает коровье сухожилие, полученное с помощью способа заявки после имплантации бабуину (3 месяца, 40х). Фиг. 4В в качестве справочной информации
45 показывает аутогенный трансплантат человеческого подколенного сухожилия (5 месяцев, 200х (Предшествующий уровень техники: Marumo 2005)). Фиг. 4С показывает нативное ACL бабуина (40х).

[0043] Фиг. 5А-5F показывают для сравнения различные гистологические картины

бедренного туннеля. Фиг. 5А показывает коровье сухожилие, полученное с помощью способа заявки после имплантации бабуину (4х). Фиг. 5В показывает увеличенную версию указанной области (20х). Фиг. 3С для сравнения показывает человеческий аутогенный трансплантат в 3 месяца, 400х (Scranton 1998). Фиг. 5D показывает коровье сухожилие, полученное с помощью способа заявки после имплантации бабуину (10х). Фиг. 5Е показывает увеличенную версию указанной области (40х). Фиг. 5F для сравнения показывает человеческий аутогенный трансплантат в 6 недель, 400х (Scranton 1998).

[0044] Фиг. 6А-6F для сравнения показывают различные гистологические картины большеберцового туннеля. Фиг. 6А показывает коровье сухожилие, полученное с помощью способа заявки после имплантации бабуину (4х). Фиг. 6В показывает увеличенную версию указанной области (20х). Фиг. 6С для сравнения показывает человеческий аутогенный трансплантат в 3 месяца, 400х (Scranton 1998). Фиг. 6D показывает коровье сухожилие, полученное с помощью способа заявки после имплантации бабуину (4х). Фиг. 6Е показывает увеличенную версию указанной области (40х). Фиг. 6F для сравнения показывает человеческий аутогенный трансплантат в 6 недель, 400х (Scranton 1998).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

[0045] В одном аспекте, представленная заявка направлена на область имплантатов, содержащих мягкую ткань для использования при имплантации у людей. Имплантаты мягких тканей представленной заявки предпочтительно получают из ксеногенных источников. Данная заявка предоставляет новый способ обработки материалов имплантата, включая, но без ограничения, аутогенные, аллогенные или ксенотрансплантатные материалы, включая костную и мягкую ткань и предпочтительно мягкую ткань, такую как связка или сухожилие. В частности, материалы ксеногенной мягкой ткани, обработанные согласно способу данной заявки допускают тщательное очищение, механическую обработку/формование/иссечение, стерилизацию, пакование, а затем имплантирование трансплантатов с экономией за счет масштабов ранее не возможной. Надлежащее удаление чужеродных ксеноантигенов выполняют таким образом, чтобы имплантаты представленной заявки не отторгались остро организмом человека после имплантации. Ксеногенные имплантаты мягких тканей представленной заявки обеспечивают достаточную структурную, механическую и/или биохимическую целостность для использования, например, в качестве замены ACL. Данные имплантаты обладают потенциалом улучшенных механических свойств и улучшенных заживляющих свойств (по сравнению с возможностями теперешних трансплантатов ACL). Термины «трансплантат» и «имплантат» используются взаимозаменяемо в данной заявке.

[0046] Как используется в данной заявке, термин «пассивировать» предназначен для обозначения устранения потенциально патогенных микроорганизмов и иммуногенных веществ из имплантата. Таким образом, данный термин предполагает как стерильность, так и уменьшенную антигенность, хотя данный термин не предполагает устранение полезных биологических свойств имплантата, таких как остеогенные свойства (остеоиндукция или остеоиндукция; слияние костей), естественная функциональность ткани и необходимая структурная прочность имплантата. Термин «пассивация» является предпочтительным для термина «стерилизация», потому что в то время, как стерилизация является целью, данный термин имеет абсолютную коннотацию, для которой возможность окончательной проверки ограничена состоянием области техники проведения подобных измерений и/или необходимостью сопутствующего разрушения ткани. В дополнение, в то время как имплантаты, полученные согласно способу данной заявки, не могут быть полностью лишены всякой антигенности или пирогенности,

данные нежелательные аспекты значительно уменьшаются, и это тоже предполагается термином «пассивация», как используется в данной заявке.

[0047] Как используется в данной заявке, термин «биоинертный» предназначен для обозначения пассивированного имплантата, который не отторгается или не сильно атакуется организмом хозяина.

[0048] Как используется в данной заявке термин «биоактивный» предназначен для обозначения имплантата или ткани с улучшенным заживлением, ремоделированием и/или инкорпорированием, который демонстрирует по меньшей мере одно или более явлений заживления или роста с более высокой скоростью, скорее, с более высоким качеством или с более большой прочностью, чем небioактивный имплантат или ткань.

[0049] Термины «перфузированный» или «перфузия», как используется в данной заявке, направлены на обозначение эффективного взаимопроникновения чистящих растворов в каналы и через них и щели материалов, предназначенных для имплантации реципиенту.

[0050] Как используется в данной заявке, термины «быстрый» или «быстро», как они применяются к процессу циклического изменения давления согласно данной заявке, означают промежутки времени порядка секунд и минут, а не часов или дней.

[0051] Термины «обрабатывать ультразвуком» или «обработка ультразвуком», как используется в данной заявке, означают применение звуковой или ультразвуковой энергии к контейнеру имплантата, подвергаемого обработке согласно способу данной заявки, в условиях, которые допускают эффективную передачу имплантату звуковой энергии, называемую также ультразвуковая бомбардировка. Звуковая энергия может передаваться посредством текучей среды на обрабатываемую деталь таким образом, чтобы достигалась эффективное очищение и разрушение бактерий и клеток, без получения в результате в общем ультраструктурного повреждения обрабатываемой детали.

[0052] «Мягкая ткань», как используется в данной заявке, относится к любой биологической ткани, не являющейся костью, включая, но без ограничения, сухожилия, связки, фасцию, суставы целиком, твердую мозговую оболочку, кожу, перикард, сердечные клапаны, вены, нервную ткань, подслизистую ткань (например, ткань кишечника) и хрящ.

[0053] «Мягкой тканью», описанной в данной заявке, обычно является коллагеновый материал, то есть аутоотрансплантат, аллотрансплантат или ксенотрансплантат, предпочтительно ксенотрансплантат. Мягкой тканью может быть сухожилие предварительно заданной длины, пучок сухожилий с одинаковой или с разными длинами, связка предварительно заданной длины, пучок связок с одинаковой длиной или с различными длинами, сегмент или сегменты перикардия, дерма, фасция, твердая мозговая оболочка, кожа, подслизистая ткань (например, ткань кишечника), хрящ или их комбинация. Предпочтительно, источником мягкой ткани является ксеногенное сухожилие.

[0054] «Имплантат» (или «трансплантат»), как используется в данной заявке, относится к любому материалу, имплантация которого человеку или животному считается полезной. Соответственно, имплантатом может быть полученный из ткани материал, такой как кость, кожа и тому подобное, или это может быть металлический или синтетический материал, имеющий наружную поверхность или внутреннюю структуру, которая может требовать очищение, стерилизацию или пассивацию. Имплантат может содержать аутогенную ткань, аллогенную ткань, ксеногенную ткань или их комбинации, и в случае минерализованных тканей, таких как кость, имплантат

может содержать минерализованную ткань, частично деминерализованную ткань, полностью деминерализованную ткань и их комбинации. Имплантат может содержать цельный или монолитный материал трансплантата, сборные костные материалы, такие как материалы, описанные в патентных заявках США, серийные номера 09/782594 и 09/941154, формованные имплантаты, такие как имплантаты, описанные в патентах США №№6440444 и 6696073, и аллогенные биосовместимые матрицы, такие как матрицы, описанные в патентных заявках США, серийные номера 10/754310 и 10/793976. Представленные способы и устройство также могут быть использованы при обработке имплантатов, таких как имплантаты, описанные в патентах США №№D461248; 6290718; 6497726; 6652592; 6685626 и 6699252. Все приведенные выше патенты и патентные заявки включены в данную заявку посредством ссылки.

[0055] По определению, «сухожилие» представляет собой коллагеновый канатик, который прикрепляет мышцу к месту ее происхождения, обычно к кости. По определению, «связка» представляет собой полосу коллагеновой ткани, которая соединяет кость или поддерживает внутренние органы. Однако подобные термины используются в какой-то степени взаимозаменяемо в области имплантатов и при упоминании сухожилия, также предполагается охват использования связки.

[0056] Хотя предпочтительными являются трансплантаты, содержащие только мягкую ткань, также включены имплантаты, которые содержат как мягкую ткань, так и кость, такие как трансплантат кость-сухожилие-кость. Трансплантат кость-сухожилие-кость содержит один или более костных блоков, и сухожилие (или связку), прикрепленное к одному или более костным блокам. Также включены варианты применения некоторых аспектов заявки к костным или твердым тканевым трансплантатам. Определенные аспекты заявки дополнительно могут быть применимы к более сложным структурам, включая сложные ткани, целые суставы и органы.

[0057] Предоставлены новые способы обработки имплантатов, содержащих мягкую ткань, включая, но без ограничения, костную и мягкую ткань, минерализованные или деминерализованные ткани и комбинации приведенных выше типов тканей. В частности, мягкая ткань, обработанная согласно представленным способам, допускает тщательное очищение, стерилизацию и/или пассивирование мягкой ткани, без излишнего структурного или химического повреждения мягкой ткани. Предпочтительной является ксеногенная мягкая ткань из-за ее высокой доступности и низкой стоимости, хотя аллогенная или аутогенная мягкая ткань может получить преимущество в результате обработки посредством представленных способов.

[0058] Представленная заявка предоставляет специфические стадии для осуществления удаления чужеродных ксеноантигенов в данном новом способе получения ксеногенных имплантатов, которые являются безопасными и эффективными у людей. Трансплантаты, полученные из ксеногенных источников, которые содержат чужеродные эпитопы, конкретно включая, но без ограничения, Gal α 1-3Gal $_1$ -4GlcNAc-R (часто упоминаемые как альфа-Gal) остро отторгаются организмом человека после имплантации. Авторы представленного изобретения установили, что одним из важных элементов при регулируемом удалении альфа-Gal (и других чужеродных эпитопов) из ксеногенного имплантата мягкой ткани является регулируемое и фокусированное использование осмотических градиентов в обработке.

[0059] Авторы представленного изобретения установили, что одной из важных стадий для получения жизнеспособного ксеногенного имплантата мягкой ткани является использование по меньшей мере одной стадии углеводной обработки, предпочтительно обработки с использованием раствора глюкозы. Глюкозная обработка ксеногенной

мягкой ткани предусматривает неферментативное гликирование. Не имея намерения ограничивать себя теорией, есть основания полагать, что данное гликирование обеспечивает «придание жесткости» или «усиление» ткани, которое является полезным, чтобы обеспечить возможность сохранения тканью своей механической прочности и структуры на протяжении всего процесса очищения. Авторы представленного изобретения определили, что коллаген чувствителен к химическому воздействию при относительно короткой продолжительности времени ($\sim < 6$ минут), если глюкозная обработка не проводится. В некоторых случаях, без глюкозы и явления гликирования сухожилия могут не перенести весь процесс очищения/пассивирования (т.е. потерять структурную целостность). В течение продолжительности воздействия данной первоначальной стадии глюкозы, обеспечение ткани по меньшей мере приблизительно 70 минут времени воздействия, и до 90 минут или более, является эффективным при используемых концентрациях.

[0060] Дополнительно во время процесса используется осмотический градиент, который генерирует поток в ткань и из нее. Он упоминается также как осмотическое циклическое изменение (переход из гипотонических в гипертонические растворы). В качестве неограничивающего примера, чистящие растворы могут претерпевать циклические изменения из DI воды, в солевой раствор и назад в DI воду. Также это можно выразить, как соотношение воды и химических веществ (WCR). WCR является показателем общего воздействия DI воды в течение всего процесса против воздействия химических препаратов или химических смесей (включая солевой раствор). Данный параметр предоставляет общий градиент процесса, который связан с удалением ксеноантигена, а также с устранением микрофлоры. Значения WCR устанавливают при различных уровнях в зависимости от предназначенного действия для заданного набора стадий в пределах процесса в целом. Для удаления нежелательного материала из имплантата лучше всего использовать значения порядка 1,5-2. Однако данный параметр может иметь отрицательное воздействие на структуру имплантата, если набор слишком большой. В некоторых вариантах осуществления предпочтительные установки, чтобы сбалансировать конкурирующие спецификации конструкции, в пределах заданной стадии обработки, находятся между 0,60 и 1,05.

