

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 400 947**

51 Int. Cl.:

A61L 31/10 (2006.01)
A61L 31/04 (2006.01)
A61L 27/24 (2006.01)
A61L 27/36 (2006.01)
A61K 35/34 (2006.01)
A61K 35/37 (2006.01)
A61K 35/50 (2006.01)
A61L 15/32 (2006.01)
A61L 15/40 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.01.1995 E 05078022 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.01.2013 EP 1676592**

54 Título: **Membrana que comprende colágeno para utilizar en la regeneración de tejidos guiada**

30 Prioridad:

06.01.1994 GB 9400163

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

15.04.2013

73 Titular/es:

**GEISTLICH PHARMA AG (100.0%)
Bahnhofstrasse 40
6110 WOLHUSEN, CH**

72 Inventor/es:

**GEISTLICH, PETER;
ECKMAYER, ZDENEK y
BOYNE, PHILIP**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 400 947 T3

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

DESCRIPCIÓN

Membrana que comprende colágeno para utilizar en la regeneración de tejidos guiada.

La presente invención se refiere a la curación de heridas y, en concreto, al uso de una membrana que contiene colágeno para la regeneración de tejidos guiada.

5 En cualquier situación, tal como después de una cirugía, en especial cirugía oral o dental, en la que resulta deseable la curación de heridas, se ha demostrado que es difícil proporcionar condiciones que eviten el crecimiento de otros tejidos hacia el área que requiere regeneración. Así, por ejemplo, cuando se retira una porción importante de la raíz dental debido a un deterioro o a una enfermedad, resulta deseable que se produzca una regeneración de hueso sano para que reemplace al tejido óseo retirado. Sin embargo, se ha descubierto que la cavidad que deja la retirada del hueso en seguida se rellena por tejido conectivo y que este crecimiento de tejido conectivo evita con gran eficacia la regeneración ósea.

10 Para solucionar estas dificultades se ha desarrollado la técnica conocida como "regeneración de tejidos guiada". En este método se inserta de modo quirúrgico una membrana alrededor de la periferia de la cavidad de la herida. La membrana evita o impide la invasión de la cavidad de la herida por tipos de células no deseados y así permite el crecimiento de las células preferidas en la cavidad, curando con ello la herida.

15 En la actualidad se emplean dos tipos de membranas en la regeneración de tejidos guiada:

- 1) membranas de PTFE no reabsorbibles sintéticas, tales como Goretex (marca comercial); y
- 2) membranas reabsorbibles sintéticas formadas por copolímeros de glicólido y lactida.

20 Sin embargo, ambos tipos de membranas tienen graves desventajas. La membrana de PTPE, aunque muestra unas características adecuadas de porosidad, resistencia y flexibilidad, sigue siendo no reabsorbible y por tanto se requiere una segunda operación quirúrgica para retirar la membrana. La necesidad de más procedimientos quirúrgicos puede ser traumática para el paciente y también puede dañar al nuevo tejido regenerado, extendiendo así el periodo de tratamiento.

25 El segundo tipo de membrana se teje a partir de fibras de copolímeros de glicólido y lactida. Aunque esta membrana es reabsorbible, los productos de la degradación son irritantes y esta irritación puede tener efectos indeseables para el paciente.

30 Ambas membranas de la técnica anterior actúan como filtros, permitiendo que los líquidos pasen sin restricciones y formando una barrera para las células. Sin embargo, la superficie de la membrana no es "apropiada para las células", es decir, no estabiliza a los coágulos sanguíneos ni actúa de soporte para el crecimiento celular. Por consiguiente, ninguna de las membranas de la técnica anterior proporciona condiciones óptimas para el crecimiento celular y la curación de heridas.

35 El documento DE 3607075 describe un método para tratar fracturas óseas para reducir la adhesión fibrosa del tejido circundante, que implica la aplicación a la fractura ósea de una membrana de colágeno reticulado que puede comprender una capa fibrosa rugosa aplicada sobre el hueso, y una capa membranosa lisa que tiene una superficie lubricada húmeda dirigida hacia el tejido circundante, que inhibe la formación de adhesiones entre los bordes del hueso y el tejido circundante.

