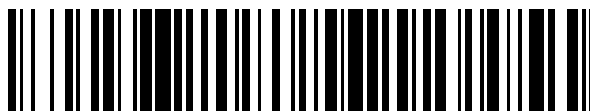


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 538 206**

51 Int. Cl.:

**A61L 31/14**

(2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.07.2011** **E 11733657 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.03.2015** **EP 2590694**

54 Título: **Membrana de regeneración ósea y método para formar una membrana de regeneración ósea**

30 Prioridad:

**09.07.2010 EP 10305769**

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

**18.06.2015**

73 Titular/es:

**UNIVERSITÉ DE NANTES (50.0%)**

**1 quai de Tourville**

**44035 Nantes Cedex 1, FR y**

**CHU NANTES (50.0%)**

72 Inventor/es:

**HOORNAERT, ALAIN;**

**LAYROLLE, PIERRE y**

**SOHIER, JÉRÔME**

74 Agente/Representante:

**VEIGA SERRANO, Mikel**

ES 2 538 206 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 de regeneración ósea y método para formar una membrana de regeneración ósea

5 **Sector de la técnica**

La invención se refiere a una membrana de regeneración ósea y a un método para formar una membrana de regeneración ósea.

- 10 Aunque sin limitarse a esto, la invención tiene un interés particular en aplicaciones en el campo de la odontología para cirugías dental y maxilofacial para consolidar la zona ósea de una mandíbula.

**Estado de la técnica**

- 15 Realmente, en la práctica odontológica, la falta de volumen óseo limita en gran medida el uso de implantes dentales. Un volumen óseo insuficiente, tanto en altura como en grosor, puede ser de origen congénito, postraumático o de procedimientos quirúrgicos o puede ser el resultado de enfermedades tales como periodontitis. Para resolver estos problemas clínicos, se usan materiales de aumento óseo, tales como injerto óseo autólogo, matriz ósea desmineralizada o cerámica de fosfato cálcico, asociados con una membrana, antes de la implantación de implantes dentales. Típicamente, el material de aumento óseo se coloca en cavidades óseas alveolares frescas, en el seno maxilar, para aumentar la anchura o la altura de la cresta alveolar. El material de aumento óseo, como material de relleno (es decir injerto óseo autólogo, cerámica de fosfato cálcico), ayuda a regenerar el tejido óseo mientras que la membrana impide el crecimiento hacia dentro de tejido fibroso. Después de un periodo de consolidación de varios meses, se colocan implantes dentales en las zonas injertadas. La combinación de un material de relleno y una membrana ha desarrollado el concepto de regeneración de tejido óseo guiada (GBR).

- El concepto de regeneración de tejido óseo guiada (GBR) se basa en los principios de consolidación de tejido para las zonas óseas. Se sabe desde los años 1980 que las células que tienen acceso y pueden migrar al interior de un espacio de una herida dado determinan el tipo de tejido que se regenera en este espacio. Para aplicar este principio al aumento óseo, se han usado membranas barrera para excluir células no deseadas de la zona de la herida (células fibrosas del tejido conectivo). De forma concomitante, se favorece la migración de células deseadas (células mesenquimáticas y óseas) al espacio del defecto. Además de la función de barrera y mantenimiento del espacio, se ha descubierto que es útil proporcionar a las células deseadas una matriz definida de modo que su migración y organización en un nuevo tejido óseo se promueva aún más.

- El concepto de regeneración tisular guiada (GTR) se aplica con frecuencia a la reconstrucción de defectos periodontales. Se usan membranas para impedir que el tejido conectivo de crecimiento rápido invada el defecto y para dar tiempo al cemento-ligamento periodontal y la regeneración ósea.

- 40 Aunque la invención se ha mostrado de particular interés en el campo de la odontología, la invención no está limitada a esto y puede aplicarse ventajosamente en otros campos de regeneración de tejido óseo guiada. Por ejemplo, la invención puede aplicarse ventajosamente en ortopedia o cirugía raquídea.

- Entre los productos conocidos que pueden usarse para regeneración de tejido óseo guiada, la matriz extracelular colagenosa (ECM) podría permitir la intensificación de la migración y la organización de las células en un nuevo tejido óseo. Pero el uso está obstaculizado por la falta de suficiente rigidez para el mantenimiento del espacio, baja disponibilidad de fuentes alógenas y la posibilidad de transferir patógenos desde fuentes xenógenas.

- Además, algunas membranas disponibles en el mercado para regeneración tisular guiada están hechas de colágeno de origen animal (es decir porcino, bovino). Los ejemplos de membranas de colágeno son Biogide (Geistlich Pharma AG, Suiza), Biomend (Zimmer Dental), OsseoGuard (Biomet 3i), Inion (Inion Oy, Tempere, Finlandia) Guidor (Guidor AB, Huddinge, Suecia). Sin embargo, estas membranas barrera hechas de colágeno conllevan el riesgo de rechazo inmunológico y transmisión de enfermedades. La biodegradación de membranas de colágeno en el cuerpo humano es variable dependiendo de la reticulación química. Además, la permeabilidad a células y tejidos no es controlable, dado que varía entre fuentes.

- También se conocen membranas de regeneración tisular hechas de polímeros que incluyen politetrafluoroetileno no reabsorbible (PTFE, Gore-Tex, W.L. Gore & Associates inc., Elkton MD, EE. UU.) y TefGen (Lifecore Biomedical, LLC, Chaska, MN, EE. UU.). También existen algunas membranas compuestas por polímeros reabsorbibles, tales como poliláctido (PLA), poliglicolido (PGA) o una mezcla de los mismos (PLGA). Ejemplos de membranas de poliláctido reabsorbibles disponibles en el mercado son Epiguide o Matrix barrier (Kensey Nash Corp). Sin embargo, varios problemas están asociados con el uso de estas membranas barrera. Las membranas no reabsorbibles tienden a quedar expuestas, necesitan una segunda cirugía para ser extirpadas y pueden inducir reacciones celulares. Las membranas reabsorbibles superan estos inconvenientes pero no proporcionan la misma calidad de resultados, especialmente en lo que respecta a la ganancia de hueso marginal. Se acuerda que la causa de esta discrepancia está asociada con la capacidad de la membrana de mantener espacio en el defecto debido a

propiedades mecánicas débiles.

Las membranas actuales muestran mala capacidad de regeneración ósea. Para superar estos problemas, recientemente se han incorporado a las membranas mineral óseo (Schwarz F, Int J Oral Maxillofac Surg 2007), cerámica de fosfato cálcico tal como hidroxiapatita (Liao S, Biomaterials 2005), fosfato tricálcico y mezclas, carbonato cálcico (Fujihara K, Biomaterials 2005).

La mayoría de las membranas sintéticas están hechas en forma de espuma porosa, creada mediante métodos tradicionales, tales como lixiviado de partículas, moldeo por colada con disolvente o formación de espuma con gas. Recientemente, se ha presentado una nueva técnica, que se denomina electrohilado o hilado electrostático y permite la preparación de membranas fibrosas finas.

El electrohilado usa un voltaje eléctrico elevado de varios kilovoltios para estirar una solución polimérica o fundidos poliméricos en un chorro hilvanado, una jeringa o un tubo capilar. Un chorro de polímero es expulsado desde la solución polimérica cargada bajo la influencia del campo eléctrico aplicado. Fibras ultrafinas se depositan sobre un colector unido al suelo en forma de una estructura no tejida. Las fibras obtenidas a partir de electrohilado muestran diámetros en el intervalo de 50 nm a unos pocos micrómetros.

Para estimular la formación ósea, recientemente se han preparado membranas de policaprolactona (PCL) nano-hidroxiapatita electrohilada (Yang F, Acta Biomaterialia 2009). Se suspendieron partículas de hidroxiapatita de tamaño nanométrico en disolvente 2,2,2-trifluoroetanol (TFE) y agua mediante agitación ultrasónica y vigorosa antes de añadir polímero PCL. Se disolvió el tensioactivo, sal sódica de sulfosuccinato de dioctilo en el disolvente para obtener una suspensión estable de partículas en la solución polimérica. Se aplicó un voltaje de 18-22 kV para generar un chorro de polímero en el equipo de electrohilado. Las fibras resultantes se recogieron en un mandril giratorio. Estudios previos publicados han demostrado proliferación celular sobre estas membranas de nanofibras electrohiladas pero no penetración celular. Además, no pudo demostrarse ninguna prueba de eficacia in vivo con estas membranas de PCL-nHA electrohiladas.

Otra membrana que comprende una capa porosa semipermeable y una capa fibrilar formada mediante electrohilado se conoce del documento WO-A-2009/054609.