[0061] Общее воздействие вакуумметрического давления против положительного давления может быть определено в терминах соотношения разрежения и давления (VPR), которое, как также было обнаружено, является важным фактором для удаления нежелательных материалов внутри имплантата. VPR также оказывает влияние на механические свойства имплантата. Значения порядка 4 оказывают положительный эффект на улучшение растяжения имплантата и окончательное расширение (увеличение), защищая также при этом от молекулярного повреждения состава коллагена, что сделало бы имплантат более восприимчивым к ферментативной деградации после имплантации. Однако данный параметр может затрагивать относительную эффективность, посредством чего из имплантата может удаляться нежелательный материал (т.е. Ксеноантигены), если набор слишком большой. В некоторых вариантах осуществления, предпочтительные установки, чтобы сбалансировать конкурирующие спецификации конструкции, находятся между 1,90 и 2,40.

[0062] В общем WCR рассчитывают следующим образом:

Общее время в пределах процесса, в течение которого ткань подвергают воздействию DI только воды = Воздействие Воды (мин)

Общее время в пределах процесса, в течение которого ткань подвергают воздействию любого другого химического препарата или комбинации химических препаратов, не

являющихся водой (солевой раствор для данного вычисления считается химическим препаратом) = Химическое Воздействие (мин)

«Воздействие Воды»/«Химическое Воздействие» = WCR

[0063] Данное отношение может быть рассчитано для процесса в целом, а также
 5 рассчитано на стадию процесса. Как используется в данной заявке, стадия процесса представляет рецептурную область, направленную на создание специфической конструктивной характеристики итогового продукта. Каждая стадия процесса может состоять или содержать множество фаз процесса. Каждая фаза состоит из
 10 специфического химического раствора, воздействующего на ткань в заданных условиях, таких как время контакта, температура, давление, разрежение, циклическое изменение давления и обработка ультразвуком.

[0064] Высокое WCR означает большее воздействие воды, чем химическое воздействие, в пределах процесса в целом или в пределах конкретной стадии процесса. Например, значение 2 показывало бы, что для данной стадии или для процесса в целом воздействие
 15 воды вдвое больше, чем химическое воздействие. Было определено, что WCR оказывало большое воздействие на все интересующие факторы (например, удаление альфа-Gal, прочность и т.д.), а также было очень чувствительным к изменению. В некоторых случаях, значительные различия в описаниях, выработке, и т.д. могли бы достигаться за счет изменения данного параметра всего лишь приблизительно на 0,01 единицы. Это
 20 означает, что передвижение текучей среды (т.е. осмотическое циклическое изменение) было очень важно в способе для достижения необходимых свойств имплантата.

[0065] Наибольший эффект WCR наблюдался в связи с удалением альфа-Gal. При высоких соотношениях (например, 1,5 к 2,0 или выше) это улучшало удаление альфа-Gal, но более высокие значения могут иметь тенденцию «ослабления» сухожилия. При
 25 низких значениях (например, менее чем 1,0) увеличивается вероятность наличия токсического уровня оставшихся химических препаратов. Вследствие этого, для некоторых вариантов осуществления представленной заявки WCR процесса в целом было предпочтительно установлено приблизительно на 1,0.

[0066] В общем VPR рассчитывают следующим образом:

30 Общее время в пределах процесса, в течение которого ткань подвергают воздействию разрежения = Воздействие Разрежения (мин)

Общее время в пределах процесса, в течение которого ткань подвергают воздействию Давления = Воздействие Давления (мин)

«Воздействие Разрежения»/«Воздействие Давления» = VPR

35 [0067] Данное отношение также рассчитывается на стадию процесса. Высокие значения VPR означают, что Воздействие Разрежения больше, чем Воздействие Давления (для всего процесса или для конкретных стадий). Было обнаружено, что данный параметр влиял на механические свойства, но также удаление альфа-Gal.

[0068] Вышеупомянутые процессы могут использоваться при очищении, стерилизации
 40 и/или пассивации имплантатов, включающих в себя мягкие ткани. Вышеупомянутые процессы будут обычно включать перфузию имплантата очищающими средствами посредством циклического увеличения и/или уменьшения давления в способе контакта очищающего средства с имплантатом, с необязательным обработкой ультразвуком. В дополнение, во время процесса используется осмотический градиент, который генерирует
 45 поток в ткань и из нее. В предпочтительных вариантах осуществления, камеру для обработки, заключающую в себе имплантат, подлежащий обработке, заполняют чистящим средством (обычно предоставляемым в виде раствора, содержащего очищающее средство в некоторой концентрации). В то время как имплантат погружают

в раствор очищающего средства, давление в камере для обработки циклически увеличивается и уменьшается в способе контакта очищающего средства с имплантатом, с необязательным сопутствующим обработкой ультразвуком. За счет циклического увеличения и уменьшения давления, происходит перфузия очищающего средства в имплантат. Глубокая, проникающая очистка, стерилизация и/или пассивация имплантата или его частей достигается за счет скорости циклического изменения давления, факта циклического изменения и амплитуды циклического изменения давления, а кроме того за счет величины соотношения WCR и PVR, изменений данных соотношений и последовательности данных соотношений в пределах фаз или между ними, в пределах стадий или между ними и на протяжении всего процесса в целом. Соответственно, весь процесс может быть успешно проведен при давлении выше или ниже одной атмосферы. Предпочтительно, весь процесс проводят в камере, которая обеспечивает возможность обработки ультразвуком содержимого на протяжении всего процесса или на конкретных стадиях. В дополнение, предпочтительно, весь процесс проводят в программируемой системе под управлением компьютера или программируемой логической схемы, так что ручная обработка минимизируется, а воспроизводимость процесса становится максимальной. Когда обрабатываемой тканью является любая форма аллогенной или ксеногенной ткани, выбор соответствующих растворителей имеет дополнительное преимущество получения обработанной ткани с еще более низкой антигенностью, чем если бы подобная обработка не была включена, и в некоторых случаях может иметь дополнительные выгоды повышенной прочности, жесткости или других механических свойств, а также усиленного заживления, ремоделирования или других биологических или биохимических свойств.

[0069] Когда используют циклически изменяющееся давление, увеличенное давление может составлять вплоть до приблизительно 200 фунтов на квадратный дюйм (PSI) выше внешнего давления, в качестве альтернативы приблизительно на 150 PSI выше внешнего давления, в качестве альтернативы приблизительно на 100 PSI выше внешнего давления, и может составлять вплоть до приблизительно 75 PSI выше внешнего давления, в качестве альтернативы приблизительно на 50 PSI выше внешнего давления, в качестве альтернативы приблизительно на 25 PSI выше внешнего давления, в качестве альтернативы приблизительно на 15 PSI выше внешнего давления, в качестве альтернативы приблизительно на 5 PSI выше внешнего давления. В способе может предусматриваться более высокое давление, хотя необходимо избегать давления, которое приводило бы к выходу оборудования из строя или повреждению ткани вследствие подобного давления. Пониженное давление или разрежение может быть приблизительно как внешнее давление, в качестве альтернативы приблизительно на 4 PSI ниже внешнего давления, или может составлять приблизительно вплоть до 8 PSI ниже внешнего давления, в качестве альтернативы приблизительно на 12 PSI ниже внешнего давления, в качестве альтернативы приблизительно на 14 PSI ниже внешнего давления, в качестве альтернативы приблизительно на 14,7 PSI ниже внешнего давления. любые высокие давления и низкие давления, как указано выше, могут быть объединены с ограничением диапазона давлений, при условии, что минимальное выбранное равно или меньше, чем максимальное выбранное. Термин внешнее давление применяется либо к номинальному атмосферному давлению в месте, где способ осуществляется на практике, либо к любому подходящему справочному давлению, которое может использоваться в качестве ссылки для измерения давления внутри реакционной камеры для заданного примера процесса. Когда используют быстро циклически изменяющиеся увеличенные и пониженные давления, скорость циклического изменения давления может

составлять по меньшей мере приблизительно 1 секунду, в качестве альтернативы по меньшей мере приблизительно 2 секунды, в качестве альтернативы по меньшей мере приблизительно 5 секунд, в качестве альтернативы по меньшей мере приблизительно 10 секунд, в качестве альтернативы по меньшей мере приблизительно 20 секунд, в качестве альтернативы по меньшей мере приблизительно 30 секунд, в качестве альтернативы по меньшей мере приблизительно 50 секунд, в качестве альтернативы по меньшей мере приблизительно 60 секунд, в качестве альтернативы по меньшей мере приблизительно 120 секунд, в качестве альтернативы по меньшей мере приблизительно 180 секунд, в качестве альтернативы по меньшей мере приблизительно 240 секунд.

Когда используют быстро циклически изменяющееся давление, скорость циклического изменения давления может составлять самое большее приблизительно 5 минут, в качестве альтернативы самое большее приблизительно 4 минуты, в качестве альтернативы самое большее приблизительно 3 минуты, в качестве альтернативы самое большее приблизительно 2 минуты, в качестве альтернативы самое большее приблизительно 110 секунд, в качестве альтернативы самое большее приблизительно 100 секунд, в качестве альтернативы самое большее приблизительно 90 секунд, в качестве альтернативы самое большее приблизительно 60 секунд, в качестве альтернативы самое большее приблизительно 45 секунд, в качестве альтернативы самое большее приблизительно 30 секунд, в качестве альтернативы самое большее приблизительно 20 секунд, в качестве альтернативы самое большее приблизительно 10 секунд. Любые максимальные и минимальные скорости, как указано выше, могут быть объединены с ограничением диапазона скоростей, при условии, что минимальная выбранная равна или меньше, чем максимальная выбранная.

[0070] Способы обработки можно успешно проводить при давлении выше или ниже одной атмосферы. Адекватными являются давления извлечения между 25 дюймами ртутного столба (приблизительно 85 кПа или приблизительно 12,5 PSI) и давление пара растворов в камере. Давления засыпки между приблизительно 40 и 100 PSI (между приблизительно 276 кПа и 690 кПа или между приблизительно 80 и 200 дюймов ртутного столба) также являются адекватными. Использование быстро циклически изменяющихся давлений описано в патентах США №№6482584; 6613278 и 6652818; каждый из которых выдан настоящему правообладателю, и каждый из которых включен настоящим посредством ссылки.

[0071] В одном варианте осуществления, весь процесс проводят в камере для обработки, которая обеспечивает возможность обработки ультразвуком содержимого на протяжении всего процесса или конкретных его стадий. В дополнение, предпочтительно, весь процесс проводят в программируемой системе под управлением компьютера или программируемой логической схемы, так что ручная обработка минимизируется, а воспроизводимость процесса становится максимальной. После того, как имплантат помещают в камеру для обработки, камеру заполняют очищающим раствором до уровня, достаточного для погружения имплантата в раствор (хотя в камере может оставаться некоторое пространство спереди для облегчения быстрого циклического изменения давления).

[0072] Представленные способы включают новую последовательность очищающих средств для обработки ксеногенной мягкой ткани. В предпочтительных вариантах осуществления представленных способов, одно или более очищающих средств контактируют с имплантатом, содержащим мягкую ткань для нейтрализации, удаления или существенного уменьшения крови, жира, клеток, белков, антигенов, бактериального, вирусного, грибкового или другого материала. Некоторые очищающие средства (и

способы использования подобных очищающих средств) описаны в патентах США №№6482584; 6613278 и 6652818, которые все включены в данную заявку посредством ссылки. Очищающие средства включают, но без ограничения, моющие средства, дезинфекционные вещества (называемые иногда дезинфицирующие средства), обеззараживающие средства (называемые иногда дезактивирующие средства), антибиотики, вирулицидные соединения и тому подобное. Для усиления свойств тканей и/или для защиты тканей могут использоваться специализированные средства (такие как углеводы). Кроме того, для установления осмотических градиентов могут использоваться гипертонические или гипотонические растворы.

[0073] Очищающие средства могут быть предоставлены в виде растворов или других смесей. Предпочтительно, очищающее средство предоставлено в виде водного раствора (предпочтительно с использованием DI воды). Например, одно или более следующих очищающих средств могут контактировать с имплантатом, содержащим мягкую ткань: растворы, содержащие любой из окисляющего стерилизатора (например, перекиси водорода), одного или более моющих средств, солевого раствора, углевода, смешиваемого с водой спирта, такого как этанол или изопропанол, бикарбоната натрия и/или их комбинаций.