40 El documento WO 90/11302 describe una membrana de colágeno reabsorbible para su uso en la regeneración de tejidos guiada, especialmente en la cirugía periodontal, que comprende una primera y una segunda cara, en la que dicha primera cara y/o segunda cara está revestida con uno o más agentes biológicamente activos, estando controlada la liberación de dichos agentes biológicamente activos por la reabsorción de las capas reabsorbibles de colágeno.

El documento WO 93/02718 describe la preparación de una membrana de reabsorción lenta de colágeno químicamente reticulado, obtenida mediante la reticulación de un gel de colágeno coagulado, y el uso de dicha membrana en la regeneración de tejido óseo guiada, en particular en la cirugía periodontal.

45 Los inventores han descubierto una membrana con características ideales para la regeneración de tejidos guiada.

La presente invención se define mediante las reivindicaciones adjuntas.

La presente invención proporciona una membrana de colágeno reabsorbible para su uso en la regeneración de tejidos guiada, en la que una cara de dicha membrana es fibrosa, permitiendo con ello el crecimiento celular sobre

ella, y la cara opuesta de dicha membrana es lisa, inhibiendo con ello la adhesión celular sobre ella.

Así, las dos caras o lados opuestos de la membrana tienen diferentes texturas que afectan al crecimiento celular de diferente forma.

5 La cara lisa actúa como barrera o filtra para dificultar el crecimiento celular y evita que tipos celulares no deseables colonicen la cavidad descrita por la membrana mediante separación física. Por contraste, la cara fibrosa de la membrana es hemostática (estabiliza los coágulos sanguíneos) y ayuda al crecimiento celular proporcionando un soporte adecuado para las nuevas células. Por tanto, en el uso, la membrana debe insertarse con la cara lisa hacia el exterior y con la cara fibrosa dirigida hacia las células cuya regeneración se desea.

10 La membrana para su uso en la regeneración de tejidos guiada según la presente invención puede derivarse de una membrana de colágeno natural. Al estar derivada de una fuente natural, la membrana para su uso en la presente invención es totalmente reabsorbible por el cuerpo y no forma productos de degradación tóxicos.

15 Además, la membrana tiene una resistencia al desgarro y una resistencia a la propagación del desgarro comparables a la de un material textil en estado húmedo y seco. Por tanto, la membrana puede suturarse quirúrgicamente si es necesario. El material de la membrana es muy hidrófilo y tiene una buena adherencia cuando está húmedo, permitiendo apilar varias capas. Cuando está húmedo, el material es muy elástico, lo cual permite cubrir de modo adecuado las heridas desiguales o con forma irregular.

En seres humanos y en animales, ciertas membranas que rodean órganos importantes y separan diferentes tejidos y células están formadas por colágeno. Los ejemplos de dichas membranas incluyen el pericardio y las membranas placentarias a una macroescala, y las membranas basales a una microescala.

20 Los productos del colágeno se emplean ampliamente en medicina en la actualidad. Está disponible una diversidad de materiales de colágeno, incluyendo colágeno soluble, fibras, esponjas, membranas e implantes óseos de colágeno, que permiten un uso diverso de este material, por ejemplo, fibras y esponjas de colágeno para la hemostasis, membranas de colágeno para cubrir heridas o para implantación, e inyecciones de colágeno soluble en cirugía plástica. No obstante, hasta la fecha no se ha reconocido que una membrana de colágeno podría ser adecuada para la regeneración de tejidos guiada.

25 En la técnica anterior se han descrito diversas membranas que contienen colágeno artificiales y se han propuesto para la cobertura o el vendaje de heridas. Así, en el documento WO-A-88/08305 (The Regents of The University of California) se describe un sustituto de piel de material compuesto que consiste en una capa de células epidérmicas humanas junto con una capa de una membrana biosintética que puede estar formada por colágeno y mucopolisacáridos. Sin embargo, la porción de colágeno/mucopolisacáridos tiene una textura uniforme en toda su extensión y no muestra las propiedades de la membrana propuesta en la presente para la regeneración de tejidos guiada. Además, estas membranas son muy inmunorreactivas y sólo pueden ser utilizadas por el donante de las células. Otra membrana que contiene colágeno artificial se describe en el documento DE-A-2631909 (Massachusetts Institute of Technology). Esta membrana consiste en un mínimo de dos capas, siendo la primera capa una combinación de colágeno y mucopolisacáridos, y siendo la segunda capa un polímero sintético, tal como un poliacrilato. Sin embargo, esta membrana es totalmente no reabsorbible, puesto que la capa de colágeno está tan internamente reticulada que no puede producirse la reabsorción.