Sin embargo, las membranas electrohiladas conocidas no permiten penetración celular o migración celular adecuada a través de las fibras para permitir la formación de una matriz mineralizada y, por lo tanto, de tejido óseo. Los espacios entre las fibras electrohiladas no son suficientes para la invasión celular. Típicamente, el tamaño de una célula es de aproximadamente 10  $\mu\text{m}$  y el espacio entre fibras electrohiladas es menor que el tamaño de una célula, impidiendo de este modo la invasión celular, el crecimiento celular hacia el interior o la colonización celular en el dispositivo implantable.

## Objeto de la invención

La invención pretende resolver uno o más de los problemas mencionados anteriormente.

Con este fin, de acuerdo con un primer aspecto, la invención proporciona una membrana de regeneración ósea que comprende:

- una capa densa hecha de polímero reabsorbible, teniendo dicha capa densa primera y segunda superficies opuestas y están adaptadas para formar una barrera para las células y los tejidos blandos,
- una capa nanofibrilar hecha de polímero reabsorbible y unida a la primera superficie de la capa densa, comprendiendo dicha capa nanofibrilar fibras que tienen un diámetro de tamaño nanométrico, estando dichas fibras entrelazadas para presentar un tamaño de poro promedio mayor de 10  $\mu\text{m}$  para permitir permeabilidad celular y regeneración de tejido óseo, teniendo la capa nanofibrilar una permeabilidad  $k$  entre  $0,4 \times 10^{-9} \text{ m}^2$  y  $11 \times 10^{-9} \text{ m}^2$ , preferentemente entre  $1 \times 10^{-9} \text{ m}^2$  y  $4 \times 10^{-9} \text{ m}^2$ , en particular sustancialmente de  $2 \times 10^{-9} \text{ m}^2$ .

Por lo tanto, la capa densa, como una capa de soporte, impide la migración celular desde tejidos conjuntivos, tales como la encía en una aplicación en odontología. Además, mientras se permite que la membrana se deforme y se suture a tejidos blandos, la capa densa proporciona suficiente rigidez e inflexibilidad para mantener el espacio del defecto.

La capa nanofibrilar muestra fibras con diámetros en el intervalo de las fibras de colágeno. Éste es, por lo tanto, a un colágeno sintético, dado que está hecho de polímero reabsorbible. La capa nanofibrilar es un excelente soporte para células que permite la unión, proliferación y diferenciación a una distancia de varios cientos de micrómetros de los bordes de la membrana. La capa nanofibrilar se degrada fácilmente mediante hidrólisis y fagocitosis en productos no tóxicos, tales como ácido láctico sin inflamación adversa.

Por lo tanto, la capa nanofibrilar, como una matriz sintética biomimética, soporta la consolidación ósea. La capa

nanofibrilar de la invención presenta propiedades particulares en la dirección de procesos de reparación celular y regeneración tisular. La capa nanofibrilar proporciona a las células una estructura similar a las redes de colágeno nativas en su organización y propiedades. La matriz de fibras obtenida tiene relaciones de superficie con respecto a volumen elevadas y elevada porosidad, con un tamaño de poro mayor que el tamaño celular promedio (por ejemplo 10  $\mu\text{m}$ ) y una permeabilidad apropiada que no puede obtenerse mediante membranas electrohiladas, para permitir la migración celular a través de la membrana hacia el defecto óseo a reparar. La invención mejora en gran medida la estrategia de regeneración ósea guiada para aumento óseo combinando las funciones de barrera, mantenimiento del espacio y formación ósea.

Además, de acuerdo con la invención, ambas capas están hechas de polímeros reabsorbibles, siendo estos polímeros reabsorbibles iguales o diferentes, haciendo de este modo a toda la membrana biodegradable y reabsorbible para mejorar su biocompatibilidad y su implantabilidad, y la seguridad de un paciente al que se le implanta la membrana.

La permeabilidad  $\kappa$  se calcula mediante la ecuación:

$$\kappa = \Delta Q \times L \times \mu / \Delta P \times A$$

donde,  $\Delta Q$  es un caudal de líquido a través de una muestra de capa nanofibrilar, estando dicho caudal determinado por la medida de un volumen de líquido que pasa a través de la muestra de capa nanofibrilar y recogido durante un intervalo de tiempo determinado ( $\text{m}^3 / \text{s}$ ),  
 $L$  es una longitud de la muestra de capa nanofibrilar ( $\text{m}$ ),  
 $\mu$  es una viscosidad cinemática de fluido del líquido ( $\text{Pa} \times \text{s}$ ),  
 $\Delta P$  es la caída de presión a través de la muestra de capa nanofibrilar determinada por la diferencia entre las presiones en superficies opuestas de la muestra de capa nanofibrilar ( $\text{Pa}$ ), y  
 $A$  es un área de sección transversal de la muestra de capa nanofibrilar ( $\text{m}^2$ ).

La capa nanofibrilar puede tener una porosidad  $p_{nl}$  mayor del 90%, preferentemente sustancialmente del 95%. Dicha porosidad  $p_{nl}$  se calcula mediante la ecuación:

$$p_{nl} = 1 - (W_{snl} - (V_{snl} \times d_{\text{polímero nl}}))$$

donde,  $W_{snl}$  es el peso de una muestra de capa nanofibrilar,  
 $V_{snl}$  es el volumen de la muestra de capa nanofibrilar,  
 $d_{\text{polímero nl}}$  es la densidad del polímero del que está hecha la capa nanofibrilar.

En contraste con la capa nanofibrilar, la capa densa puede ser una película sustancialmente no porosa. En particular, la capa densa puede tener una porosidad  $p_{dl}$  menor del 10%, preferentemente menor del 5%. Dicha porosidad  $p_{dl}$  se calcula mediante la ecuación:

$$p_{dl} = 1 - (W_{sdl} - V_{sdl} \times d_{\text{polímero nl}} \times d_{\text{polímero dl}})$$

donde,  $W_{sdl}$  es el peso de una muestra de capa densa,  
 $V_{sdl}$  es el volumen de la muestra de capa densa,  
 $d_{\text{polímero dl}}$  es la densidad del polímero del que está hecha la capa densa.

La capa densa y la capa nanofibrilar pueden estar unidas entre sí mediante puentes de hidrógeno.

La capa densa puede tener un grosor comprendido entre 30  $\mu\text{m}$  y 70  $\mu\text{m}$ , preferentemente entre 45  $\mu\text{m}$  y 55  $\mu\text{m}$ , y la capa nanofibrilar tiene un grosor comprendido entre 200  $\mu\text{m}$  y 300  $\mu\text{m}$ , preferentemente entre 230  $\mu\text{m}$  y 270  $\mu\text{m}$ .

La capa nanofibrilar puede ser compuesta e incorporar partículas adaptada para soportar la formación ósea, estando dichas partículas distribuidas entre las fibras. En particular, las partículas pueden ser partículas de fosfato cálcico.

La adición de estas partículas al interior de la capa nanofibrilar garantiza un almacén para la formación de tejido óseo. A medida que las fibras de la capa nanofibrilar se degradan, las partículas sirven como sustrato para las células óseas y son osteoconductoras.

De acuerdo con un segundo aspecto, la invención proporciona un método para formar una membrana de regeneración ósea, que comprende las etapas de:

- formar, a temperatura ambiente, una capa densa hecha de polímero reabsorbible, teniendo dicha capa densa primera y segunda superficies opuestas y estando adaptada para formar una barrera para células y tejidos blandos,
- formar, a temperatura ambiente, una capa nanofibrilar hecha de polímero reabsorbible, comprendiendo

dicha capa nanofibrilar fibras que tienen un diámetro de tamaño nanométrico, comprendiendo la etapa de formar la capa nanofibrilar las etapas de:

mezclar el polímero reabsorbible con un disolvente para obtener una solución polimérica,

alimentar una boquilla pulverizadora con dicha solución polimérica,

proyectar dicha solución polimérica a través de dicha boquilla con un chorro de gas adaptado para bombear la solución polimérica mediante presión negativa, en la que el polímero reabsorbible proyectado se precipita y solidifica por evaporación del disolvente para formar las fibras entrelazadas para presentar un tamaño de poro promedio mayor de  $10\ \mu\text{m}$  para permitir permeabilidad celular y regeneración de tejido óseo, teniendo la capa nanofibrilar (3) una permeabilidad  $\kappa$  entre  $0,4 \times 10^{-9}\ \text{m}^2$  y  $11 \times 10^{-9}\ \text{m}^2$ , preferentemente entre  $1 \times 10^{-9}\ \text{m}^2$  y  $4 \times 10^{-9}\ \text{m}^2$ , en particular sustancialmente de  $2 \times 10^{-9}\ \text{m}^2$ ,

depositar las fibras sobre una superficie colectora,

- unir, a temperatura ambiente, dicha capa nanofibrilar a la primera superficie de la capa densa.