[0074] Подходящие спирты для использования в представленных способах включают метанол, этанол, пропанол (включая изопропанол), и бутанол (включая изобутанол и третбутиловый спирт). В настоящее время предпочтительным является изопропанол. Спирт может быть предоставлен в растворе или смеси, с предпочтительными концентрациями, колеблющимися от приблизительно 0,1% до приблизительно 100% процентов по массе (масс. %), в качестве альтернативы от приблизительно 5% до приблизительно 95%, в качестве альтернативы от приблизительно 20% до приблизительно 90%. Предпочтительными спиртами являются спирты, имеющие низкие молекулярные массы (например, в диапазоне от приблизительно 32 г/моль до приблизительно 360 г/моль, в качестве альтернативы спирты, имеющие молекулярные массы, равные или меньше, чем приблизительно 61 г/моль, в качестве альтернативы приблизительно 90 г/моль, в качестве альтернативы приблизительно 120 г/моль, в качестве альтернативы приблизительно 240 г/моль, в качестве альтернативы приблизительно 360 г/моль) и/или точки плавления ниже рабочих условий варианта осуществления, используемого в представленных способах. Предусматривается, что вместо спиртов могут использоваться другие защитные средства, например полиолы. Предпочтительными полиолами являются полиолы, имеющие относительно низкие молекулярные массы (например, в диапазоне от приблизительно 32 г/моль до приблизительно 360 г/моль).

[0075] Окисляющие стерилизаторы, которые могут использоваться в представленных способах, включают пероксиды, оксиды, гипохлориты, перкарбонные кислоты и озон. Предпочтительным пероксидом для использования в представленных способах является перекись водорода. Окисляющий стерилизатор может быть предоставлен в растворе или смеси, с предпочтительной концентрацией, колеблющейся от приблизительно 1% до приблизительно 15% процентов по массе (масс. %).

[0076] Углеводами (или в общем «сахарами») могут быть дисахариды или моносахариды или более сложные сахара. Например, сахара, которые могли бы использоваться в способе, включают, но без ограничения, глюкозу, или декстрозу, или церелозу, или альдозу, или кетозу, или полуацеталь, или пиранозу, или фуранозу, или эритрозу, или треозу, или рибозу, или арабинозу, или маннозу, или аллозу, или альтрозу, или ксилозу, или ликсозу, или гулозу, или идозу, или галактозу, или талозу. Также

предусматриваются дисахариды (наподобие сахарозы или фруктозы). Предпочтительной является глюкоза. Предусматриваются «D»-сахара (естественного происхождения), а также «L»-, предпочтительной является конфигурация «D».

[0077] Углевод может быть предоставлен в растворе или смеси, с предпочтительной концентрацией раствора, колеблющейся приблизительно между 40 и 50 процентами по массе (масс. %) с использованием в качестве растворителя D₁ воды, предпочтительно 45 масс. %. Предусматриваются альтернативные концентрации углеводов, включая более низкие концентрации, такие как 20% или 30%, и более высокие концентрации, такие как 55%, 57%, 60% или 70%. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления, предпочтительными являются перенасыщенные растворы глюкозы между приблизительно 40 и 50 масс. %. Перенасыщенные растворы получаются или являются результатом, когда изменяется некоторое условие насыщенного раствора, например, при повышении температуры, при уменьшении объема насыщенной жидкости (например, за счет испарения) или при увеличении давления.

[0078] Солевые растворы, используемые в способе, включают, но без ограничения, растворы органических и неорганических солей. Примеры неорганических солей хорошо известны и включают, но без ограничения, NaCl, NaF, NaBr, KCl, KF и KBr. Примеры органических солей включают, но без ограничения, натрия ацетат (CH₃COONa), калия цитрат (C₆H₅K₃O₇), аммония ацетат (NH⁴⁺ CH₃COO⁻), натрия лактат (NaC₃H₅O₃) или другие соли, являющиеся результатом продукта реакции органической кислоты и неорганического основания. Концентрации солей, предполагаемых для использования с представленной заявкой, колеблются от приблизительно 0,6% до 35%. В конкретных вариантах осуществления может использоваться 27% солевой раствор, в других вариантах осуществления может использоваться 5,9% солевой раствор, в других вариантах осуществления может использоваться 0,7% солевой раствор, в других вариантах осуществления может использоваться 0,9% солевой раствор, в других вариантах осуществления может использоваться 1% солевой раствор, в других вариантах осуществления может использоваться приблизительно 6% солевой раствор, в других вариантах осуществления может использоваться 10% солевой раствор, в других вариантах осуществления может использоваться 20% солевой раствор.

[0079] Бикарбонат натрия или гидрокарбонат натрия (обычно питьевая сода; химическая формула NaHCO₃) также используется в некоторых вариантах осуществления способов представленной заявки. Бикарбонат натрия представляет собой белое твердое вещество, которое является кристаллическим, но часто выглядит как тонкомолотый порошок и является растворимым в воде. Он также обычно упоминается как хлебная сода, двууглекислый натрий и двууглекислая сода. В разговорной речи его название сокращают до sodium bicarb, bicarb soda или просто bicarb.

[0080] Может быть получен раствор моющего вещества, содержащий неионогенное моющее вещество, анионное моющее вещество или и то и другое. Неионогенные моющие средства, предполагаемые для использования в способе заявки, включают, но без ограничения, этоксилят спирта, алкилфенол этоксилят, алкилполигликозид, полиоксиэтиленовый эфир, полиоксиэтиленовый сорбитан или любое из серийных моющих средств Triton®, Tween® или Brij® (например, Triton® X-100). Анионные моющие средства, предполагаемые для использования в способе заявки, включают, но без ограничения, алкилбензенсульфонат, алкилсульфонат, алкилфосфат или алкилсульфат, такой как натриевые соли додецилсульфата, миристилсульфата, цетилсульфата, стиролсульфата и олеилсульфата (например, натрия додецилсульфат

(SDS; также называемый SLS)). Предпочтительными являются Triton® X-100 и SDS (SLS). На протяжении ряда лет Triton® X-100 и SDS использовали для обработки костных и мягких тканей. (См. например, Патент США №4801299). Используемые концентрации составляют либо приблизительно 0,5, либо 1 процент по массе (масс. %), хотя могут использоваться другие концентрации, например, между приблизительно 0,1 и 10 масс. %. Для более эффективного очищения моющие средства также можно смешивать с пероксидом.

[0081] Натрия додецилсульфат (SDS или NaDS), также известный как натрия лаурилсульфат или натрия лауриловый сульфат (SLS), представляет собой органическое соединение с формулой $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{OSO}_3\text{Na}$. Это анионное поверхностно-активное вещество, используемое во многих чистящих и гигиенических изделиях. Солью является органосульфат, состоящий из хвоста из 12-атомов углерода, прикрепленного к сульфатной группе, придающей материалу амфифильные свойства, необходимые для моющего вещества. Triton X-100 ($\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{O}(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n$) представляет собой неионогенное поверхностно-активное вещество, которое имеет гидрофильную полиэтиленоксидную цепь (в среднем он имеет 9,5 этиленоксидных единиц) и ароматическую углеводородную липофильную или гидрофобную группу. Углеводородной группой является 4-(1,1,3,3-тетраметилбутил)-фенил группа. Она связана с плурониковым диапазоном моющих средств. Плуроники представляют собой триблоксополимеры этиленоксида и пропиленоксида. Часть, образованная из этиленоксида, является более гидрофильной, чем часть из пропиленоксида. Triton® X-100 также является широко используемым моющим средством.

[0082] Конкретными очищающими средствами предпочтительно являются перекись водорода, изопропанол, Calimulse® SLS, Triton® X-100 (TNBP), раствор хлорида натрия, глюкоза и NaHCO_3 .

[0083] Не связывая себя конкретной теорией, есть основания полагать, что в некоторых вариантах осуществления углеводная обработка, предпочтительно глюкозой, обеспечивает трансплантату молекулярную силу. Через неферментативное гликирование коллаген практически не реагирует. Данная стадия «подвергает старению» ткань, делая ее более биохимически зрелой, в то же время защищая ее также от химического разложения на последующих стадиях. Обработку пероксидом и моющим веществом, а также соевым раствором, используют для удаления ксеноантигена. За счет кавитации, химического разложения и осмотического градиента из ткани удаляются нежелательные антигены и клетки. Стерилизация, посредством воздействия окислителя и моющих средств, наряду с кавитацией, денатурирует любую чужеродную микрофлору, которую впоследствии вымывают из ткани. Спиртовая обработка улучшает механическую прочность (преимущественно увеличивая жесткость). Химические промыватели (например, вода) используются для набухания ткани для того, чтобы удалить и разбавить оставшиеся химические препараты, оставшиеся с предшествующих стадий.

Необязательно, выполняют стадию разложения оставшегося пероксида. На данной стадии может быть добавлена питьевая сода (NaHCO_3) для того, чтобы активно разложить супероксидную связь пероксида. Питьевая сода также увеличивает итоговый pH трансплантата с кислого до щелочного. В некоторых вариантах осуществления итоговый pH составляет приблизительно 8, в качестве альтернативы по меньшей мере приблизительно 7,0, в качестве альтернативы по меньшей мере выше 7, в качестве альтернативы по меньшей мере приблизительно 7,5, в качестве альтернативы по меньшей мере приблизительно 8,5, в качестве альтернативы по меньшей мере приблизительно

9. Не желая связывать себя теорией, щелочной pH трансплантата также может вносить вклад в усиленное заживление трансплантатов. Есть основания полагать, что это происходит вследствие того, что базовые окружающие условия увеличивают активность остеобластов.

5 [0084] Однако также предусматривается, что в некоторых вариантах осуществления исключается вышеуказанная стадия повышения pH (и/или разложения супероксидной связи пероксида). pH трансплантата без дополнительной стадии составляет между 5 и 7, предпочтительно приблизительно 6.

10 [0085] Представленные способы могут включать стадию или стадии, где имплантат обрабатывают средством, которое способно увеличивать площадь поверхности ткани для обработки (например, за счет набухания ткани). Например, ткань можно обрабатывать раствором с необходимым pH, и/или необходимый pH может поддерживаться на протяжении одного или более периодов обработки.

15 [0086] Кроме того, в соответствии с представленными технологиями, либо перед, либо во время либо/или после того, как очищающее средство наносят на мягкую ткань, мягкую ткань кинематически ограничивают за счет натяжения (как описано ниже). Кинематическое ограничение может применяться в виде единственного ограничения или в виде множества ограничений. Кинематическое ограничение может применяться на постоянной основе или на изменяемой основе, для постоянного состояния или

20 зависящим от времени методом.

[0087] Более конкретно, в камеру для обработки с нагнетаемым давлением загружают имплантат, содержащий мягкую ткань, необязательно мягкую ткань, которой придают натяжение. Кроме того, должно быть понятно, что имплантат может содержать только мягкую ткань или комбинацию мягкой ткани и костного и/или синтетического

25 материалов.

[0088] Очищающее средство вводят в камеру для обработки. Обычно будет вводиться достаточное количество очищающего средства таким образом, чтобы погрузить имплантат (другими словами, имплантат погружается внутрь очищающего средства). В присутствии очищающего средства и необязательно с обработкой ультразвуком,

30 очищающие средства вводят в матрицу имплантата с использованием серии «n» циклов повышенного и пониженного давления. Каналы матрицы имплантата (включая внутреннюю часть мягкой ткани) несколько раз заполняют и опорожняют от очищающего средства и компонентов, подлежащих удалению в результате колеблющегося давления. Число раз повторения цикла данной стадии может составлять

35 от одного до приблизительно 150 раз (где $n=1-150$), в качестве альтернативы от приблизительно 10 до приблизительно 50 раз, в качестве альтернативы от приблизительно 2 до приблизительно 30 раз).

[0089] Подходящие температуры, при которых очищающее средство входит в контакт, частично зависят от очищающего средства и его концентрации. В некоторых вариантах

40 осуществления температуру переноса устанавливают на 20°C и не выполняют активное нагревание текучей среды. Действие химического потока/обработки ультразвуком может «нагревать» средства до 39°C. Обычно температуры камеры для обработки находятся между приблизительно 27 и 35°C. В некоторых вариантах осуществления, более высокие температуры (40°C и выше) могут начинать разрушать химические

45 свойства ткани. Для сухожилия, 50°C или выше начнет разрушать структуру ткани.

[0090] Очищающее средство может контактировать с имплантатом в течение подходящего периода времени в различных фазах, например, от приблизительно 1 минуты до приблизительно 150 минут, в качестве альтернативы от приблизительно 4

минут до приблизительно 60 минут; в качестве альтернативы от приблизительно 60 минут до приблизительно 130 минут. Вышеупомянутыми периодами времени могут быть последовательные минуты, или они могут быть расчленены или отделены периодами времени, когда имплантат входит в контакт с другими очищающими средствами, ополаскивающими жидкостями или другими растворами. Хотя обработка давлением является предпочтительной, а циклическое изменение давления является особенно предпочтительным, также предполагается, что представленные способы могут применяться для обработки ткани при постоянном давлении, таком как внешнее давление, повышенное давление или пониженное давление или разрежение.