30 La membrana para su uso en la presente invención puede derivarse directamente de membranas naturales que, en la medida de lo posible, mantienen su estructura de colágeno natural. Las fuentes para la membrana incluyendo secciones de piel con una cara granulada, tendones, diversas membranas de animales, etc. Una fuente preferida para la membrana es la membrana del peritoneo natural, en especial extraída de terneros o lechones. Se prefieren en especial las membranas del peritoneo de cerdos jóvenes de 6-7 semanas de edad (que pesan 60-80 g).

35 El material de membrana para su uso en la presente invención debe consistir preferiblemente en colágeno insoluble, puro, y nativo (no desnaturalizado). Sin embargo, en el cuerpo de un animal, el colágeno está acompañado de una serie de sustancias que tienen propiedades químicas, físicas y/o fisiológicas no deseables. Por tanto, el colágeno debe librarse de estas sustancias mediante una purificación. Puesto que la naturaleza de estas sustancias varía considerablemente, una purificación enzimática es casi imposible. Por tanto, resulta preferible realizar una purificación de modo químico, teniendo cuidado para minimizar cualquier alteración en la estructura química del colágeno y así mantener sus propiedades nativas originales.

40 Según otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método para preparar una membrana según se describió anteriormente, en el que una membrana de colágeno de mamífero que tiene una cara lisa y una cara fibrosa se somete a un tratamiento con un álcali para saponificar las grasas y degradar las sustancias sensibles a álcalis, y después se acidifica para degradar las sustancias sensibles a ácidos, seguido de un lavado, un secado, un desgrasado, y una reticulación opcional.

Durante la purificación se producen los siguientes cambios:

- se eliminan las proteínas que no son del colágeno;
- los glicosaminoglicanos y los proteoglicanos se disuelven y se eliminan;
- las grasas son parcialmente saponificadas, y totalmente eliminadas.

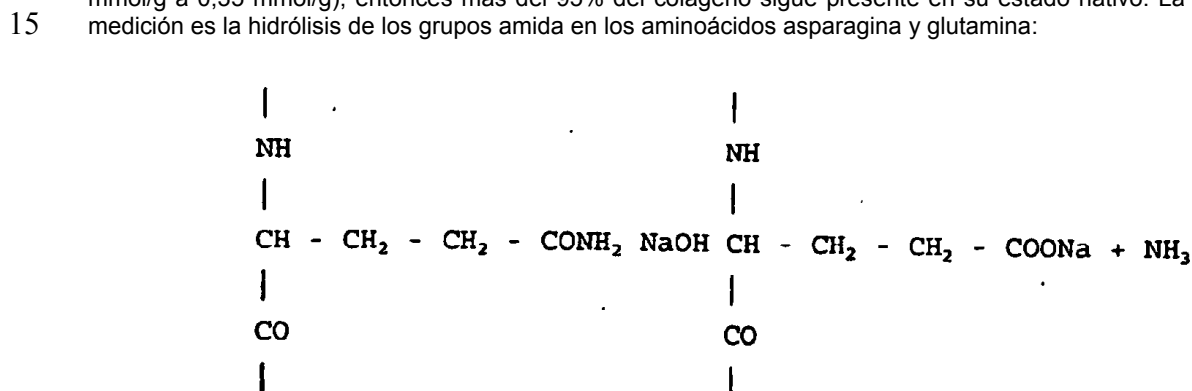
5 Durante dicho tratamiento también pueden producirse los siguientes cambios no deseables:

- la hidrólisis de los grupos amida de la asparagina y la glutamina;
- un desplazamiento en el punto isoeléctrico;
- la ruptura de enlaces de reticulación;
- la transamidación, con la formación de isopéptidos;

10 - la racemización de aminoácidos;

- la ruptura de enlaces peptídicos.