La invención proporciona un método sencillo para obtener fibras de tamaño nanométrico que presentan una estructura adecuada de una matriz sintética biomimética que promueve la dirección de la reparación celular, los procesos de regeneración tisular y, de este modo, la consolidación ósea. Al contrario que los métodos para formar las membranas conocidas, el método de la invención es eficiente y adaptable, gracias a la reproducibilidad que proporciona. Además, con el método de la invención, el diámetro y la distribución de fibras nanométricas pueden controlarse fácilmente mediante parámetros tales como concentración de polímero, presión del chorro de gas, apertura de la boquilla, distancia de pulverización, etc. Además, en contraste con el electrohilado, el método es seguro dado que no requiere alto voltaje. Además, al contrario que los métodos conocidos, el método de la invención se implementa a temperatura ambiente, generalmente de  $20^\circ\text{C}$  a  $25^\circ\text{C}$ .

La capa densa puede formarse mediante moldeo por colada de una película. La etapa de formar la capa densa puede comprender entonces las etapas de:

mezclar el polímero reabsorbible con un disolvente para obtener una solución polimérica,

aplicar por colada dicha solución polimérica sobre una superficie colectora,

extender dicha solución polimérica sobre la superficie colectora, en la que el polímero reabsorbible colado y extendido precipita y solidifica por evaporación del disolvente para formar una película sustancialmente no porosa.

En una realización, la capa nanofibrilar se deposita sobre la primera superficie de la capa densa como superficie colectora durante la etapa de extender la solución polimérica, comprendiendo la etapa de unir la capa nanofibrilar a la primera superficie de la capa densa la formación de puentes de hidrógeno a medida que el polímero del que está hecha la capa densa precipita y solidifica por evaporación del disolvente. La formación de puentes de hidrógeno garantiza una buena resistencia de adhesión entre la capa densa y la capa nanofibrilar.

En otra realización, en la etapa de proyectar la solución polimérica, la solución polimérica es proyectada directamente sobre la primera superficie de la capa densa, y en la etapa de depositar las fibras, las fibras se depositan directamente sobre la primera superficie de la capa densa como superficie colectora, comprendiendo la etapa de unir la capa nanofibrilar a la primera superficie de la capa densa la formación de puentes de hidrógeno a medida que el polímero del que está hecha la capa nanofibrilar precipita y solidifica por evaporación del disolvente.

La etapa de formar una capa nanofibrilar puede comprender además, en la etapa de proyectar la solución polimérica, pulverizar partículas adaptadas para soportar la formación ósea.

El método puede comprender además una etapa de esterilizar la membrana de regeneración ósea.

### Descripción de las figuras

Otros objetos y ventajas de la invención surgirán de la siguiente divulgación de realizaciones particulares que se da como ejemplo no limitante, realizada en referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

- La figura 1 es una vista esquemática de una membrana de regeneración ósea biestratificada de acuerdo con una realización de la invención, comprendiendo la membrana de regeneración ósea una capa densa y una capa nanofibrilar,
- Las figuras 2a y 2b son, respectivamente, una vista macroscópica de una superficie de la capa densa opuesta a la capa nanofibrilar y una vista de sección transversal macroscópica de la membrana de regeneración ósea de la figura 1,
- Las figuras 3a y 3b son, respectivamente, vistas microscópicas de la capa densa y la capa nanofibrilar de la membrana de regeneración ósea de la figura 1, la figura 3c es una vista microscópica aumentada de la capa nanofibrilar que muestra fibras de tamaño nanométrico y partículas de fosfato cálcico entrelazadas entre ellas,
- La figura 4 es una vista esquemática de un dispositivo para formar la capa nanofibrilar de la membrana de

regeneración ósea de la figura 1,

- La figura 5 es un diagrama de flujo que ilustra las etapas de un método para formar la membrana de regeneración ósea de la figura 1,
- La figura 6 es una representación de la implementación de la membrana de regeneración ósea de la invención en cirugía ortopédica para consolidar una fractura ósea,
- Las figuras 7a y 7b son vistas microscópicas de sección transversal de un defecto de la bóveda craneal representativo cubierto durante cuatro semanas mediante la membrana de regeneración ósea biestratificada de la figura 1, siendo la figura 7a una sección del primer tercio del defecto mientras que la figura 7b es una sección del centro del defecto,
- La figura 8 es una vista microscópica de sección transversal del centro de un defecto de la bóveda craneal cubierto durante cuatro semanas con la membrana biestratificada de la figura 1,
- Las figuras 9a y 9b son vistas microscópicas de sección transversal de un defecto de la bóveda craneal representativo cubierto durante cuatro semanas mediante una membrana nanofibrilar individual,
- Las figuras 10a y 10b son vistas microscópicas de sección transversal de un defecto de la bóveda craneal representativo cubierto durante cuatro semanas con una membrana densa de PLA comercial, siendo la figura 10a una sección del primer tercio del defecto mientras que la figura 10b es una sección del centro del defecto,
- Las figuras 11a y 11b ilustran criosecciones histológicas de una membrana de ácido poliláctico-glicólico después de respectivamente once y veintiún días de cultivo de células madre mesenquimáticas humanas.

En las figuras, los mismos números de referencia se refieren a los mismos o similares elementos.

#### Descripción detallada de la invención

Las figuras 1, 2a y 2b representan una membrana de regeneración ósea biocompatible e implantable 1 adecuada para reparar un defecto óseo en el cuerpo de un paciente.

La membrana 1 es sustancialmente plana con un grosor comprendido entre 50  $\mu\text{m}$  y 2500  $\mu\text{m}$ , y es capaz además de deformarse y/o ser cortada para permitir a un cirujano colocar la membrana sobre el defecto óseo para conformar la membrana 1 de cualquier manera apropiada. La membrana ilustrada presenta un contorno poligonal, por ejemplo cuadrado. Sin embargo, dependiendo de la aplicación, la membrana de dimensiones adecuadas puede tener cualquier otro contorno, tal como rectangular, circular, elíptico u otro.

La membrana de regeneración ósea 1 comprende:

- una capa densa 2 que forma una capa de soporte que forma una barrera para células y tejidos blandos para impedir la migración celular desde tejidos conjuntivos, y que proporciona suficiente rigidez e inflexibilidad para mantener un espacio del defecto a reparar,
- una capa nanofibrilar 3 que forma una matriz sintética biomimética que proporciona a las células mesenquimáticas y óseas una estructura similar a las redes de colágeno nativas en su organización y propiedades para permitir la penetración, la migración y la diferenciación en osteoblastos de células mesenquimáticas y óseas, y para promover de este modo la consolidación ósea.

Tanto la capa densa 2 como la capa nanofibrilar 3 están compuestas por polímeros biodegradables y reabsorbibles bien conocidos, tales como policaprolactona, ácido poliláctico, ácido poliglicólico, policarbonato y mezclas de los mismos. Los polímeros reabsorbibles para la capa densa 2 y la capa nanofibrilar 3 pueden ser los mismos o dos polímeros diferentes.

La capa densa 2, de la cual una vista microscópica es visible en la figura 3a, es una película sustancialmente no porosa continua que tiene primera y segunda superficies que se extienden respectivamente en primera y segunda caras opuestas. En la realización ilustrada, la capa densa 2 tiene un grosor  $T_{dl}$  comprendido entre 20  $\mu\text{m}$  y 500  $\mu\text{m}$ , preferentemente entre 30  $\mu\text{m}$  y 70  $\mu\text{m}$ , más preferentemente entre 45  $\mu\text{m}$  y 55  $\mu\text{m}$ .

En cuanto a la porosidad, la capa densa 2 que se dice que es sustancialmente no porosa tiene una porosidad  $p_{dl}$  menor del 10%, preferentemente menor del 5%, estando la porosidad  $p_{dl}$  calculada mediante la ecuación:

$$p_{dl} = 1 - (W_{sdl} - (V_{sdl} \times d_{polímero\ dl}))$$

donde,  $W_{sdl}$  es el peso de una muestra de capa densa,

$V_{sdl}$  es el volumen de la muestra de capa densa,

$d_{polímero\ dl}$  es la densidad del polímero del que está hecha la capa densa.

Dicha capa densa 2 puede estar hecha mediante moldeo por colada de una película a temperatura ambiente.

Para hacer esto, en una primera etapa, una solución polimérica se prepara disolviendo el polímero reabsorbible en un disolvente orgánico apropiado, tal como cloroformo, para obtener una mezcla líquida. A continuación, en una

etapa posterior, la solución polimérica se aplica por colada sobre una superficie colectora formada por ejemplo sobre una placa hecha de vidrio o de Teflón, siendo la solución polimérica extendida a continuación sobre la superficie colectora mediante un aplicador de moldeo por colada de una película para formar una película. En esta etapa, el grosor de la película se establece entre 100  $\mu\text{m}$  y 400  $\mu\text{m}$ . La película se seca, por ejemplo se coloca debajo de una campana, de modo que el disolvente pueda evaporarse y el polímero reabsorbible pueda precipitar y solidificar.