[0091] В качестве дополнительного аспекта представленной заявки, предоставлены способы и устройство для применения кинематического ограничения (включая натяжение, сжатие или иммобилизацию) имплантата, особенно имплантата, содержащего мягкую ткань, такую как сухожилие. Было обнаружено, что когда имплантаты, содержащие мягкие ткани, такие как сухожилия, трансплантаты кость-сухожилие-кость, и другие мягкие ткани, подвергают процессу обработки (например, очищению, пассивации и/или стерилизации, который включает контакт с одним или более очищающими средствами, повреждение имплантата (особенно повреждение мягкой ткани) может быть уменьшено за счет применения натяжения имплантата (особенно мягких тканей) во время по меньшей мере некоторой части (частей) процесса обработки. За счет применения кинематического ограничения, такого как натяжение, мягкой ткани, повреждение, вызываемое процессом обработки (или одной или более ее отдельными стадиями) может быть уменьшено, минимизировано или устранено. Кроме того, применение натяжения мягкой ткани может улучшать эффективность и/или согласованность процесса обработки.

[0092] Общепринятые способы обработки для имплантатов костей и мягких тканей включают способы, описанные, например, в патентах США №№5333626; 5512662; 5556428; 5769893; 5797871; 5976104; 6024735; 6293970, которые все включены в данную заявку посредством ссылки; а также другие патенты и публикации. В общепринятых способах, имплантат, содержащий мягкую ткань, подвергали воздействию в камере для обработки без натяжения имплантата или кинематического ограничения имплантата. В подобных общепринятых способах, позиционирование и ориентирование мягкой ткани в способе может изменяться с помощью очищающих средств, принадлежностей или способов, используемых в процессах. Данное изменяемое позиционирование или ориентирование может приводить к несоответствиям между различными типами имплантатов, так как различные типы имплантатов могут оказывать различные воздействия на очищающие средства (например, в результате наложения тканей или тканей, обернутых вокруг себя). Также, непоследовательное очищение и доступ очищающих средств к единственной ткани может приводить к тому, что одна область ткани может быть подвергнута более длительной обработке, потому что она находится снаружи, а другая область ткани засоряется, застревает или неправильно зажимается внутри и получает меньшее воздействие очищающими средствами. Еще одна проблема, которая может возникать в результате использования общепринятых способов стерилизации мягких тканей, состоит в том, что мягкая ткань может сморщиваться, приводя к нежелательному внешнему виду и структурным изменениям, которые позже могут вызывать излишнюю послеоперационную слабость. Еще одной проблемой при обработке мягких тканей является чрезмерное послеоперационное воспаление. Воспаление тканей может быть вызвано взаимодействием различных очищающих средств с кровью, жирами или другим материалом внутри мягкой ткани. Например,

реакция пероксида с эндогенными материалами может вызывать набухание ткани и приводить к повреждению ткани. Данные реакции обычно упоминаются как реакция вспенивания, которая наблюдается при местном применении пероксида на рану поверхности. Оставшиеся побочные продукты реакций пероксида в конце концов могут 5 приводить к послеоперационной воспалительной реакции на уровне, который является вредным для процесса заживления. Когда ткань не растянута (если она не фиксируется в процессе обработки), реакция вспенивания может вызывать больше вреда, поскольку более вероятно, что пена и побочные продукты захватываются внутри ткани.

[0093] Представленные способы могут уменьшать, минимизировать или устранять 10 одну или более изложенных выше проблем. За счет применения натяжения к имплантату, содержащему мягкую ткань, во время процесса обработки с использованием очищающих средств, необходимым образом может поддерживаться позиционирование мягкой ткани в камере, а очищающие средства едва ли применяются с достаточным усилием для изменения позиционирования. В результате того, что очищающие средства контактируют 15 с имплантатами (особенно мягкой тканью) более равномерно и предсказуемо, будет больше согласованности между различными имплантатами и внутри единственного имплантата. Мягкие ткани будут иметь меньше тенденций к сжиганию, и в результате будет меньше вероятность получения имплантатов, имеющих нежелательный внешний вид. За счет применения во время процесса обработки к мягкой ткани натяжения, может 20 уменьшаться воспаление и повреждение в результате внутренних реакций вспенивания, потому что имеется более большая возможность ухода натянутой ткани от вспенивающего действия, вместо того, чтобы оставаться внутри ткани, вызывая большее повреждение. Кроме того, натяжение, прикладываемое в процессе обработки, будет защищать трансплантат от послеоперационной вялости, которая может быть вызвана 25 сокращением и сжиганием трансплантата в процессе общепринятой обработки.

[0094] Необходимо предоставить устройство для применения кинематического ограничения, которое имеет немного частей, является легким в использовании и может противостоять химическим препаратам и условиям, с которыми оно будет сталкиваться. Нежелательно, чтобы устройство имело излишнее число ограничений или частей, 30 которые необходимо задействовать. Кроме того, устройство должно быть сделано из материала, который способен противостоять окружающим условиям использования и очищения. Например, необходимо, чтобы устройство было способно противостоять температурам в автоклаве, который имеет температуры в области приблизительно 120°C. (приблизительно 250°F). В автоклаве пар должен контактировать и стерилизовать 35 различные части устройства. Соответственно, если устройство имеет множество частей, винтов, труднодоступных углов или небольших деталей, будет менее надежно, что автоклав адекватно простерилизует все эти части устройства, так чтобы их можно было снова использовать.

[0095] Устройство для применения кинематического ограничения должно быть 40 выполнено с возможностью подвергать большинство или по существу все ткани воздействию очищающих средств, используемых в процессе обработки. В общем нежелательно, чтобы устройство закрывало значительное количество ткани или ограничивало протекание чистящих или ополаскивающих растворов во время процесса обработки. Устройство не только применимо во время процессов очищения, пассивации 45 и/или стерилизации имплантата, но также может быть применимо и выполнено с возможностью обеспечения кинематического ограничения имплантату на протяжении одной или более стадий получения, обработки, упаковывания, погрузки, хранения, предоперационной подготовки имплантата, внутриоперационной подготовки

имплантата и внутриоперационного манипулирования имплантатом.

[0096] Соответственно, устройство натяжения ткани должно быть выполнено с возможностью прикладывания количества натяжения в одном или более диапазонов ниже. Материалы, используемые для устройства натяжения ткани, должны быть
 5 прочными, биологически инертными (другими словами, они не взаимодействуют с биологическими тканями) и способными противостоять предполагаемым химическим веществам и температурам окружающих условий для их использования и очищения. Подходящие материалы для устройства натяжения ткани включают (но без ограничения)
 10 полимеры, керамику и не подверженные коррозии металлы. Предпочтительные металлы включают нержавеющую сталь, титан и сплавы, такие как сплавы на основе никеля, или материалы, полученные посредством покрытия стали никелем или хромом. В одном предпочтительном варианте осуществления, все части устройства натяжения
 15 изготовлены из подходящего недорогого, стерилизуемого материала, такого как нержавеющая сталь или другие обычные листовые металлы, или пластмассы, так что устройство натяжения может сопровождать трансплантат на протяжении одной или более стадий обработки, упаковывания, погрузки, хранения и предоперационной подготовки.

[0097] Когда к имплантату мягкой ткани коровьего ксеногенного сухожилия прикладывают натяжение, величина натяжения, прикладываемого к сухожилию,
 20 желательно составляет между приблизительно 60-75 фунтов усилия (между приблизительно 267 и приблизительно 334 Ньютонов).

[0098] Сухожилие представляет собой жесткую полосу волокнистой соединительной ткани, которая обычно соединяет мышцу с костью и способна противостоять
 25 натяжению. Сухожилия аналогичны связкам и фасции, так как все они состоят из коллагена за исключением того, что связки соединяют одну кость с другой костью, а фасции соединяют мышцы с другими мышцами. Сухожилия представляют собой упругоэластичные структуры и служат в качестве промежуточного звена для передачи
 30 усилия от мышцы к кости. При растягивании сухожилия имеют механическое поведение мягких тканей. Несколько исследований продемонстрировали, что сухожилия, также как кости, реагируют на изменения в механической нагрузке с процессами роста и ремоделирования. Не желая связывать себя теорией, есть основания полагать, что
 35 натяжение сухожилий в процессе обработки предусматривает обработку ткани в ее более «естественном состоянии» и предусматривает более эффективное очищение, а также сохранение ее механической структуры. Величину используемого натяжения
 40 устанавливают таким образом, чтобы минимизировать ослабление с течением времени (на устройстве натяжения). Предпочтительная величина ослабления составляет ниже приблизительно 100 Н, при этом более предпочтительным является ниже 90 Н, а предпочтительным ниже 50 Н. Нахождение в пределах диапазонов ослабления выше предусматривает более эффективную обработку мягких тканей.

[0099] Представленная заявка предпочтительно направлена на имплантат мягкой
 45 ткани, подлежащий использованию для трансплантации ACL, выполненный из коровьей ткани. Подобный имплантат в некоторых вариантах осуществления будет получен из коровьих сухожилий, предпочтительно сухожилий из нижних конечностей животного (разгибателей). В качестве альтернативы можно использовать сухожилия, связки или
 50 другие мягкие ткани из различных анатомических локализаций и от различных животных. Например, сухожилия головы, шеи, спины или хвоста из коровьего или другого ксеногенного источника. Ксеногенный имплантат мягкой ткани, полученный в результате процессов обработки заявки, является более прочным, чем нативная ткань,

не имеет микрофлоры, а также может иметь более быстрое инкорпорирование после имплантации по сравнению с нынешними возможностями ACL.

[00100] В некоторых вариантах осуществления, ксеногенные имплантаты мягких тканей представленной заявки имеют следующие признаки:

1. Превосходную прочность: определяемую, как более прочную, чем человеческие имплантаты, полученные из передней большеберцовой мышцы
2. Биосовместимость: определяемую как не имеющую заметной вредной иммунологической реакции или отторжения после имплантации вследствие чужеродных антигенов
3. Стерильность: определяемую как достаточное уменьшение микрофлоры для предотвращения неблагоприятной реакции со стороны реципиентов

[00101] Для того, чтобы обеспечить, чтобы способ устранял «жизнеспособную» микрофлору, может быть проведено 14-дневное деструктивное стерильное культивирование. Данное тестирование дает достоверительный уровень в отношении стерильности.

[00102] После обработки можно провести анализы расщепления трипсином для измерения «биосовместимости». Данное измерение обеспечивает, что после того, как трансплантат имплантирован, он не будет «немедленно» (в пределах 1 месяца) резорбироваться и/или разрушаться, приводя в результате к недостаточной прочности.

Данное значение было получено в результате изучения крыс, которое исследовало резорбцию имплантатов с различными значениями расщепления трипсином и коллагеназы. Было обнаружено, что значения, составляющие 30%, тесно коррелировали с недопустимой деградацией имплантата за счет механизмов *in vivo*. Было обнаружено, что значения, составляющие 3-5%, коррелировали с приемлемой деградацией имплантата за счет механизмов *in vivo*.

[00103] После обработки также может быть проведен химический анализ остатка перекиси водорода. Данное измерение обеспечит, что после того, как трансплантат имплантирован, он не будет иметь цитотоксический уровень перекиси водорода. Предшествующие исследования показали, что данное химическое вещество является токсичным для тканей со значениями >3 частей на миллион в случае отсутствия теста на элюирование ISO 10993-5 MEM. Однако, вследствие исторической сути данного теста, дающей ложноположительные результаты при применении для полученных из тканей трансплантатов, в некоторых случаях может считаться приемлемым результат, больше или равный приблизительно 100 частей на миллион.

[00104] Одной характеристикой ксеногенного имплантата является определение удаления чужеродных ксеноантигенов. Важно удалить, нейтрализовать или существенно уменьшить чужеродные эпитопы, такие как Gal α 1-3Gal $_1$ -4GlcNAc-R (часто упоминаемые как альфа-Gal) и другие вследствие того, что организм человека имеет антитела, которые специфически выделяют данные гликоконъюгаты. Трансплантаты, полученные из ксеногенных источников, которые содержат данный ксеноантиген, остро отторгаются организмом человека после имплантации. Вследствие этого измеряют удаление альфа-Gal. Предварительное исследование на бабуинах продемонстрировало, что имплантаты с удалением до 60% не отторгались. Положительный контроль, использованный во время данного исследования, который вызывал большую иммунную реакцию, имел удаление, составляющее 40%. Для измерения данного удаления берут среднее из 2 образцов от одного и того же обработанного имплантата. В одном случае, было обнаружено, что среднее удаление альфа-Gal больше или равно 55% коррелирует с приемлемой эффективностью трансплантата. Следует заметить, что % удаления

представляет относительное, не абсолютное, измерение альфа-Gal.