El nivel de nitrógeno de amida en la membrana actúa como indicador de estos cambios. Por ejemplo, se ha descubierto que si el contenido en nitrógeno de amida disminuye a aproximadamente la mitad (es decir, de 0,7 mmol/g a 0,35 mmol/g), entonces más del 95% del colágeno sigue presente en su estado nativo. La base de esta medición es la hidrólisis de los grupos amida en los aminoácidos asparagina y glutamina:



El grado de purificación del colágeno puede ser determinado por un análisis de aminoácidos. El colágeno se hidroliza para formar aminoácidos, lo cual significa que este análisis indica el colágeno puro y la eliminación de proteínas que no son del colágeno, pero no la desnaturalización del colágeno.

20 Junto con el análisis de aminoácidos del colágeno, también puede analizarse el contenido en glicosamina y proteoglicanos. Estos contaminantes se hidrolizan, y el contenido en hexosamina y glucosamina monomérica de la membrana se determina mediante una cromatografía. Se ha descubierto que la cantidad de glicosamina y galactosamina después de una purificación es de aproximadamente 1 molécula por 10.000 moléculas de aminoácidos.

25 En un método para preparar las membranas, los materiales brutos primero se tratan con un álcali. Para esta etapa se emplean disoluciones de NaOH en concentraciones del 0,2-4% en peso. Las grasas se saponifican, y cualquier proteína acompañante sensible a álcalis se elimina junto con cualquier otra sustancia sensible a álcalis, tal como glicosaminoglicanos, proteoglicanos, etc. El proceso se controla determinando el nitrógeno de amida. Al final del tratamiento con álcalis, el nivel de nitrógeno de amida debe estar entre 0,3 y 0,5 mmol/g.

30 La segunda etapa es el tratamiento del material con un ácido inorgánico, habitualmente HCl. Se eliminan los contaminantes sensibles a ácidos, las fibras se hinchan mucho y de esta forma se afloja la estructura fibrosa. La acidificación continúa hasta que el material se acidifica de modo homogéneo.

Después de esto, el material se lava. Ha demostrado ser útil lavar el material hasta que el pH cambia de 0,5-1,5

(durante la acidificación con HCl) a 2,5-3,5. El lavado se realiza preferiblemente con agua destilada.

5 El material hinchado ahora puede nivelarse (dividirse) para lograr un espesor uniforme. Posteriores etapas incluyen una operación de deshinchamiento, una neutralización, y un lavado a fondo del material. Para esto, el material primero se trata con una disolución salina común ácida (pH 2,8-3,5) (concentración al 5-10% en peso). El material así se deshinch completamente. Después se lava con un exceso de agua destilada ligeramente alcalina hasta que el pH del material alcanza 5,8-6,5. El material entonces se lava a fondo con agua destilada (pH 6,0). Con esto termina la primera etapa de producción, es decir, la purificación. A esto le sigue un secado y un desgrasado.

10 El material se seca mediante lavados repetidos con acetona. Esto provoca el encogimiento de las fibras de colágeno y, como resultado, queda formada una estructura abierta. El desgrasado se realiza con n-hexano. Esto elimina las últimas trazas de sustancias hidrófobas del material.

A este respecto, hay que hacer referencia al documento US-A-5028695 (documento EP-A-331786) que describe la producción de membranas adecuadas para su uso en la presente invención.

El espesor en seco de la membrana para su uso en la regeneración de tejidos guiada según la presente invención de manera ideal debe ser entre 0,1 y 1,0 mm, pero puede verse influida por el hinchamiento del material.

15 Así, la membrana puede dividirse o cortarse para lograr el espesor deseado, con la condición de que se mantenga la textura dual de la membrana.

La membrana puede tratarse después para adaptar sus propiedades para ajustarse a un tipo de herida concreta. Así, el colágeno de la membrana puede reticularse para estabilizar la membrana y reducir la velocidad de absorción por el cuerpo.

20 Todos los agentes reticulantes conocidos hasta la fecha y utilizados para productos médicos pueden emplearse para las membranas (por ejemplo, formaldehído, glutardialdehído, hexametildiisocianato, dicitlohexilcarbodiimida, etc.). La reticulación puede realizarse de modo físico mediante la aplicación de calor. En este caso, el efecto de reticulación es ciertamente menor, pero suficiente para la mayoría de las aplicaciones. De manera conveniente, el colágeno de la membrana se reticula de modo físico mediante un calentamiento hasta 100-120 °C (durante 30 minutos a 5 horas), extendiendo con ello el tiempo de degradación.