La capa nanofibrilar 3 está unida a la primera superficie de la capa densa 2. Tal como puede verse en la figura 3b, la capa nanofibrilar 3 comprende fibras que tienen un diámetro de tamaño nanométrico, por ejemplo entre 100 nm y 1  $\mu\text{m}$ , especialmente entre 300  $\mu\text{m}$  y 800  $\mu\text{m}$ . La capa nanofibrilar tiene un grosor  $T_{nl}$  entre 30  $\mu\text{m}$  y 2000  $\mu\text{m}$ , preferentemente entre 100 y 500  $\mu\text{m}$ , más preferentemente entre 200  $\mu\text{m}$  y 300  $\mu\text{m}$ , especialmente entre 230  $\mu\text{m}$  y 270  $\mu\text{m}$ .

Para permitir que las células mesenquimáticas y óseas, tales como fibroblastos, que tienen un diámetro promedio entre 5  $\mu\text{m}$  y 10  $\mu\text{m}$ , penetren y migren al interior de la capa nanofibrilar 3, la capa nanofibrilar 3 presenta una red abierta formada por fibras entrelazadas y que presentan un tamaño de poro promedio mayor de 10  $\mu\text{m}$ .

La permeabilidad de la capa nanofibrilar resultante 3 puede evaluarse usando un método que aplica la ley de Darcy (MJ Grimm, JL Williams. "Measurements of permeability in human calcaneal trabecular bone". Journal of Biomechanics 1997; 7: 743-5; PW Hui, PC Leung, A Sher. "Fluid conductance of cancellous bone graft as a predictor for graft-host interface healing". Journal of Biomechanics 1996; 1: 123-32).

Un líquido es empujado a través de una muestra de capa nanofibrilar aplicando una presión constante. A partir del caudal inducido, la conductancia de fluido C puede evaluarse de la siguiente manera:

$$C = \Delta Q / \Delta P$$

donde,  $\Delta Q$  es un caudal de líquido a través de una muestra de capa nanofibrilar, estando dicho caudal determinado por la medida de un volumen de líquido que pasa a través de la muestra de capa nanofibrilar y recogido durante un intervalo de tiempo determinado ( $\text{m}^3 / \text{s}$ ), y

$\Delta P$  es la caída de presión a través de la muestra de capa nanofibrilar determinada por la diferencia entre las presiones en superficies opuestas de la muestra de capa nanofibrilar (Pa).

Aplicando la ley de Darcy a la muestra de capa nanofibrilar porosa, puede obtenerse la conductancia C como:

$$C = A \times \kappa / (L \times \mu)$$

donde A es un área de sección transversal de la muestra de capa nanofibrilar ( $\text{m}^2$ ),

$\kappa$  es la permeabilidad de la capa nanofibrilar ( $\text{m}^2$ ),

L es una longitud de la muestra de capa nanofibrilar (mm),

$\mu$  es una viscosidad cinemática de fluido del líquido (Pa x s).

Por lo tanto, la permeabilidad  $\kappa$  puede calcularse mediante la ecuación:

$$\kappa = \Delta Q \times L \times \mu / (\Delta P \times A).$$

La permeabilidad puede usarse para comparar la interconectividad de los poros de diferentes estructuras.

Ventajosamente, la capa nanofibrilar tiene una permeabilidad  $\kappa$  dentro del mismo intervalo que el del hueso trabecular, es decir entre  $0,4 \times 10^{-9} \text{ m}^2$  y  $11 \times 10^{-9} \text{ m}^2$ .

Una ilustración de la permeabilidad de la capa nanofibrilar a células se muestra como un ejemplo en las figuras 11a y 11b que ilustran criosecciones histológicas de membrana de nanofibras de ácido poliláctico-glicólico después de, respectivamente, once y veintiún días de cultivo de células madre mesenquimáticas humanas. La membrana era de  $1 \text{ cm}^2 \times 1 \text{ mm}$  de grosor y el diámetro medio de nanofibras era de 600 nm, siendo la densidad de siembra de las células de  $10^6$  hMSC. El tamaño de las células es de aproximadamente 10  $\mu\text{m}$ . En este ejemplo, se han sembrado células madre mesenquimáticas humanas de médula ósea sobre la membrana. Después de 11 y 21 días de cultivo, la tinción con azul de metileno indica claramente crecimiento celular y permeabilidad celular al interior de la membrana. Por lo tanto, este ejemplo ilustra que los espacios entre las nanofibras son suficientemente anchos para permitir el crecimiento celular hacia el interior y, por lo tanto, mayores de 10  $\mu\text{m}$ .

La capa nanofibrilar 3 es mucho menos densa que la capa densa 2 y presenta, a este respecto, una porosidad  $p_{nl}$  mayor del 90%, preferentemente sustancialmente del 95%. En cuanto a la capa densa 2, la porosidad  $p_{nl}$  de la capa nanofibrilar puede calcularse mediante la ecuación:

$$\rho_{nl} = 1 - (W_{sni} - (V_{sni} \times d_{polimero\ nl}))$$

donde,  $W_{sni}$  es el peso de una muestra de capa nanofibrilar,

$V_{sni}$  es el volumen de la muestra de capa nanofibrilar,

$d_{polimero\ nl}$  es la densidad del polímero del que está hecha la capa nanofibrilar.

En el ejemplo ilustrado, tal como se ilustra en la figura 3c, la capa nanofibrilar 3 es compuesta y comprende, además de las fibras, partículas 4 adaptadas para soportar la formación ósea distribuidas entre las fibras.

En un ejemplo particular, las partículas 4 son partículas de fosfato cálcico que comprenden beta-fosfato tricálcico, hidroxiapatita, carbonato de apatita o mezclas de los mismos. El tamaño de partículas de fosfato cálcico debe estar en el intervalo de 50  $\mu m$  a 1000  $\mu m$ , preferentemente de 100  $\mu m$  a 200  $\mu m$ . las partículas 4 son preferentemente esféricas para facilitar el flujo libre en el aire, tal como será evidente a partir de lo sucesivo de la descripción.

Además, la capa nanofibrilar 3 puede comprender además compuestos activos biológicos tales como factores de crecimiento, antibióticos u otros incorporados entre las fibras.

En referencia a la figura 4, se desvela un dispositivo 5 para fabricar la capa nanofibrilar 3.

El dispositivo 5 comprende un recipiente 6 que contiene una solución polimérica 7 obtenida mezclando el polímero reabsorbible del que está hecha la capa nanofibrilar con un disolvente orgánico, tal como cloroformo. El recipiente 6 está conectado a una boquilla 8 a través de una tubería 9, de modo que la solución polimérica 7 pueda suministrarse a la boquilla 8.

La boquilla 8 comprende un tubo cónico externo 10 que se extiende a lo largo de un eje longitudinal y que tiene un orificio de salida 11. Una aguja cónica central 12 es móvil a lo largo del eje longitudinal del tubo 10. Un pasaje 13 está definido entre el tubo externo 10 y la aguja 12. La solución polimérica puede ser transferida entonces hacia el orificio de salida 11 a través del pasaje 13. El aspecto cónico del tubo externo 10 y la aguja 12 es tal que la aguja 12, moviéndose longitudinalmente, ajusta el tamaño del orificio de salida 11.

El tamaño del orificio de salida puede definirse mediante la distancia  $d$  entre la punta de la aguja y el extremo del tubo externo, donde  $d$  es positiva, por convención, cuando la cúspide de la aguja está dentro del tubo externo 10.

Un tubo 16 conduce un chorro de gas, típicamente aire comprimido a una presión de 3 bares a 6 bares, hacia el exterior del orificio de salida 11. Aunque otras configuraciones son posibles, en la realización ilustrada, el tubo 16 y la boquilla 8 forman un ángulo agudo de modo que el chorro de gas crea una presión negativa en el orificio de salida 11. Al crear la presión negativa, el chorro de gas bombea la solución polimérica desde el recipiente 6 a la boquilla 8 donde es difractado mediante la cooperación del tubo externo 10 con la aguja 12 y proyectado sobre una superficie colectora 17 dispuesta a una distancia  $D$  del orificio de salida 11.

En la realización ilustrada, el dispositivo 5 comprende además un dispositivo de pulverización 20 para proyectar las partículas de fosfato cálcico 4 sobre la superficie colectora 17. Las partículas de fosfato cálcico 4 están suspendidas mediante la presión del aire  $P$ , mostrada mediante una flecha, en un recipiente 21. Un tubo 22 adaptado para transportar las partículas de fosfato cálcico 4 a su través se extiende desde el recipiente 21 hasta una boquilla 23 a través de la cual las partículas de fosfato cálcico 4 son proyectadas a la superficie colectora 17. Ambas boquillas para solución polimérica 7 y partículas de fosfato cálcico 4 están dispuestas para estar dirigidas al mismo punto en la superficie colectora 17.

Un método para formar la membrana de regeneración ósea desvelada anteriormente 1 se desvela a continuación en relación con el diagrama de flujo ilustrado en la figura 5.