[00105] Не желая связывать себя теорией, необходимо заметить, что некоторый оставшийся уровень альфа-Gal фактически может быть полезным. Если объекты в достаточной степени редуцированы и/или денатурированы, есть основания полагать, что оставшиеся «фрагменты» альфа-Gal (или других чужеродных эпитопов) внутри ксенотрансплантата, который предполагается реинкорпорировать человеку-хозяину, могут фактически усиливать заживление. Некоторое доказательство усиленного заживления (подтвержденного гистологией) было видно в трансплантате коровьего сухожилия представленной заявки. Возможное объяснение данного повышенного/ускоренного заживления ксеногенного имплантата аналогично схеме действия вакцины (более конкретно субъединичных вакцин). Подобные вакцины действуют, подвергая реципиента воздействию частей инфекционной бактерии или вируса. Данными частями обычно являются неинфекционные антигены относительно инфекционного микроорганизма, которые вызывают иммунную реакцию, не вызывая неблагоприятные реакции заболевания. Есть основания полагать, что аналогичные реакции инициируются имплантатами коровьих сухожилий представленной заявки. Первой фазой каскада заживления после трансплантации ACL является фаза «воспаления» (Woo 2000 и Scheffler 1998). Есть основания полагать, что данная фаза ускоряется вследствие присутствия «поощряющего» антигена, или комбинации антигенов, отрицательные воздействия которых были сделаны более мягкими; однако данные антигены все-таки присутствуют, обеспечивая возможность реакции реципиента. Вследствие этого, есть основания полагать, что в некоторых предпочтительных вариантах осуществления данной заявки, ксеногенный имплантат сухожилия с частично или не полностью удаленным альфа-Gal на некотором пониженном уровне является биоактивным вместо того, чтобы быть просто биоинертным.

[00106] Для трансплантации ACL, предпочтительной конфигурацией трансплантата является образующий петлю 2 нитевой трансплантат. В данной конфигурации, ксеногенные имплантаты, независимо от размера образующего петлю диаметра (LD), будут иметь вероятность 98,6% наличия предела прочности больше, чем у средней нативной ACL (прочность нативной ACL = 2160 Н согласно Woo 1991). Данные, собранные авторами заявки, показали, что средняя прочность на отрыв $t=0$ типичных ксеногенных имплантатов сухожилий представленной заявки составляет 6061 Н. Данное значение статистически 1200 Н сильнее, чем наибольшее среднее значение, обнаруженное в литературе для 4 нитевого нативного подколенного сухожилия (4590 Н согласно Hamner 1999). См. Фиг. 2 и Пример 1.

[00107] Сухожилия (или связки) представляют собой волокнистые материалы трансплантатов, которые могут быть трудными для захвата. Таким образом, одна из проблем при использовании трансплантата сухожилия состоит в том, как закрепить сухожилие при имплантации. Одно используемое решение состоит в «прикусывании» сухожилия компонентом, который имеет некоторую разновидность зубцов или резьбу, обеспечивая улучшенный захват на плоской поверхности. В способе для этого используется интерферентный винт, который сдавливает связку трансплантата о стенку туннеля кости, в которую его имплантируют.

[00108] Винты могут быть сделаны из нерезорбируемых, биосовместимых материалов, таких как нержавеющая сталь, титан, кобальтохромовый-молибденовый сплав или другие сплавы. Могут использоваться другие нерезорбируемые, биосовместимые материалы, такие как полиамид, полиэтилен, поливиниловый спирт, полиакрилонитрил, политетрафторэтилен, сложный полиэфир и их комбинации. Данные винты также могут

иметь ушко на одном конце для прикрепления шва.

[00109] Также могут использоваться биорезорбируемые винты. Примеры биорезорбируемых материалов включают полилактид, поли(L-лактид) (PLLA), поли(D,L-лактид) (PLA), поли(гликолид) (PGA), поли(L-лактид-со-D,L-Лактид) (PLLA/PLA), сополимер L-лактида с гликолидом (PLA/PGA), сополимер гликолида с триметиленкарбонатом (PGA/PTMC), полидиоксанон (PDS), поликапролактон (PCL), полигидроксibuтират (PHBT), поли(фосфазены), сополимер D,L-лактида с капролактоном (PLA/PCL), сополимер гликолида с капролактоном (PGA/PCL), сложный полиэфир фосфазы, полиангидриды, поливиниловый спирт, гидрофильные полиуретаны и их комбинации. Резорбируемые винты также могут быть изготовлены из биокomпозитов. Биокomпозитный материал объединяет биологическую керамику с биорезорбируемым полимером и изменяет резорбцию и профиль заживления винтов. Биологическая керамика включает трикальцийфосфат и гидроксиапатит.

[00110] Еще один способ фиксации состоит в креплении трансплантата в костном туннеле с помощью кнопки и шва. Дополнительный способ состоит в использовании соединения поперечными штифтами, которое пропускает поперечный штифт через туннель перпендикулярным образом, а затем, в некоторых вариантах осуществления, трансплантат прикрепляют к поперечному штифту или оборачивают вокруг него. Еще один способ состоит в пропускании трансплантата через костный туннель и из заднего конца, а затем в прикреплении связки трансплантата к наружной стороне туннеля (с помощью винтов и/или шайб и/или, например, скоб).

Источник/Описание Ткани

[00111] Представленная заявка в некоторых вариантах осуществления содержит имплантат мягкой ткани, предпочтительно для трансплантации ACL, выполненный из ксеногенной ткани, который использовал бы преимущество современных стратегий одомашнивания, чтобы иметь возможность управления материалом источника ткани. Изделие содержит подробные описания крупного рогатого скота для обеспечения совместимого исходного материала. Ксенотрансплантаты могут быть свиными, овечьими, бескилевых птиц, лошадиными, каймановыми, коровьими или относиться к любому другому подходящему животному источнику. В некоторых вариантах осуществления ксенотрансплантаты предпочтительно являются коровьими.

[00112] Имплантаты могут быть получены из коровьих сухожилий, предпочтительно сухожилий из нижних конечностей животного (разгибателей), которые имеют плотную структуру на протяжении всей длины ткани. Предпочтительным является совместимый, надежный источник не содержащей BSE коровьей ткани. Предпочтительно, имплантаты трансплантатов получают от крупного рогатого скота из Австралии или Новой Зеландии. Согласно всемирной организации здравоохранения животных (OIE) в стране Австралии не содержится BSE (австралийский правительственный департамент сельского, рыбного и лесного хозяйства. DAFF06/4D). Таким образом, Австралийский источник является предпочтительным в сравнении с относительным риском BSE у крупного рогатого скота, родившегося и выращенного в Соединенных Штатах. В некоторых вариантах осуществления могли бы использоваться альтернативные области при условии, что OIE или другими соответствующими авторитетными источниками было подтверждено, что подобный материал не содержит BSE, и является структурно эквивалентным или подходящим. Сухожилия получают из коровьих конечностей. Для трансплантации ACL, в некоторых вариантах осуществления предпочтительными коровьими сухожилиями для использования у людей являются следующие:

Боковой Разгибатель пальцев (EDL)

Общий Разгибатель пальцев (EDC)

Медиальный разгибатель пальцев (EDM)

[00113] Каждое из данных сухожилий относится к передним разгибателям, которые имеют достаточную длину для использования в качестве трансплантатов для трансплантации ACL. Каждая из четырех ног у коровы содержит данные 3 сухожилия (при этом сухожилия из передней конечности отрезают несколько короче вследствие типичных технологий забоя). Ткань предпочтительно не содержит засечек, разрезов или надрывов. Предпочтительно проводят значительное удаление наружной соединительной ткани, прикрепленной к сухожилию. В некоторых вариантах осуществления в исходном материале необходима предпочтительная минимальная длина, равная 260 мм. Данная предпочтительная минимальная длина принимает в расчет длину, необходимую для натяжения в процессе обработки, а затем получения согнутого в петлю имплантата, равного по меньшей мере 80 мм. Могут быть предусмотрены другие сухожилия для использования при условии, что соблюдены требования к длине.

[00114] Предпочтительно используют сухожилия, которые имеют стойкую прочность и качество на протяжении всей своей длины, предпочтительно коровий медиальный разгибатель пальцев (EDM). Перед обработкой сухожилия можно хранить при пониженных температурах. Было обнаружено, что некоторые породы крупного рогатого скота имеют предпочтительно длинные и прочные сухожилия. Они включают предпочтительно (1) чистокровное животное породы Санта-гертруда, Браман, Абердин-ангусская (т.е. 100% только одно из них), (2) помесь с 25%-100% породы Санта-гертруда, Браман или Абердин-ангусская или их комбинацию; (3) помесь с 50%-100% породы Санта-гертруда, Браман или Абердин-ангусская или их комбинации; или (4) любые помеси, включая по меньшей мере одного предка, выбранного из породы Санта-гертруда, Браман или Абердин-ангусская. Для достижения наилучшей относительной прочности и зрелости сухожилий, масса животного (стандартная масса туши в парном состоянии, HSCW) предпочтительно больше или равна приблизительно 295 кг. Однако, HSCW крупного рогатого скота может быть меньше или равна приблизительно 266 кг, а в некоторых вариантах осуществления до приблизительно 200 кг.

[00115] Для того, чтобы обеспечить более высокий выход после обработки и для обеспечения меньшего непостоянства механической прочности от имплантата к имплантату, была разработана корреляция между параметрами исходного тканевого имплантата и предельным усилием растяжения (UTF). Было обнаружено, что в некоторых вариантах осуществления необходимым является прогнозируемое UTF, равное 2020 Н. В других вариантах осуществления, может быть необходимо любое значение, больше, чем 1800 Н, и может быть приемлемо любое значение свыше 1725 Н. Сообщалось, что клинически приемлемым может быть любое значение свыше 1000 Н, вследствие предполагаемой нагрузке нативной человеческой ACL во время напряженной деятельности, и любое значение, больше, чем 445 Н, может быть клинически приемлемым вследствие предполагаемой нагрузки при нормальной деятельности повседневной жизни. (Noyes 1976).

[00116] Конкретно со ссылкой на коров, желательными являются сухожилия от более взрослых коров (например, коров возраста более, чем приблизительно 18 месяцев), потому что они обычно более большие (более большой площади поперечного сечения (CSA) и более зрелые (более хорошая структурная целостность)). Однако было обнаружено, что число новых случаев BSE больше преобладает у «более взрослых» коров, поэтому это необходимо сбалансировать. В некоторых вариантах осуществления

приемлемыми могут быть животные по меньшей мере приблизительно двенадцать месяцев от роду, предпочтительно по меньшей мере приблизительно 18 месяцев от роду, в качестве альтернативы между приблизительно 18 и 24 месяцев, в качестве альтернативы между приблизительно 18 и 36 месяцев, в качестве альтернативы между приблизительно 24 и 30 месяцев, в качестве альтернативы между приблизительно 30 и 36 месяцев, в качестве альтернативы больше, чем 36 месяцев. В животноводстве известно, что возраст животных может быть определен в результате анализа развития зубов животного наряду с другими факторами. Например, может быть обнаружено, что корова возраста менее, чем 18 месяцев не имеет постоянных резцов, в то время, как может быть обнаружено, что корова возраста до 30 месяцев имеет не больше, чем 2 постоянных резца. Может быть обнаружено, что коровы до 36 месяцев имеют до 4 постоянных резцов. Таким образом, приемлемость коровы может быть измерена по наличию зубов. В некоторых вариантах осуществления, приемлемыми являются коровы, которые имеют между 2 и 4 постоянных резцов.

[00117] Что касается массы животного, спецификации определены на основании выхода за определенный промежуток времени. Предпочтительный выход сухожилий при сортировке составляет приблизительно 80%. Это означает, что 80% полученных исходных сухожилий имеют приемлемые размеры для получения сухожилия с единственной нитью с UTF, равной 2020 Н или больше. Массы коров меньше, чем приблизительно 295 кг могут значительно уменьшать выход. На Фиг. 1 показана формула одноцепной корреляции для сортировки. Среди множества проблем при работе с биологическими материалами существует вероятность несоответствия свойств материала вследствие факторов, таких как содержание текучей среды, и гетерогенность структуры волокна, например. Для учета данных несоответствий, некоторые варианты осуществления корреляции могут включать такие факторы, как Диаметр образования петли, Ширина и Толщина, которые представляют собой больше, чем простые макроскопические измерения морфологии ткани, как изображено на Фиг. 1. Главные (ширина) и вспомогательные (толщина) размеры измеряли в 6 точках по длине сухожилия. Также измеряли диаметр петли (LD) с использованием обмеривающего блока стандартного сухожилия. Определение формы сухожилия включает главную среднюю по 6 измерениям с главной оси и вспомогательную среднюю по 6 измерениям со вспомогательной оси. Измерения главной оси предпочтительно сделаны с капиллярами, а измерения вспомогательной оси предпочтительно сделаны с измерительным устройством падения (прикладываемая масса приблизительно 200-215 грамм).