25 De manera conveniente, el grado de reticulación introducido será tal que la velocidad de reabsorción de la membrana se correlaciona con el crecimiento del nuevo tejido y la curación de la herida. Por ejemplo, los osteocitos tardan aproximadamente 6 semanas para regenerar una cavidad dental y, así, una membrana que sea absorbida en un periodo de 8-12 semanas será adecuada para el revestimiento de este tipo de heridas. Evidentemente, la membrana no debe estar muy reticulada, porque sino la velocidad de absorción sería demasiado lenta y, en casos extremos, la membrana deja de ser absorbible.

30 Una modificación que puede realizarse en la membrana consiste en revestir o impregnar la cara fibrosa con un glicosaminoglicano (GAG), tal como ácido hialurónico, sulfato de condroitina, sulfato de dermatano, o sulfato de queratano.

35 En los tejidos de colágeno nativos, los GAG aparecen, en parte, como componente de proteoglicanos (PG). El sulfato de condroitina, el sulfato de dermatano, y el sulfato de queratano se unen covalentemente a la proteína central de los PG, mientras que el ácido hialurónico se une mediante enlaces no covalentes. Para un uso según la invención, los GAG pueden añadirse en forma de PG. Sin embargo, esto es menos preferido a la vista de los potenciales problemas inmunológicos que pueden surgir debido al contenido en proteínas de los PG.

40 Los glicosaminoglicanos, tales como el ácido hialurónico y los proteoglicanos, son importantes moléculas reguladoras que afectan a la estructura de los tejidos. Tienen una influencia favorable sobre:

- la infiltración celular;
- la formación y la degradación de la matriz de fibrina;
- el hinchamiento de la matriz;

45 - la fagocitosis;

- la vascularización.

Poco tiempo después de una lesión, el contenido en GAG de la herida aumenta. El ácido hialurónico y los GAG relacionados se unen a la fibrina y forman una matriz tridimensional (coágulo) entrelazada con la matriz de fibrina. Así, la matriz de fibrina original queda deformada, se hincha y se hace más porosa. Esto permite una infiltración y migración mejor y más rápida de las células hacia la matriz.

- 5 El ácido hialurónico y el fibrinógeno reaccionan de modo específico entre sí, incluso si cualquiera de las dos moléculas está en estado sólido.

En la etapa inflamatoria de la lesión, el ácido hialurónico estimula la función de los granulocitos, altera las propiedades de la superficie de los leucocitos polimorfonucleares y regula la actividad fagocítica de las células.

- 10 Durante la conversión y la degradación de la matriz de fibrina y ácido hialurónico se producen fragmentos más pequeños de ácido hialurónico. Los pequeños fragmentos de ácido hialurónico estimulan la construcción de nuevos vasos sanguíneos.

Además, los GAG, tales como el ácido hialurónico, hacen que el colágeno sea incapaz de provocar una reacción inmunológica en un animal hospedante. Para lograr esto, el colágeno debe hacerse reaccionar con al menos un porcentaje en peso del ácido GAG.

- 15 Los GAG y los PG son portadores de proteínas estructurales y biológicamente activas. Se ha descubierto que el complejo de GAG y proteínas desempeña un papel muy importante en la curación de heridas sin cicatrices en el feto.

Por estas razones, la impregnación de la membrana de colágeno con GAG, tales como el ácido hialurónico, mejora la regeneración de tejidos dentro de una herida o una lesión ósea.

- 20 En otro aspecto, la presente invención proporciona una membrana para su uso en la regeneración de tejidos guiada, teniendo una cara de dicha membrana una textura lisa y la cara opuesta una textura fibrosa, estando dicha membrana impregnada con uno o más GAG o PG.

Preferiblemente, la concentración de GAG y/o PG aumenta a través del espesor de la membrana, estando la mayor concentración de GAG o PG en la cara fibrosa de la membrana.

- 25 El material de GAG o PG puede introducirse en la membrana como un gel que se extiende sobre la cara fibrosa de la membrana y después se deja secar. Esta estrategia logra un gradiente de concentración decreciente hacia el interior de la membrana, mientras que los GAG o PG no penetran completamente a través de la membrana.