Tal como puede verse en la parte izquierda del diagrama de flujo, la capa densa 2 se ha preparado mediante moldeo por colada de una película tal como se ha desvelado anteriormente con las etapas:

- S11 en la que el polímero reabsorbible del que está hecha la capa densa 2 se disuelve en el disolvente para obtener la solución polimérica,
- S12 en la que la solución polimérica se aplica por colada y se extiende sobre la superficie colectora,
- S13 en la que el disolvente se evapora y el polímero reabsorbible precipita y se solidifica.

Un método para preparar la capa nanofibrilar 3 que implementa el dispositivo desvelado anteriormente 5 se representa en la parte derecha del diagrama de flujo de la figura 5.

En una primera etapa S21, la solución polimérica 7 se prepara disolviendo el polímero reabsorbible con el disolvente apropiado, por ejemplo cloroformo. En una realización particular, los compuestos activos biológicos tales como factores de crecimiento, antibióticos u otros pueden introducirse en esa etapa en la solución polimérica.



En una etapa posterior S22, a temperatura ambiente, se aplica un flujo de aire dentro del tubo 16 para crear una presión negativa en el orificio de salida 11 de la boquilla 8 que bombea la solución polimérica desde el depósito 6 y a través de la tubería 9 para alimentar la boquilla 8 y proyectar un chorro de solución polimérica desde el orificio de salida 11 de la boquilla 8. Los compuestos activos biológicos son proyectados al mismo tiempo, a temperatura ambiente, junto con la solución polimérica. La proyección de la solución polimérica por el flujo de aire provoca una rápida evaporación de una parte del disolvente y, de este modo, inicia la precipitación de la solución polimérica en fibras de tamaño nanométrico.

Tal como se muestra en la figura 5, en la etapa S22, de forma concomitante con la etapa de proyectar la solución polimérica, las partículas de fosfato cálcico 4 pueden pulverizarse hacia la primera superficie de la capa densa 2 desde un recipiente donde se introduce aire para crear un efecto Venturi. La dispersión de partículas 4 en aire se extiende junto con la solución polimérica. Las partículas de fosfato cálcico 4 son retenidas por las fibras a medida que el polímero se seca.

Las partículas de fosfato cálcico 4 son proyectadas simultáneamente con la solución polimérica 7 usando el dispositivo de pulverización. Ambas boquillas de pulverización para solución polimérica 7 y partículas de fosfato cálcico 4 están alineadas al mismo punto en la superficie colectora 17. Las partículas de fosfato cálcico 4 son suspendidas por la presión del aire en el recipiente 21, transportadas a través del tubo 22 y proyectadas a la superficie colectora 17 a través de la boquilla 23.

En la etapa S23, la solución polimérica se seca a continuación por ejemplo a través de secado al vacío para evaporar el disolvente restante y para obtener la capa nanofibrilar. A medida que las fibras de tamaño nanométrico se solidifican mediante evaporación del disolvente, las partículas de fosfato cálcico 4 quedan atrapadas dentro de las fibras entrelazadas.

En una realización, la superficie colectora 17 puede ser la primera superficie de la capa densa 2 sobre la cual se proyecta directamente la solución polimérica. En este caso, las fibras se depositan directamente sobre la primera superficie de la capa densa 2. La presencia de disolvente residual permite a las fibras formar puentes de hidrógeno que unen firmemente las fibras entre sí y a la primera superficie de la capa densa 2 a medida que el disolvente residual se evapora y el polímero del que está hecha la capa nanofibrilar precipita y solidifica. Esto proporciona una membrana que tiene resistencia de adhesión y resistencia a torsión y al alargamiento mejorados. En este caso, la etapa S3 de unir la capa nanofibrilar 3 a la capa densa 2 se realiza al mismo tiempo que la etapa S23 de secar la capa nanofibrilar 3.

En una variante, en lugar de proyectar la solución polimérica destinada a formar la capa nanofibrilar y, donde sea apropiado, de pulverizar las partículas 4 directamente sobre la capa densa 2, la solución polimérica y posiblemente las partículas 4 se proyectan sobre una superficie colectora diferente 17. La capa nanofibrilar 3 se forma de este modo aparte de la capa densa 2.

En la etapa S12 de extender la solución polimérica destinada a formar la capa densa 2 sobre la superficie colectora, la capa nanofibrilar 3 puede ponerse en contacto con la primera superficie de la capa densa 2 que contiene disolvente residual. Un rodillo puede aplicarse a las burbujas de aire entre la capa densa 2 y la capa nanofibrilar 3. A medida que la capa densa 2 se seca, el disolvente se evapora y el polímero del que está hecha la capa densa 2 precipita y solidifica. Se forman puentes de hidrógeno entre la capa nanofibrilar 3 y la capa densa 2 permitiendo una unión firme de la capa nanofibrilar 3 a la primera superficie de la capa densa 2. En este caso, la etapa S3 de unir la capa nanofibrilar 3 a la capa densa 2 se realiza al mismo tiempo que la etapa S12 de moldear por colada una película y extender la solución polimérica de la capa densa.

La invención no está limitada a las etapas desveladas anteriormente S3 de unir la capa densa y la capa nanofibrilar. Estas capas pueden unirse entre sí de cualquier manera adecuada después de haberse formado por separado, tal como se ilustra en la figura 5.

Las membrana de regeneración ósea biestratificada resultante puede cortarse a continuación en la forma y dimensión deseada (etapa S4) y secarse al vacío (etapa S5) si fuera necesario. La membrana de regeneración ósea puede esterilizarse a continuación (etapa S7), por ejemplo mediante irradiación con rayos gamma, posiblemente después de haber sido envasada (etapa S6).

Aunque sin limitarse a esto, la membrana de regeneración ósea es adecuada para uso en odontología para cirugías dental y maxilofacial.

En cirugía posterior a la extracción, la membrana puede usarse para aislar el alveolo dental después de la extracción, facilitar la hemostasia y las suturas y promover el crecimiento óseo mientras se mantienen los volúmenes de las tablas alveolares interna y externa.

En cirugía periodontal, la membrana puede usarse para rellenar lesiones óseas periodontales después del tratamiento del foco de infección.

En cirugía de implante, para cirugía previa al implante, durante injertos sinusales, la membrana de regeneración ósea puede colocarse para obturar la membrana de Schneider o para protegerla de la tensión física de los biomateriales. La membrana de regeneración ósea también puede colocarse para obturar la abertura ósea en la pared lateral del seno. En la técnica de Summers, la membrana de regeneración ósea puede colocarse en el vértice del implante para aislar a la membrana del seno y promover la aparición de hueso cortical.

Durante la corrección de defectos óseos, la membrana puede usarse para cubrir biomateriales rellenando un defecto alveolar, para cubrir y aislar autoinjerto por aposición o para aislar y regenerar ubicaciones de toma de muestras.

Durante la colocación de implantes, la membrana puede usarse para cubrir hebras expuestas en el caso de dehiscencia o fenestración ósea durante la cirugía.

Tal como puede verse en la figura 1, el dispositivo se implanta fácilmente en defectos dentales con la capa densa 2 en contacto con tejido gingival GT y la capa nanofibrilar compuesta 3 en contacto con tejido óseo BT. La membrana implantable se sutura a tejido conectivo y se sujeta con clavijas al hueso o se fija con cola médica.

Después de la implantación, la capa nanofibrilar compuesta estimula la migración de células mesenquimáticas y óseas humanas al defecto y la producción de colágeno mineralizado.

Dependiendo de la composición y el peso molecular del polímero, se obtienen diferentes tiempos de degradación. El tiempo de degradación óptimo debe coincidir con la velocidad de formación de tejido óseo. Los polímeros de los que están hechas la capa densa 2 y la capa nanofibrilar 3 se degradan mediante hidrólisis, y los fragmentos resultantes se degradan mediante fagocitosis por macrófagos. En particular, la capa nanofibrilar se degrada rápidamente por fagocitosis. La hidrólisis de la capa nanofibrilar es también rápida gracias a su porosidad y su superficie de intercambio con los fluidos corporales. A medida que las fibras de la capa nanofibrilar se degradan, partículas de fosfato cálcico 4 soportan el crecimiento de tejido óseo por osteoconducción.

Sin embargo, la invención también puede ser de interés en otras aplicaciones tales como cirugía ortopédica. A este respecto, la figura 6 ilustra una membrana de regeneración ósea 1 dimensionada y conformada para consolidar una fractura ósea 26 del fémur 25. La membrana de regeneración ósea 1 se enrolla alrededor de la fractura 26 del fémur 25 con la capa nanofibrilar 3 dirigida hacia el fémur 25.

## Ejemplos

### Materiales

#### Membrana biestratificada

Poli ( $\epsilon$ -Caprolactona) (PCL, peso molecular 80000 g/mol) y copolímero de poli DL-lactido/glicolido (PLGA, 50/50 relación molar, viscosidad inherente 0,4 dl/g) se adquirieron respectivamente de Solvay Caprolactones (Warrington, Reino Unido) y Purac biomaterials (Gorinchem, Países Bajos). Cloroformo de calidad analítica se obtuvo de MP Biochemicals (Eschwege, Alemania). Metacrilato de glicol y formaldehído se adquirieron de Sigma Chem. corp. (St. Louis, estados Unidos de América). Estos productos químicos se usaron tal como se recibieron. El sistema de proyección estaba basado en el método y dispositivo desvelado anteriormente.