ПРИМЕРЫ

Пример 1

[00118] В одном варианте осуществления для трансплантата используется источник коровьего сухожилия, полученного от австралийского крупного рогатого скота, который имеет плотную структуру на протяжении всей длины имплантата. Получают ксеногенные имплантаты, которые предпочтительно имеют размеры с диаметром образования петли (LD) между 8,0 и 11,5 мм и имеют среднюю длину, составляющую приблизительно 270 мм. В таблице ниже (Таблица 1) обобщены другие уместные пространственные характеристики для данных трансплантатов.

Таблица 1		
Ширина (мм)	Толщина (мм)	CSA (мм ²)
9,0±1,3*	3,2±0,58*	27,7±4,1*
* ± диапазоны представляют стандартное отклонение.		

Пример 2: Согнутый в петлю имплантат - Данные тянущего усилия

[00119] Как показано на Фиг. 2, коровий имплантат текущей заявки показывает приблизительно на 1200 Н более большое тянущее усилие, чем «Высокий» Средний аутооттрансплантат (р-значение $<0,01$). Расчетная вероятность того, что ксенотрансплантат прочнее чем Нативное ACL, составляет 98,6% (Ссылки для человека: Hamner (1999), Conner (2008): 4-Strand Hamstring; также Woo 1991 и Noyes 1976). Эти данные иллюстрируют улучшенную особенность имплантатов ACL коровьего сухожилия текущей заявки. На графике сравнивается прочность имплантата, измеренная в Ньютонах, с нативными коровьими сухожилиями (необработанными), обработанными аллогенными человеческими сухожилиями и значениями, обнаруженными в литературе. Данные 4-нитевого (4S) подколенного сухожилия являются средними значениями для подобных трансплантатов, обнаруженными у Hamner (большее значение) и Connor (меньшее значение). Данные нативной ACL были обнаружены у Woo (большее значение) и Noyes (меньшее значение). Для того, чтобы сравнить обработанные коровьи данные с данными более большого среднего 4S подколенного сухожилия, обнаруженными у Hamner, проделали статистический анализ. Статистически коровий имплантат на 1200 Н прочнее, чем среднее 4S подколенное сухожилие. Необходимо заметить, что коровий имплантат, необработанное коровье сухожилие (Коровье Асептическое) и ВС Человеческая АТ (передняя большеберцовая мышца) все были протестированы в виде 2 нитевых (образующих петлю) трансплантатов с использованием одинакового метода тестирования. 4S подколенные сухожилия, измеренные Hamner, тестировали в виде двойного пучка (2 образующих петлю сухожилий) с использованием метода тестирования, аналогичного тому, как тестировали другие сухожилия. Неясно, в каком специфическом методе тестирования состояло тестирование сухожилий ACL, измеренных Woo 1991 и Noyes 1976. Ясно, что метод Woo включал крепления кости и тестировал ACL, как обнаруженную естественным образом внутри колена.

[00120] Заданное вероятностное утверждение представляет собой анализ надежности, который проделали с использованием Методики Анализа Вейбулла. Подобную схему анализа обычно используют для того, чтобы определить надежность составных элементов автомобиля, составных элементов самолета и других медицинских устройств, таких как коронарные стенты, ангиопластические баллоны и нейрососудистые эмболические катушки. Вероятность, равная 98,6%, представляет собой статистическое значение, определенное из данных прочности, и имеет уровень статистической достоверности, равный 95%. В непрофессиональных терминах это дает относительную «вероятность», что любой данный коровий имплантат (обработанный и подготовленный с использованием текущих способов) будет механически превосходить нативную ACL (согласно Woo 1991). С использованием настоящих способов обработки и скрининга для создания данных имплантатов, данное значение подтверждает, что прочность составляет 2160 Н. Вероятность, что любой заданный имплантат имеет прочность ниже данного значения, составляет 1,4%. Необходимо заметить, что вероятность не следует путать с наступлением события. Данное значение не означает, что 1,4% всех полученных сухожилий будет слабее, чем нативный имплантат ACL. Данное значение аналогично в натуральной форме вероятности дождя, которую ежедневно прогнозирует синоптик. Если вероятность дождя составляет 1,4%, практически верно, что дождя не будет. Числом раз, когда дождь фактически был, когда вероятность дождя составляла 1,4%, было бы наступление события и представляет собой иную статистику, рассчитываемую по-другому. В сфере изготовления устройств наступление данного события связано с выработкой продукта.

Пример 3 - Исследование на животных

[00121] Для того, чтобы обеспечить предотвращение сверхострого отторжения при имплантации ксеногенных имплантатов ACL представленной заявки, провели 3-месячное исследование на животных у приматов (в частности бабуинов). Данный выбор модели животного произошел вследствие его иммунологического подобия человеку. Только обезьяны старого света (т.е. бабуины, макаки и обезьяны резус) и человекообразные обезьяны (т.е. шимпанзе и гориллы) имеют такие же анти-альфа-Gal-антитела, которыми обладает человек. В общем, данное исследование доказало превосходные свойства ксеногенных имплантатов представленной заявки. Наблюдалось не острое отторжение обработанных трансплантатов, большинство иммунологических химических показателей крови вернулось к норме за 3 месяца, а заживление имплантата было значительным и неожиданным (по величине и скорости).

[00122] В данном исследовании пяти бабуинам имплантировали полученные от коров имплантаты ACL, обработанные посредством способа данной заявки. Одному бабуину имплантировали необработанный полученный от коровы имплантат, который обработали только антибиотиками (положительный контроль, направленный на вызов гиперострой реакции). Подобную обработку провели на положительном контроле для того, чтобы предотвратить любую иммунологическую реакцию, которую можно было бы отнести к микроорганизмам, которые могли быть введены во время получения сухожилия. Для того, чтобы быть «чистым» для имплантации образец из всех имплантатов, включая необработанный положительный контроль, должен был пройти 14-дневный посев на стерильность. Трансплантация ACL, которую провели на бабуинах, включала использование методики «открытого колена». Необходимо заметить, что колено бабуина имеет ширину приблизительно 30-40 мм (при измерении плато большеберцовой кости от середины вбок). Для сравнения человеческое колено имеет ширину 80-100 мм.

[00123] Сухожилия обрабатывали посредством способа текущей заявки, а затем выбирали для имплантации с наилучшими возможными комбинациями следующих параметров (как описано выше). Итоговые имплантаты: самое высокое удаление α -Gal (>60%), расщепление трипсином менее, чем 10%, и самое высокое прогнозируемое UTF на основании данных сортировки (>1800 H).

[00124] Бабуинов содержали на предприятии, аккредитованном Международной ассоциацией по аттестации и аккредитации содержания лабораторных животных, и все процедуры были подтверждены Институциональным комитетом по содержанию и использованию животных (IACUC) на предприятиях. Шесть бабуинов содержали поодиночке в алюминиевых клетках на протяжении продолжительности исследования. Перед началом исследования проводили полное физическое обследование каждого бабуина. У самок всех данных бабуинов, нормальных во всех прочих отношениях, было единственное значительное выявление несущественного стоматологического заболевания. На протяжении всего исследования при физическом обследовании и в различные временные точки получали массу тела.

[00125] На 3-й месяц всех животных умертвили. Главным результатом исследования было патогистологическая оценка каждого имплантата по сравнению с ACL контралатеральной конечности (отрицательным контролем) и положительным контролем. На протяжении всего исследования также оценивали иммунологическую серологию крови на 2, 4, 8, и 12 неделях для того, чтобы иметь понимание того, как реципиент может системно влиять на имплантат во время периода исследования.

[00126] Системную иммунную реакцию каждого животного оценивали, используя 4

иммунологических анализа (Таблица 2). Каждый из данных анализов проводили с использованием образцов крови/сыворотки, полученных для каждого бабуина перед операцией, на 2 неделе после операции, на 4 неделе, на 8 неделе и на 12 неделе. В каждом из данных анализов, повышение или повышенные уровни указывают на иммунную реакцию на имплантат; идеальным является возврат к базовому уровню как можно быстрее.

[00127] Таблица 2: Различные иммунологические анализы, используемые в данном исследовании для оценки общей системной иммунной реакции бабуинов на имплантат коровьей ACL. Во всех анализах, более низкие результаты указывают на менее тяжелую реакцию.

Таблица 2	
Анализ	Цель
ELISA анти- α -Gal сыворотки	Оценка изменений выработки анти- α -Gal на протяжении хода исследования
Общий IgG & IgM	Оценка общей выработки иммуноглобулина на протяжении хода исследования
Зависимая от антителоопосредованного комплемента цитотоксичность	Определение тяжести реакции антител на коровьи клетки посредством измерения гибели клеток
Реакция смешанных лимфоцитов (MLR)	Оценка клеточноопосредованной способности узнавать чужеродные антигены в качестве реакции на трансплантацию

ELISA анти- α -Gal сыворотки

[00128] Анти- α -Gal представляет собой иммуноглобулин, который получают в ответ на воздействие на эпитоп α -Gal, есть основание полагать, что он является главной причиной острого отторжения Ксеногенных имплантатов. Уровни сыворотки IgG анти- α -Gal оценивали с использованием стандартной методики ELISA. В анализе BSA- α -Gal использовали в качестве твердой фазы для иммобилизации IgG анти- α -Gal. Для выявления первичного антитела к анти- α -Gal использовали пероксидазу хрена (HRP), конъюгированную с кроличьими вторичными антителами против IgG человека. Для разрушения HRP и создания цвета использовали хромогенный субстрат. После инкубирования с хромогеном добавляли стоп раствор и определяли значения поглощающей способности при 492 нм. Из данных результатов, рассчитывали титр анти- α -Gal. Уровень титра анти- α -Gal определяли как обратную величину разбавления сыворотки, которая давала 50% максимальной OD (максимального связывания). Результаты рассчитывали в виде кратного прироста уровня антител к анти-Gal в каждой временной точке над предоперационными уровнями.

Уровни Антител к Общему IgG и IgM

[00129] Уровни сыворотки общего IgG и IgM определяли с использованием методов ELISA для обозначения степени иммунной реакции на все коровьи антигены, включая антигенные реакции на анти- α -Gal и не-Gal. Вкратце, в данных анализах для иммобилизации твердой фазы (лунки на микротитровальном планшете) использовали козы антитела против IgG или IgM обезьяны, а для выявления использовали пероксидазу хрена (HRP), конъюгированную с козьими антителами против IgG обезьяны. Антитела как для улавливания, так и для выявления перекрестно абсорбировали на агарозных колонках с обезьяньим IgM (или IgG) и IgA, обеспечивая за счет этого специфичность к IgG (или IgM). После воздействия хромогенного субстрата и последующего стоп раствора, определяли значения поглощающей способности при 450 нм. Концентрация антител пропорциональна поглощающей способности и рассчитывается из стандартной кривой. Результаты регистрировали, как исходные значения (мг/мл).

Зависимая от антителоопосредованного комплемента цитотоксичность

[00130] Данный анализ использовали, чтобы показать, в какой степени полученные

антитела убивали коровьи клетки. Вкратце, коровьи моноклеарные клетки периферической крови (РМВС) выделяли и доводили до известной концентрации. Серийно разбавленные образцы сыворотки бабуина подвергали воздействию коровьих РВМС и инкубировали, с последующим добавлением кроличьего комплемента. После инкубирования, клетки окрашивали флюоресцеин диацетатом и пропидиум иодидом. Живые клетки (окрашенные зеленым) и мертвые клетки (окрашенные красным) подсчитывали с использованием проточной цитометрии. Из этих данных определяли SLU50, определяемое как разбавление сыворотки, которое убивает 50% клеток-мишеней (коровьих РМВС). Данные результаты представлены в виде кратного прироста SLU50 над уровнями перед имплантацией. Более высокие уровни цитотоксичности указывают на более интенсивную реакцию на коровьи антигены (т.е. более активную реакцию на комплемент).

Реакция смешанных лимфоцитов (MLR)

[00131] Данный анализ использовали, чтобы показать, была ли клеточная реакция на коровий имплантат независимой от выработки антител. Из свежей цельной крови выделяли РМВС бабуина и коровы. Коровьи клетки (используемые для определения ксеногенной реакции) и часть бабуиновых клеток (используемых для аллогенных и аутогенных реакций) обрабатывали митомицином С, чтобы сделать их неспособными к размножению. Иммунореактивные клетки (РМВС бабуина) инкубировали с клетками-стимуляторами (обработанными Митомицином С аутогенными, аллогенными или ксеногенными клетками) или с положительным контролем (фитогемагглютинином-М или РНА-М) в течение 5 дней. Клеточную пролиферацию, обусловленную воздействием клеток-стимуляторов, количественно определяли с использованием набора ELISA. Индекс стимуляции для каждого типа клеток бабуина и каждого типа клеток-стимуляторов рассчитывали посредством нормирования стимулированной пролиферации по нормальной, нестимулированной пролиферации РВМС бабуина. Более большой индекс стимуляции указывал на увеличенную пролиферацию РВМС бабуина и вследствие этого на более большую несовместимость источников иммунореактивных клеток и клеток-стимуляторов.