- 30 Aunque no se pretenda limitación alguna por la teoría, se cree que las cadenas de GAG y PG de alto PM actúan para guiar a las nuevas células hacia la superficie de la membrana que entonces puede actuar como soporte para el crecimiento celular.

Por tanto, resulta particularmente beneficioso que la cara fibrosa de la membrana esté en forma de una matriz de material compuesto que incluye PG y/o GAG.

- 35 El ácido hialurónico y otros GAG se encuentran de modo natural en el cuerpo, y la piel contiene 19% en peso de ácido hialurónico y el peritoneo contiene 13% en peso de ácido hialurónico. Las sustancias GAG naturales no provocan problemas con relación a la toxicidad o a la reabsorción, y además se cree que actúan como sustancias nutritivas naturales para las células. El ácido hialurónico y otros GAG se producen de modo industrial, y así pueden conseguirse con facilidad en cantidades comerciales.

De modo convencional, la membrana según la presente invención contiene del 0,1% al 30% en peso de un GAG o PG, por ejemplo, ácido hialurónico, por ejemplo, del 2-10% en peso.

- 40 Si es necesario también pueden incorporarse a la membrana otros productos farmacéuticos, tales como antibióticos (por ejemplo, tetraciclina), productos quimioterapéuticos (por ejemplo, taurolidina) y otros fármacos.

La presente invención también proporciona el uso de la membrana reabsorbible descrita anteriormente, que contiene opcionalmente uno o más PG, o uno o más GAG, tales como el ácido hialurónico, como aditivo para la fabricación de una matriz de componentes para su uso como implante de regeneración de tejidos guiada.

- 45 Las membranas se utilizan en la regeneración de tejidos guiada después de una cirugía dental u oral. En este caso, a menudo es importante que se produzca una regeneración ósea, por ejemplo, después de la eliminación parcial de una raíz dental o de una parte de la mandíbula. El área orofacial restringida hace que la cirugía sea difícil y, así, un

implante totalmente reabsorbible no tóxico para la regeneración de tejidos guiada sería muy ventajoso. Además, la naturaleza de la membrana es particularmente adecuada para estimular el crecimiento de osteocitos (tejido óseo).

5 La presente invención también proporciona una membrana para su uso en un método para tratar heridas o lesiones en la región oral del cuerpo de un ser humano o de un animal no humano (preferiblemente un mamífero), comprendiendo dicho método la aplicación de una membrana según se describió anteriormente a una herida o lesión, estando dicha membrana orientada de forma que la cara fibrosa está dirigida hacia el área en que se requiere la regeneración de tejidos.

10 La figura 1 muestra una membrana según la presente invención en su uso para la regeneración ósea de un diente (1) que ha sufrido una importante pérdida ósea alrededor de la raíz (2) que ha producido una cavidad (3) en donde normalmente se encontraría una raíz sana. La raíz (2) sobresale a través de una capa de tejido conectivo o encía (4) hacia el interior de un alvéolo de hueso (5). Para evitar el crecimiento de tejido conectivo (4) hacia el interior de la cavidad (3), se coloca una cubierta de membrana (6) alrededor del borde más externo de la herida. La membrana (6) se extiende alrededor de toda la cavidad de la herida (3). La membrana (3) tiene una cara lisa (7) dirigida hacia el lado opuesto a la cavidad (3), y una cara fibrosa (8) que se abre a la cavidad (3). La cara fibrosa (8) proporciona una superficie de soporte para el crecimiento de nuevas células hacia fuera de la raíz (2), mientras que la cara lisa (7) de la membrana (6) evita que las células del tejido conectivo (4) invadan la cavidad de la herida. La membrana (6) es reabsorbida lentamente por el cuerpo, y de forma óptima la absorción de la membrana se correlaciona con el tiempo que tarda la herida en curarse.

La presente invención puede ilustrarse más a fondo mediante el siguiente ejemplo no limitante.