La capa nanofibrilar se produjo de acuerdo con el método desvelado anteriormente. PCL o PLGA se disolvieron en cloroformo a una concentración de, respectivamente, 0,1033 g/ml y 0,25 g/ml. La solución se pulverizó sobre una rejilla metálica distante a 30,65 cm usando una presión del aire de 7 bares. La apertura de pulverización para PCL era de -0,54 mm y de -0,64 mm para PLGA. Se realizaron dos pulverizaciones sucesivas de 1 minuto para crear la capa, que posteriormente se retiró de la rejilla.

Partículas de fosfato tricálcico se producen mediante precipitación a partir de soluciones de calcio y fosfato a pH 9-10. Las partículas se pulverizan, se secan al aire y se sinterizan a 1050°C durante 5 horas. Las partículas se tamizan entre 100  $\mu$ m y 200  $\mu$ m y son de forma esférica. Las partículas se colocan en un aparato de limpieza con abrasivos y se pulverizan con una presión del aire de 6 bares. Al mismo tiempo, se depositan nanofibras desde una solución polimérica usando una presión del aire de 7 bares, tal como se ha descrito anteriormente. Las nanofibras retienen a las partículas de fosfato cálcico formando una malla no tejida compuesta. El contenido mineral en la capa de nanofibras compuesta está comprendido entre el 10% en peso y el 70% en peso.

Se creó una película densa de PCL usando un aplicador de moldeo por colada de una película. Una solución de PCL en cloroformo (0,1033 g/ml) se depositó sobre una placa de vidrio y se procesó con el aplicador de la película ajustado a un grosor de 100  $\mu$ m. Se dejó evaporar a la película lentamente en una campana extractora de humos y el nivel de evaporación se evaluó visualmente cada 5 minutos.

Una vez que la evaporación del disolvente estaba casi completa, la película colada de PCL se cubrió con la capa

nanofibrilar biomimética. Las membranas completas se dejaron a continuación bajo una campana extractora hasta la evaporación completa del disolvente. Después de retirarla de la placa de vidrio, las membranas biestratificadas se colocaron en un secador al vacío durante una noche.

La morfología general de cada capa de membrana se investigó usando un microscopio electrónico de barrido (SEM, Leo 1450VP, Karl Zeiss SMT, Oberkochen, Alemania). Todas las muestras se sometieron a pulverización catódica con oro antes de la observación (Desk III, Denton vacuum, Moorestown, EE. UU.). Los diámetros de la fibra y la distribución de las capas nanofibrilares se midieron con un programa diseñado específicamente basado en el software de análisis de imágenes Quantimet Q550 (Leica, Wetzlar, Alemania). Después de umbralizar las imágenes de SEM, el software detectó el eje longitudinal de cada fibra y calculó el diámetro de la fibra a partir de vectores dibujados perpendiculares a ese eje. Para cada muestra, se analizaron nueve fotos de SEM, tomadas aleatoriamente a tres aumentos diferentes (1000, 2500, 5000 X). Para cada fibra, se seleccionaron tres diámetros a lo largo de la fibra y se obtuvieron, como promedio, aproximadamente 460 valores para cada muestra pulverizada a chorro. A partir de estos datos, el diámetro promedio y la distribución se calcularon para cada muestra y las distancias intercentiles 1-99% se usaron para caracterizar el intervalo de distribución de la fibra.

El tamaño y el grosor de membranas y capas individuales se midieron usando un calibre en tres ubicaciones diferentes.

La densidad de la membrana ( $\text{mg/cm}^2$ ) se obtuvo pesando una membrana de 1 cm x 1 cm mientras que la porosidad promedio (%) de las capas nanofibrilares se evaluó a partir del peso seco y volumen seco de muestras cilíndricas de capas nanofibrilares (12 mm de diámetro y grosores variables).

La permeabilidad de las capas nanofibrilares se evaluó tal como se ha descrito anteriormente usando agua pura empujada a través de las capas nanofibrilares aplicando una presión constante. Se mide el caudal, a partir del cual puede deducirse el valor de la permeabilidad. Muestras cilíndricas de capas nanofibrilares (12 mm de diámetro y grosores variables) se colocaron entre 2 tubos de poliestireno (8 mm de diámetro interno y 30 mm de largo) y se sellaron herméticamente enrollando Parafilm alrededor de la interfaz de los tubos. Los tubos de poliestireno se conectaron a continuación a un depósito de agua desmineralizada mediante un tubo de caucho (diámetro interno 10 mm). La diferencia del nivel de agua entre el depósito y la muestra correspondía a 0,58 m. Suponiendo que la presión en la superficie inferior de las muestras es igual a cero, la presión generada por el nivel del agua era de 5,69 kPa. Para mantener la diferencia de presión aproximadamente constante durante el experimento, el volumen de flujo se restringió a 100 ml. Un volumen de 100 ml habría reducido el nivel de agua en el depósito en 7,1 mm, correspondiente a una caída de presión despreciable del 0,5%. El flujo inducido se dedujo a partir del volumen de agua recogido durante cierto intervalo de tiempo.

#### Defecto de la bóveda craneal de conejos

##### Animales

Este estudio ha sido aprobado por el *Local Ethical Committee for Animal Care* [Comité ético local para el cuidado de animales] (Universidad de Nantes, Francia). Dieciséis conejos New Zealand White (NZW) hembra, de aproximadamente 4 meses de edad, con un peso de aproximadamente 3,5 kg, se adquirieron de Grimaud (Francia). Los animales se alojaron en jaulas individuales que medían 75 x 47 x 40 cm en la unidad de tecnología experimental (UET, Nantes). Los conejos fueron alimentados diariamente con alimento granular (35 g/kg de peso corporal) y agua *ad libitum*. Las directrices nacionales para el cuidado y uso de animales de laboratorio se observaron estrictamente. Los materiales se implantaron en conejos New Zealand White hembra durante un periodo de seguimiento de 4 y 10 semanas.

##### Procedimiento quirúrgico

Ocho conejos fueron anestesiados mediante inyección intramuscular de ketamina (rompun 2%) y xilazina (imalgene) (respectivamente 0,25 mg/kg y 0,35 ml/kg de peso corporal). La zona de implantación (bóveda craneal) se afeitó y se desinfectó con yodo (2% en alcohol al 50%). Se realizó una incisión en forma de u en la bóveda craneal, desde cada oreja hacia atrás hasta la zona de seno en delante. La piel se levantó para mostrar el periostio al que se le practicó una incisión siguiendo un patrón en u similar. Se realizaron cuatro defectos óseos de 8 mm colocados como una cruz en la bóveda craneal usando un trépano. Se tuvo especial cuidado de no perforar la dura madre cerebral. Los defectos creados se cubrieron con las diferentes membranas, cortadas en cuadrados de 1 x 1 cm. La capa biomimética nanofibrilar de las membranas biestratificadas estaba orientada hacia el lado del cerebro del defecto. Las cuatro esquinas de cada membrana aplicada se encolaron con cola Cyanolite a los bordes del defecto antes de cerrar de nuevo el periostio con suturas no reabsorbibles 4/0. La piel se suturó con suturas 3-0 Vicryl. Después de la cirugía, se inyectó un medicamento antibiótico por vía intramuscular.

##### Implantes

Cuatro membranas biestratificadas de PCL, cuatro capas biomiméticas nanofibrilares individuales de PCL y cuatro

capas biomiméticas nanofibrilares individuales de PLGA se implantaron para cada punto temporal (4 y 10 semanas). Una membrana sintética densa comercial compuesta por ácido poliláctico también se incluyó en el estudio (n es tres para cada tiempo de implantación). Además, dos defectos se dejaron vacíos como control negativo para cada periodo de implantación. Cada tipo de implante no se aplicó nunca dos veces en la misma posición de defecto en la bóveda craneal.

#### Análisis de implantes recuperados

Los conejos fueron sacrificados después de 4 y 10 semanas mediante inyección intracardiaca de pentobarbital, después de anestesia. Después de la recuperación de las bóvedas craneales (cortadas con una sierra), los implantes y el hueso circundante se procesaron de acuerdo con los procedimientos operativos convencionales para histología. Los bloques se sumergieron en formaldehído al 10%, se deshidrataron en una serie graduada de etanol y se incluyeron en metacrilato de glicol (MMA). Después de la polimerización, cada uno de cuatro defectos de la bóveda craneal se cortó dos veces longitudinalmente usando un micrótopo con sierra de diamante (Leica, Rijswijk) y se tiñeron con azul de metileno y fucsina básica. Las partes restantes de las secciones transversales se pulieron y se recubrieron mediante pulverización catódica con oro usando un aparato Cressington 108 auto antes del análisis con un microscopio electrónico Leo 1450 VP usando el modo de electrones retrodispersados (BSE).