РЕЗУЛЬТАТЫ

ELISA Сыворотки Анти- α -Gal

[00132] ELISA анти- α -Gal использовали для измерения системных уровней (титр) выработки анти- α -Gal по сравнению с базовыми уровнями. Результаты данного анализа регистрировали в виде кратного прироста уровня титра над уровнями перед имплантацией. Два животных имели не выявляемые уровни анти- α -Gal сыворотки в базовых образцах сыворотки; среднее базовых значений всех других животных использовали для анализа кратного прироста для данных 2 животных в течение продолжительности исследования. Неизвестно, имели ли данные животные фактически экстремально низкий уровень анти- α -Gal сыворотки из циркулирующей крови или имелась ли проблема с данными образцами сыворотки из данной временной точки.

[00133] В ходе исследования, все животные испытывали пик выработки анти- α -Gal через 2 недели после имплантации. После временной точки 2 недели, уровни анти- α -Gal сыворотки падали в каждой временной точке для всех обработанных животных в течение оставшейся части исследования. Ожидалось, что животное, которое испытывало послеоперационное инфицирование (DC12) будет иметь повышенные уровни иммуноглобулинов; однако интересно, что специфический к анти- α -Gal IgG также выглядел бы повышенным в ходе исследования по сравнению с другими животными. Неизвестно насколько большое увеличение уровня титра было вследствие

инфицирования, которое вероятно повышало набор клеток и антител с данным результатом, и насколько сильно это было связано конкретно с самим сухожилием. Однако, на основании тренда на протяжении последней половины исследования похоже, что данное животное вернулось бы к базовым уровням в отдаленных временных точках.

5 [00134] Единственное животное, которое продемонстрировало плато в уровне анти- α -Gal сыворотки в любой точке в исследовании, был положительный контроль между 4 и 8 неделями. Предполагалось, что данное животное должно было бы иметь
повышенные уровни анти- α -Gal, поскольку имплантат содержал больше оставшейся α -Gal по сравнению со всеми другими имплантатами, хотя уровни анти- α -Gal сыворотки
10 были сопоставимы с другими животными в каждой временной точке. В заключение исследования, было похоже, что уменьшение кратного прироста для данного животного замедляется по сравнению со всеми другими неосложненными животными, что продемонстрировало кратное повышение титра менее, чем в 10 раз в данной точке. Возможно, что поскольку данный имплантат имел некоторое уменьшение α -Gal, данные
15 ожидаемые различия результатов анти- α -Gal сыворотки между положительным контролем и обработанными имплантатами замедлились и что отдаленные временные точки могли бы начать показывать более продолжительные различия, так как обработанные животные в сравнение продолжали бы демонстрировать более продолжительное падение анти- α -Gal.

20 Антитела к Общему IQG и IqM

[00135] За исключением животного положительного контроля, все животные испытывали пиковые уровни IgG на 2 неделе после операции, совпадающие с пиком в анти- α -Gal. Все неосложненные обработанные животные имели пиковый IgG только за пределами нормального диапазона для данного антитела (в пределах 6 мг/мл за
25 верхней границей), показывая, что реакция антител не была тяжелой. Однако, животное положительного контроля, показало пик в конечной точке исследования и на более высоком уровне, чем все другие неосложненные животные, указывая на потенциально продолжающуюся и увеличивающуюся реакцию на имплантат. Все животные, получившие обработанные имплантаты, вернулись к нормальным или почти
30 нормальным уровням в конечной точке исследования за исключением животного с первоначальным послеоперационным инфицированием, уровни IgG которого оставались повышенными свыше 12 недель исследования несмотря на рассасывание инфекции.

[00136] В отличие от уровней общего IgG, уровни IgM оставались относительно плоскими в течение всего 12-недельного периода исследования и были в пределах
35 нормальных диапазонов для всех животных. Хотя уровни оставались в пределах нормального диапазона, пиковые уровни IgM встречались в пределах временных точек 2-4 недели в течение исследования для всех обработанных животных, в то время, как животное положительного контроля не испытывало пиковый уровень IgM до конечной точки 12 недели.

40 [00137] Поскольку IgM является первым респондером на чужеродные антигены в организме, ожидалось, что данные уровни могут подниматься выше средних уровней в ранние временные точки в исследовании. Однако, совпадающий пик уровней IgG в данных временных точках с относительно плоскими уровнями IgM означает возможное переключение изотипа антител, с переключением в процессе исследования изотипа IgM на IgG. IgG обычно вовлечен во вторичную иммунную реакцию и играет важную роль в активации комплементного каскада и удаления антигена. Переключение изотипа с
45 IgM на IgG подтверждает, что после того, как имплантаты были распознаны, как чужеродные, увеличение IgG, обусловленное переключением, было бы полезным для

более быстрого удаления чужеродного материала.

Зависимая от антителоопосредованного комплемента цитотоксичность

[00138] Все животные демонстрировали пик в SLU503 (SLU50 = единица лизиса 50 сыворотки = разбавление сыворотки, которое убивает 50% клеток-мишеней (коровьих мононуклеарных клеток периферической крови)) на 2 неделе после имплантации, показывая, что большая часть гибели клеток происходила в результате образования антител в данной временной точке. Это не является неожиданным, так как уровни антител как для IgG, так и для IgM также достигали пика приблизительно в данной временной точке. Все животные возвращались к базовым или почти базовым уровням на 8 неделе после имплантации и сохраняли данный уровень в течение оставшейся части исследования. Однако, интересно, что SLU50 для животного положительного контроля оставалось относительно плоским на протяжении всего времени хода исследования по сравнению со всеми обработанными животными. Возможно, что поскольку уровень IgG для данного животного начинал достигать пика во временной точке 12 недели, эти более отдаленные временные точки могут начинать показывать большую реакцию в анализе.

Реакция смешанных лимфоцитов

[00139] Анализ MLR использовали в качестве измерения клеточной реакции на имплантат сухожилия в ходе исследования. Данный анализ измеряет увеличенную пролиферацию клеток лимфоцитов бабуина, обусловленную воздействием клеток-стимуляторов (антигенных клеток, таких как аллотрансплантат или ксенотрансплантат); увеличенная пролиферация лимфоцитов бабуина означает более большую несовместимость с клетками-стимуляторами. Проплиферация лимфоцитов бабуина регистрируется, как индекс стимуляции, определяемый как стимулированная пролиферация, нормализованная по нестимулированной пролиферации; индекс стимуляции, равный 1, означает отсутствие увеличения стимуляции, обусловленной клетками-стимуляторами. Увеличенный индекс стимуляции означает увеличенную клеточную реакцию и более большую несовместимость. Фитогемагглютинин (РНА) использовали в качестве положительного контроля для анализа, так как он представляет собой известный стимулятор лимфоцитов.

[00140] Все обработанные животные демонстрировали пиковые ксеногенные индексы стимуляции на 4 неделе после имплантации за исключением одного животного, индекс стимуляции которого оставался относительно плоским на протяжении всего исследования. Для сравнения, животное положительного контроля не демонстрировало пиковую реакцию до временной точки 8 недели. На 12 неделе, ксеногенные индексы стимуляции 50% животных возвращаются к базовым уровням в то время, как оставшиеся 50% показали небольшое увеличение на 12 неделе, хотя не такое высокое, как пиковые значения на 4 неделе.

[00141] Все животные демонстрировали ксеногенные индексы стимуляции ниже среднего индекса стимуляции положительного контроля РНА через 4 недели. На временной точке 8 недели, животного положительного контроля и 1 обработанное животное демонстрировали ксеногенные индексы стимуляции выше, чем у контроля РНА. На 12 неделе, 2 обработанных животных имели индексы стимуляции на уровне или выше контроля РНА в то время, как животное положительного контроля возвращалось почти к базовому уровню. Это может означать, что два обработанных животных (имеющих индексы стимуляции на или выше контроля РНА) имели увеличение клеточной активности в данные временные точки в то время, как клеточная активность всех других животных, включая положительный контроль убывала.

[00142] Для сравнения с реакцией на ксенотрансплантат, в анализе также оценивали аллогенную стимуляцию. В общем, аллогенные индексы стимуляции были выше или сопоставимы с ксеногенными индексами стимуляции в ходе исследования, что может быть приписано главным комплексам гистосовместимости (МНС) в объединенных аллогенных клетках бабуина. Это может показывать, что клеточная реакция на имплантаты может быть не специфической к ксенотрансплантату, но скорее реакция на любой чужеродный материал, рассматриваемый клетками респондерами, как иммуногенный. Поскольку результаты анализа MLR основаны на клеточной реакции, возможно, что пик индекса стимуляции MLR между 4-8 неделями соответствует целлюлярному инфлюксу, связанному с воспалительной и пролиферативной фазами каскада заживления.

На Фиг. 3-6 показаны гистологические результаты.

[00143] Фиг. 3 показывает сравнение гистологических результатов середины связки из исследования на животных. Каждая картина на данном слайде представляет собой окрашенный Н&Е (гематоксилином и эозином) гистологический срез. Все срезы берут в поперечном (радиальном, если смотреть вниз на поперечное сечение имплантата) направлении. Крайняя левая (Фиг. 3А) и крайняя правая (Фиг. 3С) картины относятся к одному и тому же животному. Крайняя правая относится к нативной ACL из середины левых ног животных. Крайняя левая относится к середине правых ног животных, ACL которых заменили коровьим имплантатом.

[00144] Средняя картина (Фиг. 3В) относится к другому животному, которое получило коровий имплантат, который не был обработан (положительный контроль). Данный положительный контроль был имплантирован для того, чтобы получить представление о том, на что похоже сверхострое отторжение. Средняя картина (положительный контроль) демонстрирует отторжение трансплантата. Клетками, которые могут быть визуализированы, являются гигантские клетки, эозинофилы, и лимфоидные клетки. Данные клетки могут рассматриваться, как «атакующие/разрушающие» ткань имплантата.

[00145] Однако, как можно видеть на крайней левой и крайней правой картинах, обработанный коровий имплантат сухожилия текущей заявки обладает сильным гистологическим подобием нативной ACL того же животного. Это иллюстрирует неожиданно эффективное заживление.

[00146] Фиг. 4 показывает еще одно гистологическое сравнение середины связки. Снова, крайняя левая (Фиг. 4А) и крайняя правая (Фиг. 4С) картины относятся к одному и тому же животному. Данные картины также представляют собой окрашенный Н&Е (гематоксилином и эозином) гистологии. Данные срезы были взяты в продольном направлении (вдоль длинной оси имплантата/связки, при этом можно видеть отдельные фибриллы (маленькие пучки коллагена)).

[00147] Средний слайд (Фиг. 4С) представляет собой продольный разрез аутоотрансплантата подколенного сухожилия человека, который был получен из литературы. Как можно видеть имеется большое подобие между каждым из трех срезов, показанных на данном слайде. Это также иллюстрирует неожиданно эффективное заживление, а также подобие ксенотрансплантатов представленной заявки и традиционного аутоотрансплантата.

[00148] Фиг. 5 показывает радиальные срезы, взятые внутри бедренного туннеля, который был создан для удерживания трансплантата на своем месте внутри бедренной кости. Все картины на данном слайде представляют собой срезы, окрашенные трихромом по Массону. Крайние правые слайды (Фиг. 5С и Фиг. 5F) были взяты из

литературы и изображают некоторые необходимые клетки/структуры, которые указывают на хорошее встраивание/переход имплантата в окружающую кость. Как можно видеть, имелось подтверждение хондроцитов (Фиг. 5А и Фиг. 5В) и аналогичных шарпеевым волокон (Фиг. 5D и Фиг. 5Е) в бедренном туннеле животных, которые

получали обработанные коровьи имплантаты. Она показывает некоторые необходимые клетки/структуры, которые указывают на хорошее встраивание/переход имплантата в окружающую кость.

[00149] Фиг. 6 показывает радиальные срезы, взятые внутри большеберцового туннеля, который был создан для удерживания трансплантата на своем месте внутри бедренной кости. Все картины на данном слайде представляют собой срезы, окрашенные трихромом по Массону. Крайние правые слайды (Фиг. 6С и Фиг. 6F) были взяты из литературы и изображают некоторые необходимые клетки/структуры, которые указывают на хорошее встраивание/переход имплантата в окружающую кость. Как можно видеть, имелось подтверждение хондроцитов (Фиг. 6А и Фиг. 6В) и аналогичных шарпеевым волокон (Фиг. 6D и Фиг. 6Е) в большеберцовом туннеле животных, которые

получали обработанные коровьи имплантаты. Она показывает некоторые необходимые клетки/структуры, которые указывают на хорошее встраивание/переход имплантата в окружающую кость.