20 **Ejemplo**

Se retiró completamente la carne y la grasa de membranas peritoneales de terneros jóvenes por medios mecánicos, se lavaron con agua corriente y se trataron con una disolución de NaOH al 2% durante 12 horas. Las membranas entonces se lavaron con agua corriente y se acidificaron con HCl al 0,5%. Después de que el material haya sido acidificado a través de todo su espesor (aproximadamente 3 horas), el material se lava hasta que se obtiene un pH de 3,5. El material entonces se encoge con disolución salina al 7%, se neutraliza con una disolución de NaHCO₃ al 1% y se lava con agua corriente. El material entonces se deshidrata con acetona y se desgrasa con N-hexano. El contenido en nitrógeno de amida del material es de 0,47 mmol/g.

Determinación del contenido en nitrógeno de amida

Según Eastoe, E., Courts, A., Practical Analytical Methods for Connective Tissue Proteins (1963).

30 *Reactivos*

1. HCl 2 N (160 ml de HCl concentrado constituido hasta 1 litro).
2. Disolución de Borax 0,05 M-NaOH 0,15 N (19,1 g de Na₂B₄O₇·10H₂O) + 6 g de NaOH en 1 litro, rellenándose con H₂O destilada fría.
3. Indicador: mezclado en etanol (azul de metileno al 0,33% + rojo de metileno al 0,05%).
- 35 4. Ácido bórico al 1% con el indicador, 10 g de ácido bórico en 1 litro de H₂O destilada fría, 8 ml de indicador, 0,7 ml de NaOH 0,1 N.
5. HCl 0,01 N.

Método

- 40 1. Se dispersa 1 mg de masa de colágeno secada en 50 ml de HCl 2 N y se hierve durante una hora. El volumen se constituye hasta 50 ml a 20 °C.
2. Se colocan 5 ml de esta dispersión en un matraz de micro-Kjehldahl, junto con 20 ml de la disolución 2; la mezcla se destila en 20 ml de disolución 4. La destilación tarda 6 minutos.
3. La disolución se titula con el reactivo 5.

Cálculo

ml de consumo de ácido x 20 = % mmol de N de amida

Ejemplo

1,36 ml de HCl 0,01 N x 20 = 27,2 % mmol = 0,27 mmol/g de N de amida

REIVINDICACIONES

- 5 1.- Una membrana de colágeno reabsorbible para su uso en la regeneración guiada de tejido óseo en la región oral del cuerpo de un ser humano o de un animal no humano después de una cirugía oral o dental, que comprende una membrana de colágeno purificado que es adecuada para la implantación en dicho cuerpo, y que se deriva de una membrana de colágeno natural, en la que una cara de dicha membrana es fibrosa, con lo que permite el crecimiento de células sobre ella, y la cara opuesta de dicha membrana es lisa, inhibiendo con ello la adhesión de células sobre ella, y actúa como una barrera o filtro para impedir el crecimiento de células y evitar que tipos celulares indeseables colonicen la cavidad descrita por la membrana, y en la que la membrana de colágeno purificada consiste en colágeno insoluble, puro, y nativo que ha sido purificado de modo químico para minimizar cualquier alteración de la estructura química del colágeno y así mantener sus propiedades nativas originales, en la que dicha membrana se coloca en una orientación de modo que la cara fibrosa está dirigida hacia el área en que se requiere la regeneración de tejidos.
- 10 2.- Una membrana según la reivindicación 1 para el uso según la reivindicación 1, en la que dicha membrana se deriva de peritoneo o pericardio, membrana placentaria o membrana basal de mamífero.
- 15 3.- Una membrana según la reivindicación 2 para el uso según la reivindicación 1, en la que dicha membrana se deriva de terneros o lechones.
- 4.- Una membrana según la reivindicación 3 para el uso según la reivindicación 1, en la que dicha membrana se deriva de lechones de 6-7 semanas de edad.
- 20 5.- Una membrana según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para el uso según la reivindicación 1, en la que dicha membrana está sustancialmente exenta de grasa.
- 6.- Una membrana según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para el uso según la reivindicación 1, en la que dicha membrana tiene un espesor de 0,1 a 1,0 mm cuando está seca.
- 7.- Una membrana según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para el uso según la reivindicación 1, en la que la cara fibrosa de dicha membrana está impregnada con un glicosaminoglicano.
- 25 8.- Una membrana según la reivindicación 7 para el uso según la reivindicación 1, en la que la cara fibrosa de dicha membrana está impregnada con ácido hialurónico.
- 9.- Una membrana según la reivindicación 7 para el uso según la reivindicación 1, en la que la cara fibrosa de dicha membrana está impregnada con sulfato de condroitina, sulfato de dermatano y/o sulfato de queratano.
- 30 10.- Una membrana según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9 para el uso según la reivindicación 1, en la que dicha membrana contiene del 0,1% al 30,0% en peso, por ejemplo del 2% al 10% en peso, de glicosaminoglicano.
- 11.- Una membrana según cualquiera de las reivindicaciones anteriores para el uso según la reivindicación 1, conteniendo dicha membrana uno o más productos farmacéuticos.
- 12.- Una membrana según la reivindicación 11 para el uso según la reivindicación 1, conteniendo dicha membrana taurolidina.
- 35 13.- El uso de una membrana según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 para la fabricación de un implante de regeneración de tejidos guiada.
- 40 14.- Una membrana según la reivindicación 1 para su uso en un método para tratar heridas o lesiones en la región oral del cuerpo de un ser humano o de un animal no humano, comprendiendo dicho método la aplicación de dicha membrana a la herida o lesión, estando dicha membrana orientada de modo que la cara fibrosa está dirigida hacia el área en que se requiere la regeneración de tejidos.