#### **Resultados**

##### Caracterización de membranas de GBR biomiméticas

Las membranas de GBR sintéticas, biestratificadas o monoestratificadas y compuestas por PCL o PLGA, se produjeron fácil y rápidamente mediante pulverización de polímero. Podían producirse cuadrados de 10 x 10 cm en diez minutos. Macroscópicamente, la superficie de las membranas era homogénea y lisa (figuras 2a y 2b). No se observó delaminación entre las dos capas durante la manipulación. El grosor de la membrana se distribuía de forma homogénea y variaba entre  $473 \pm 3 \mu\text{m}$  para membranas biestratificadas (incluyendo una película polimérica densa de  $79 \pm 1 \mu\text{m}$ ) y  $394 \pm 3 \mu\text{m}$  para membranas monoestratificadas compuestas por nanofibras. La densidad de las membranas era de  $12,7 \text{ mg/cm}^2$  mientras que la porosidad de la capa nanofibrilar era sustancialmente del 95%, es decir del  $94,4 \pm 0,4 \%$ .

De conformidad con la elevada porosidad de las capas nanofibrilares, las fibras enredadas dieron como resultado una estructura altamente abierta con muy buena interconexión entre poros. El coeficiente de permeabilidad de las estructuras ( $\kappa$ ), calculado a partir de la conductancia de agua de las capas nanofibrilares, confirmaba una estructura altamente permeable.  $\kappa$  estaba comprendida entre  $1 \times 10^{-9} \text{ m}^2$  y  $4 \times 10^{-9} \text{ m}^2$ , en particular entre  $1 \text{ m}^2$  y  $3,7 \times 10^{-9} \text{ m}^2$  con un valor promedio de sustancialmente  $2 \times 10^{-9} \text{ m}^2$ , es decir  $1,98 \pm 0,78 \times 10^{-9} \text{ m}^2$ . Estos valores están dentro del intervalo del hueso trabecular humano ( $0,4\text{-}11 \times 10^{-9} \text{ m}^2$ ).

Microscópicamente, la capa biomimética estaba compuesta por nanofibras enredadas comprendidas entre 289 y 1282 nm, con un diámetro promedio de 608 nm (figura 3b). En cambio, la capa densa de PCL era lisa y uniforme (figura 3a).

##### Eficacia biológica de membranas de GBR biomiméticas

Las membranas eran fáciles de manipular, de cortar con tijeras y de aplicar sobre los defectos óseos. Posiblemente debido a su estructura nanofibrilar y, por lo tanto, altamente abierta, los implantes parecían fluidos fisiológicos hemostáticos y absorbidos fácilmente. Como resultado, se adherían al borde del defecto una vez en posición pero podían retirarse, no obstante, y recolocarse en caso necesario. Las membranas biestratificadas eran suficientemente flexibles para cubrir los defectos de la bóveda craneal convexos sin necesidad de fijación con Cyanolite. En cambio, las membranas comerciales densas de PLA eran más rígidas y necesitaban fijación para cubrir completamente los defectos en todos los bordes.

Después de 4 semanas de implantación, todas las membranas eran bien toleradas y no era visible ningún signo de infección. Las diferentes implantes proporcionaban niveles distintos de reparación ósea, mientras que los defectos que se dejaron vacíos (controles negativos) no mostraban formación ósea. Tal como puede verse en las figuras 7a y 7b donde el hueso está especificado con +, mientras que \* y # respectivamente indican las capas densa y nanofibrilar, los bordes del defecto están delimitados con líneas negras y el alcance del crecimiento óseo con líneas grises, las membranas de PCL biestratificadas inducían la formación de una nueva capa ósea gruesa y madura, que crece de forma centrípeta a partir del borde del defecto. Hueso recién formado que formaba puentes cruzando el defecto era visible en una sección transversal realizada en un tercio del defecto (figura 7a) mientras que una sección en el centro (figura 7b) mostraba una formación ósea inferior.

La figura 8 es una sección transversal media del defecto de la bóveda craneal cubierto durante cuatro semanas con la membrana. El hueso se especifica con +, mientras que \* y # respectivamente indican las capas densa y nanofibrilar, los bordes del defecto están delimitados con líneas rojas y las flechas muestran la formación ósea dentro de la capa nanofibrilar. La capa nanofibrilar asociada con la película densa aparecía bien reconocida como

una matriz extracelular biomimética para células precursoras óseas y óseas. De hecho, se observó formación ósea dentro de la red nanofibrilar, lo que indicaba que las células penetraban en y usaban la estructura como plantilla para la deposición de matriz mineralizada.

- 5 Tal como puede verse en la figuras 9a y 9b donde # indica la capa nanofibrilar y los bordes del defecto están delimitados con líneas negras y el alcance del crecimiento óseo con líneas grises, la implantación de membranas monoestratificadas compuestas por una capa nanofibrilar individual indicaba claramente la importancia de la capa polimérica densa para la formación ósea. Sin el soporte mecánico de la capa densa, la membrana nanofibrilar penetraba dentro del espacio del defecto, impidiendo por lo tanto probablemente una formación ósea eficiente.
- 10 Además, ninguna formación ósea era visible dentro de la red nanofibrilar, lo que subraya además el efecto beneficioso de la capa densa. Impidiendo la infiltración fibroblástica desde el lado de la piel del defecto dentro de la capa biomimética, la capa densa permite la colonización de las nanofibras por osteoblastos y células precursoras óseas.
- 15 Las figuras 10a y 10b son vistas microscópicas de sección transversal del defecto de la bóveda craneal cubierto durante cuatro semanas mediante una membrana densa de PLA comercial, tomadas en el primer tercio del defecto (figura 10a) y en el centro del defecto (figura 10b). El hueso se especifica con +, mientras que # indica la membrana de PLA. Los bordes del defecto están delimitados con líneas negras y el alcance del crecimiento óseo con líneas grises. En comparación con membranas biestratificadas, las membranas densas de PLA comerciales proporcionaban un nivel más bajo de formación ósea. De hecho, las secciones transversales a niveles similares del defecto indicaban un hueso recién formado más fino, sin la formación de puentes completos. Además, las secciones transversales en el centro de los defectos indicaban una menor cantidad de crecimiento óseo centrípeto. Aunque la membrana probablemente impedía la invasión fibroblástica dentro del espacio del defecto, es probable que la falta de una estructura biomimética adecuada que soporte la invasión de células óseas redujera la formación ósea.
- 20
- 25