ВЫВОДЫ

[00150] Похоже, что титры анти- α -Gal сыворотки коррелируют с уровнем удаления α -Gal, достигаемого из имплантатов сухожилий, несмотря на маленький размер образцов исследования. В то время, как оставшаяся часть иммунологических анализов не имела сильной корреляции с гистологическими результатами (за исключением анти- α -Gal сыворотки, обсуждавшейся выше) они обеспечили некоторый уровень мониторинга животных на протяжении периода хода исследования. Также данные результаты означают, что возврат к базовым или почти базовым уровням для данных маркеров на 12 неделе после операции является положительным результатом, так как почти все обработанные животные находились на базовых или почти базовых уровнях почти на протяжении всех иммунологических тестов. Кроме того, данные результаты показывают, что пиковые уровни, испытанные в данных анализах, не являются вредными для имплантата в течение продолжительности данного исследования и устанавливали период действия для иммунологических реакций на ксеногенный имплантат ACL.

[00151] В общем, гистологические результаты из локализаций в середине связки и большеберцовом туннеле не выявили воспаления в виде случайной умеренной воспалительной реакции. Локализации в бедренном туннеле выявили большее доказательство воспалительной реакции, хотя при использовании интерферентного винта для фиксации в бедренном туннеле могли бы являться причиной компрессионного повреждения и может объяснить некоторую часть увеличенного воспаления в данных областях. В противоположность этому, животное положительного контроля демонстрировало классические признаки острого отторжения как для туннельных локализаций, так и в несколько меньшей степени в середине связки трансплантата.

[00152] Неожиданным результатом исследования был уровень ремоделирования/заживления, который становился очевидным в конечной точке на 12 неделе исследования. Хотя ожидалась некоторая степень ремоделирования, образование волокнистого хряща, встраивание, лигаментизация трансплантата/туннеля и образование шарпеевских волокон было в большой степени очевидно в большеберцовых туннелях всех животных с обработанными имплантатами. Многие животные показали превосходное встраивание при или около 360° вокруг интерфейса туннеля/имплантата.

Середина связки всех обработанных имплантатов представила доказательство лигаментизации и неоваскуляризации с небольшой воспалительной реакцией или ее отсутствием. Результаты в бедренных туннелях были менее впечатляющими в терминах ремоделирования, но гистологические выводы были все-таки многообещающими с доказательством образования волокнистого хряща и встраивания трансплантата/ туннеля, хотя в меньшей степени, чем в большеберцовых туннелях. Фиксация интерферентного винта в бедренном туннеле могла играть некоторую роль в несколько замедленном ремоделировании и поддерживает использование существующих систем подвешенной фиксации в бедренном туннеле. Для сравнения, животное положительного контроля представило отсутствие или небольшое доказательство ремоделирования и вместо этого разрушается в результате реакции острого отторжения.

[00153] В целом, результаты данного исследования были сильно положительными индикаторами, что коровье сухожилие, обработанное с использованием способов представленной заявки, оказываются значительно менее иммуногенными для предотвращения острого отторжения имплантата. Уровень заживления имплантата был более хорошим, чем предполагалось. Возможно, что либо небольшое увеличение усвояемости ткани, обусловленное способами представленной заявки, либо низкий уровень остаточных ксеноантигенов, оставшихся в сухожилиях, индуцировал более быструю реакцию на имплантат и приводил к более быстрому заживлению.

[00154] Все патенты, методики испытаний и другие документы, процитированные в данной заявке, включая приоритетные документы, полностью включены посредством ссылки в той степени, чтобы подобное раскрытие не противоречило данной заявке, и для всех юрисдикций, в которых допускается подобное включение.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

[00155] Conner et al. Tensioning of Anterior Cruciate Ligament Hamstring Grafts: Comparing Equal Tension Versus Equal Stress. Arthroscopy. 2008 Dec;24(12): 1323–1329.

[00156] Hamner et al. Hamstring Tendon Grafts for Reconstruction of the Anterior Cruciate Ligament: Biomechanical Evaluation of the Use of Multiple Strands and Tensioning Techniques. The Journal of Bone & Joint Surgery. 1999; 81:549-57.

[00157] Marumo et al. The "ligamentization" process in human anterior cruciate ligament reconstruction with autogenous patellar and hamstring tendons: a biochemical study. Am J Sports Med. 2005 Aug;33(8):1166-73. (Epub 2005 Jul 6).

[00158] Noyes et al. Biomechanical analysis of human ligament grafts used in knee-ligament repairs and reconstructions. J Bone Joint Surg Am. 1984;66:344-352.

[00159] Noyes et al. The strength of the anterior cruciate ligament in humans and Rhesus monkeys. J Bone Joint Surg Am. 1976;58:1074-1082.

[00160] Scheffler et al. Graft remodeling and ligamentization after cruciate ligament reconstruction. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc. 2008 Sep;16(9):834-42. (Epub 2008 May 31).

[00161] Scranton et al. Mechanisms of anterior cruciate ligament neovascularization and ligamentization. Arthroscopy. 1998 Oct;14(7):702-16.

[00162] Woo et al. Healing and repair of ligament injuries in the knee. J Am Acad Orthop Surg. 2000 Nov-Dec;8(6): 364-72.

[00163] Woo et al. Tensile properties of the human femur-anterior cruciate ligament-tibia complex: The effects of specimen age and orientation. Am J Sports Med June 1991; 19(3): 217-225.

(57) Формула изобретения

1. Способ обработки коровьего ксеногенного имплантата сухожилия, включающий следующие этапы:

- a. извлечение ксеноантигена из сухожилия,
- b. усиление прочности сухожилия, включающее обработку сахарным раствором глюкозы,
- c. стерилизацию сухожилия, и
- d. химическое ополаскивание сухожилия;

где один или более указанных этапов состоят из введения в контакт указанного коровьего ксеногенного сухожилия с очищающими средствами, в то время как к

сухожилию прикладывают натяжение, и при этом величина указанного натяжения составляет между 267 и 334 Ньютонов, и, дополнительно, где имплантат при обработке погружают внутрь указанных очищающих средств в камере для обработки.

2. Способ по п.1, в котором этапы осуществляют в порядке от a-d.

5 3. Способ по п.1, в котором указанный коровий ксеногенный имплантат сухожилия взят у коровы Санта-гертруда.

4. Способ по п.1, в котором указанный коровий ксеногенный имплантат сухожилия содержит сухожилие переднего разгибателя.

10 5. Способ по п.4, в котором указанный коровий ксеногенный имплантат сухожилия содержит медиальный разгибатель пальцев.

6. Способ по п.1, в котором имплантат демонстрирует регулируемое уменьшение по меньшей мере одного ксеноантигена, составляющее 60%, расщепление трипсином меньше чем 10% и прогнозируемое предельное усилие растяжения (UTF) на основании данных сортировки больше или равно 1800 Н.

15 7. Способ по п.6, в котором ксеноантиген представляет собой α -Gal.

8. Способ по п.1, дополнительно включающий стимулирование щелочных свойств сухожилия.

9. Способ по п.8, в котором имплантат демонстрирует pH 8 перед имплантацией.

20

25

30

35

40

45

Фиг.1

Форма среза: соотношение большой/небольшой=MMR

$$MMR \leq 3.5 \text{ (Эллиптическая CSA)} \qquad \qquad \qquad MMR > 3.5 \text{ (Прямоугольная CSA)}$$

$$\text{Взвешенная CSA} = CSA (AMIR^{\text{Масса формы}})$$

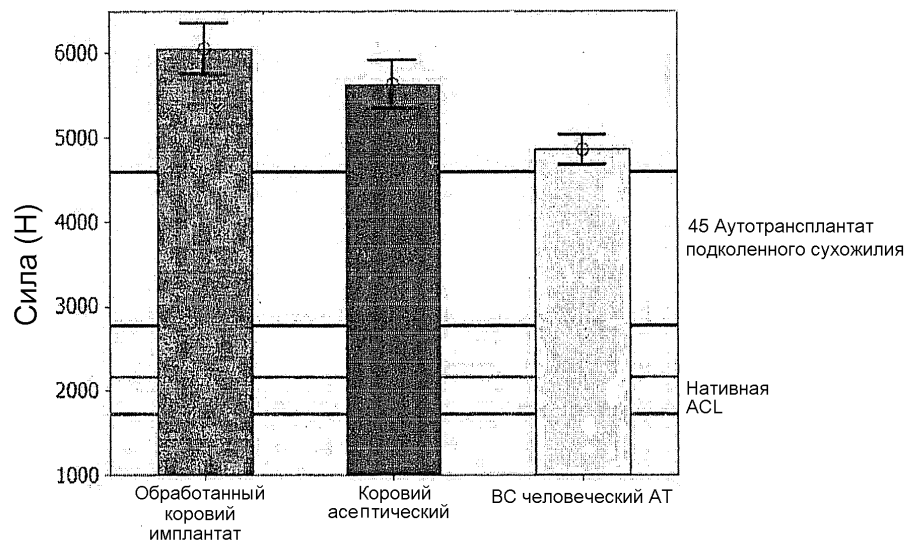
$$AMIR = \frac{\text{Момент площади инерции вокруг оси Y}}{\text{Момент площади инерции вокруг оси X}} = \frac{\text{Средняя большая}^2}{\text{Средняя маленькая}^2}$$

Прогнозируемая UTF = 0.2415 (Взвешенная CSA) x LD^LD Power + 1546

Форма	Масса формы	LD Power
Эллиптическая	0.50153	1.770
Прямоугольная	-0.30995	2.237

2/6

Фиг.2



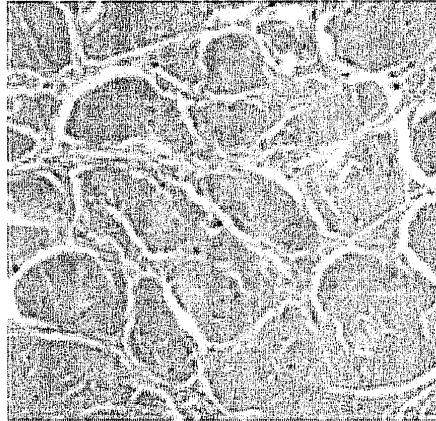
Данные тянущего усилия согнутого в петлю имплантата

Коровий имплантат ~1200 Н больше чем "высокий" средний аутотрансплантат (значение $p < 0,01$)

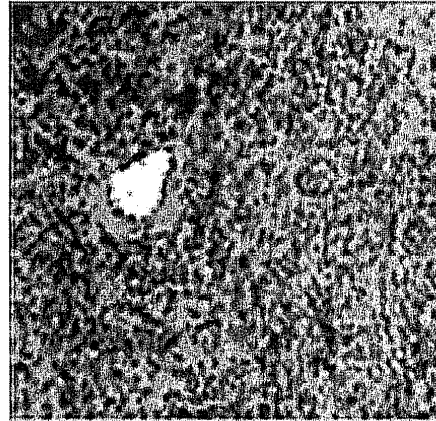
Возможность большей прочности чем нативная ACL: 98,6%

Hamner (1999), Conner (2008): 4-Strand Hamstring Autograft
Noyes (1976), Woo (1991): Native ACL

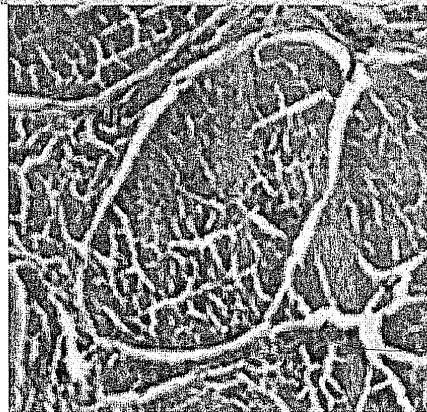
Фиг.3С



Фиг.3В



Фиг.3А

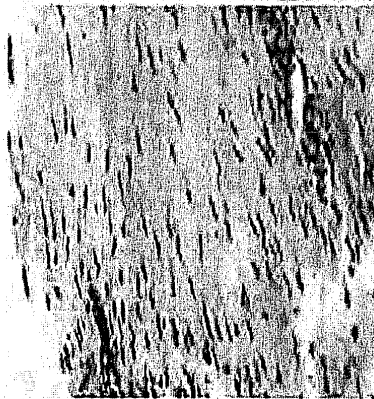


4/6

ФИГ.4С



ФИГ.4В



ФИГ.4А