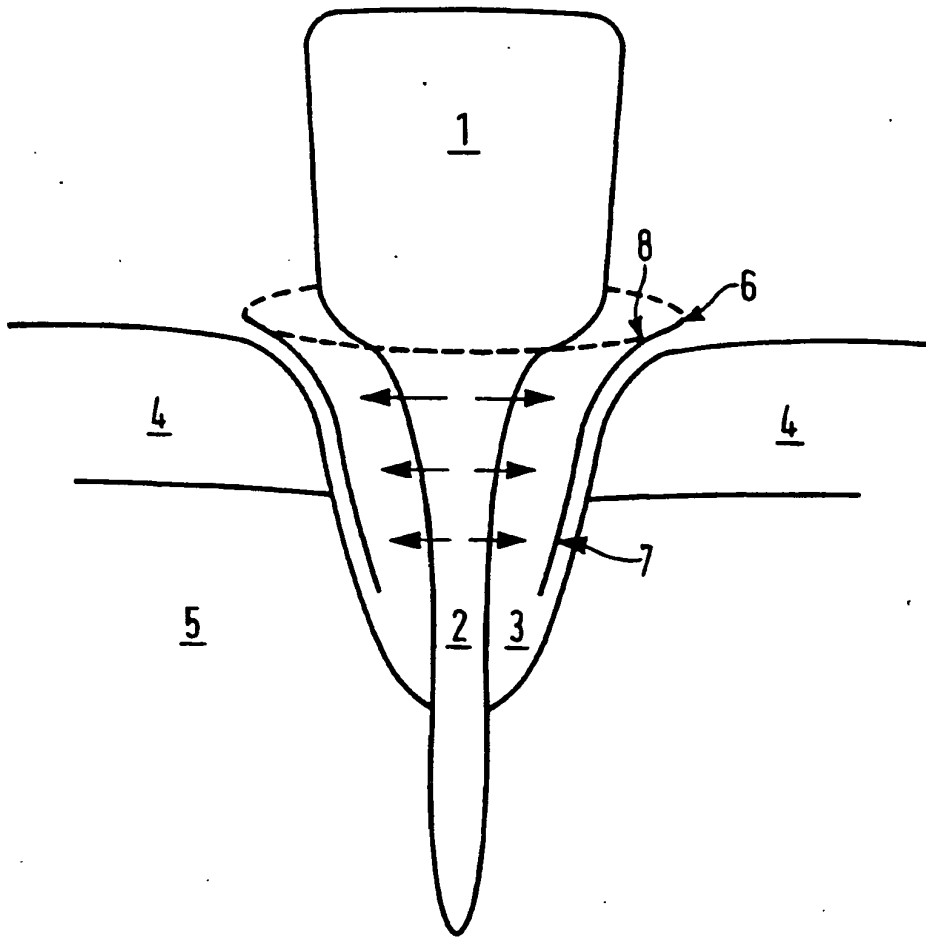


FIG.1