## REIVINDICACIONES

1. Membrana de regeneración ósea (1) que comprende:
  - una capa densa (2) hecha de polímero reabsorbible, teniendo dicha capa densa (2) primera y segunda superficies opuestas y estando adaptada para formar una barrera para células y tejidos blandos,
  - una capa nanofibrilar (3) hecha de polímero reabsorbible y unida a la primera superficie de la capa densa (2), comprendiendo dicha capa nanofibrilar fibras que tienen un diámetro de tamaño nanométrico, estando dichas fibras entrelazadas para presentar un tamaño de poro promedio mayor de  $10\ \mu\text{m}$  para permitir permeabilidad celular y regeneración de tejido óseo, teniendo la capa nanofibrilar (3) una permeabilidad  $\kappa$  entre  $0,4 \times 10^{-9}\ \text{m}^2$  y  $11 \times 10^{-9}\ \text{m}^2$ , preferentemente entre  $1 \times 10^{-9}\ \text{m}^2$  y  $4 \times 10^{-9}\ \text{m}^2$ , en particular sustancialmente de  $2 \times 10^{-9}\ \text{m}^2$ .
2. Membrana de regeneración ósea (1) de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la capa nanofibrilar (3) tiene una porosidad  $p_{\text{nl}}$  mayor del 90%, preferentemente sustancialmente del 95%.
3. Membrana de regeneración ósea (1) de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, en la que la capa densa (2) es una película sustancialmente no porosa.
4. Membrana de regeneración ósea (1) de acuerdo con la reivindicación 3, en la que la capa densa (2) tiene una porosidad  $p_{\text{dl}}$  menor del 10%, preferentemente menor del 5%.
5. Membrana de regeneración ósea (1) de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la capa densa (2) y la capa nanofibrilar (3) están unidas entre sí mediante puentes de hidrógeno.
6. Membrana de regeneración ósea (1) de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la capa densa (2) tiene un grosor comprendido entre  $30\ \mu\text{m}$  y  $70\ \mu\text{m}$ , preferentemente entre  $45\ \mu\text{m}$  y  $55\ \mu\text{m}$ , y la capa nanofibrilar tiene un grosor comprendido entre  $200\ \mu\text{m}$  y  $300\ \mu\text{m}$ , preferentemente entre  $230\ \mu\text{m}$  y  $270\ \mu\text{m}$ .
7. Membrana de regeneración ósea (1) de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que la capa nanofibrilar (3) es compuesta e incorpora partículas (4) adaptadas para soportar la formación ósea, estando dichas partículas (4) distribuidas entre las fibras.
8. Membrana de regeneración ósea (1) de acuerdo con la reivindicación 7, en la que las partículas (4) son partículas de fosfato cálcico.
9. Método para formar una membrana de regeneración ósea (1), que comprende las etapas de:
  - formar, a temperatura ambiente, una capa densa (2) hecha de polímero reabsorbible, teniendo dicha capa densa (2) primera y segunda superficies opuestas y estando adaptada para formar una barrera para células y tejidos blandos,
  - formar, a temperatura ambiente, una capa nanofibrilar (3) hecha de polímero reabsorbible, comprendiendo dicha capa nanofibrilar (3) fibras que tienen un diámetro de tamaño nanométrico, comprendiendo la etapa de formar la capa nanofibrilar (3) las etapas de:
    - mezclar el polímero reabsorbible con un disolvente para obtener una solución polimérica,
    - alimentar una boquilla pulverizadora (8) con dicha solución polimérica,
    - proyectar dicha solución polimérica a través de dicha boquilla (8) con un chorro de gas adaptado para bombear la solución polimérica mediante presión negativa, en la que el polímero reabsorbible proyectado precipita y solidifica por evaporación del disolvente para formar las fibras entrelazadas para presentar un tamaño de poro promedio mayor de  $10\ \mu\text{m}$  para permitir permeabilidad celular y regeneración de tejido óseo, teniendo la capa nanofibrilar (3) una permeabilidad  $\kappa$  entre  $0,4 \times 10^{-9}\ \text{m}^2$  y  $11 \times 10^{-9}\ \text{m}^2$ , preferentemente entre  $1 \times 10^{-9}\ \text{m}^2$  y  $4 \times 10^{-9}\ \text{m}^2$ , en particular sustancialmente de  $2 \times 10^{-9}\ \text{m}^2$ ,
    - depositar las fibras sobre una superficie colectora (17),
  - unir, a temperatura ambiente, dicha capa nanofibrilar (3) a la primera superficie de la capa densa (2).
10. Método de acuerdo con la reivindicación 9, en el que la etapa de formar la capa densa (2) comprende las etapas de:
  - mezclar el polímero reabsorbible con un disolvente para obtener una solución polimérica,
  - aplicar por colada dicha solución polimérica sobre una superficie colectora,
  - extender dicha solución polimérica sobre la superficie colectora, en la que el polímero reabsorbible colado y extendido precipita y solidifica por evaporación del disolvente para formar una película sustancialmente no porosa.
11. Método de acuerdo con la reivindicación 10, en el que la capa nanofibrilar (3) se deposita sobre la primera superficie de la capa densa (2) como superficie colectora durante la etapa de extender la solución polimérica,

comprendiendo la etapa de unir la capa nanofibrilar (3) a la primera superficie de la capa densa (2), la formación de puentes de hidrógeno a medida que el polímero del que está hecha la capa densa (2) precipita y solidifica por evaporación del disolvente.

5 12. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 y 10, en el que en la etapa de proyectar la solución polimérica, la solución polimérica se proyecta directamente sobre la primera superficie de la capa densa (2), y en la etapa de depositar las fibras, las fibras se depositan directamente sobre la primera superficie de la capa densa (2) como superficie colectora, comprendiendo la etapa de unir la capa nanofibrilar (3) a la primera superficie de la capa densa (2), la formación de puentes de hidrógeno a medida que el polímero del que está hecha la capa nanofibrilar  
10 (3) precipita y solidifica por evaporación del disolvente.

13. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, en el que la etapa de formar una capa nanofibrilar (3) comprende además, en la etapa de proyectar la solución polimérica, pulverizar partículas (4) adaptadas para soportar la formación ósea.  
15

14. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 13, que comprende además una etapa de esterilizar la membrana de regeneración ósea (1).

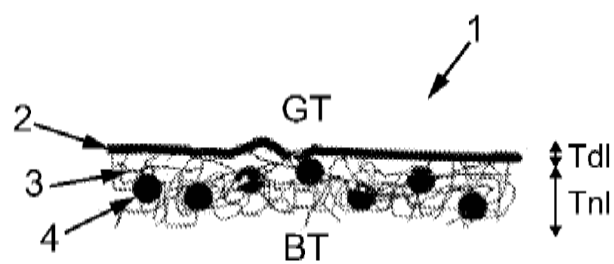


FIG. 1

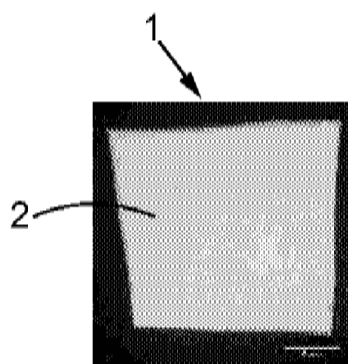


FIG. 2a

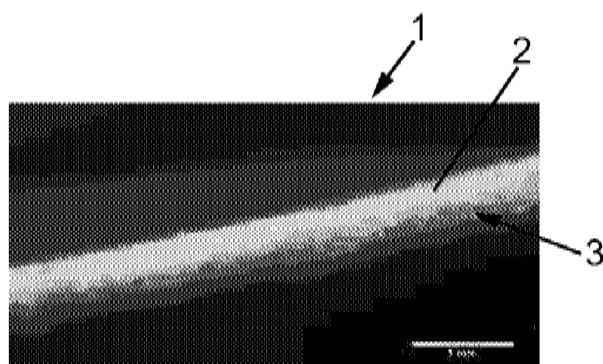


FIG. 2b

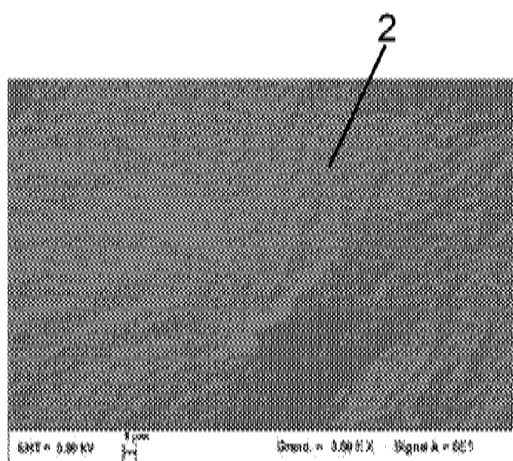
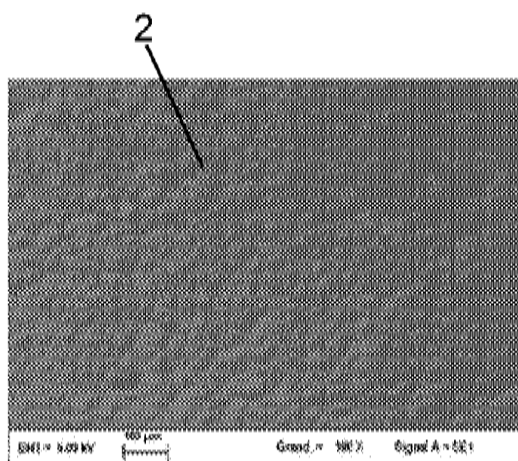
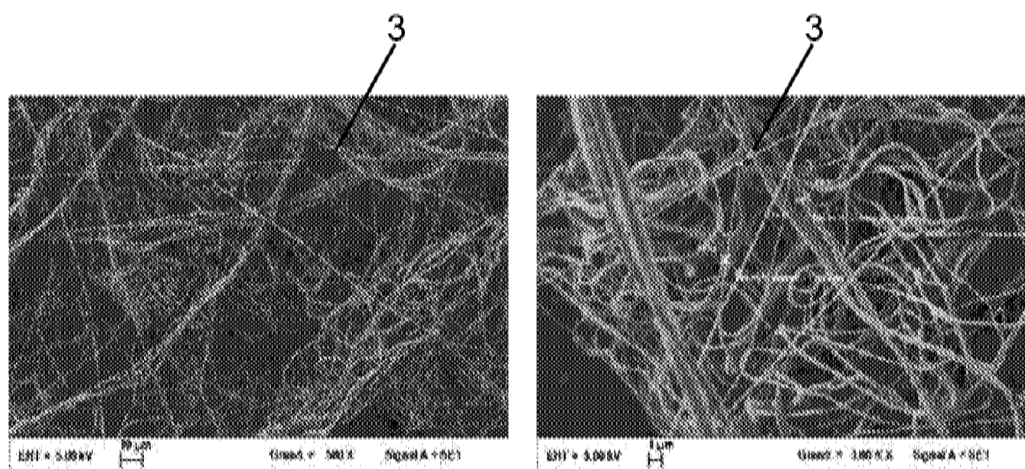
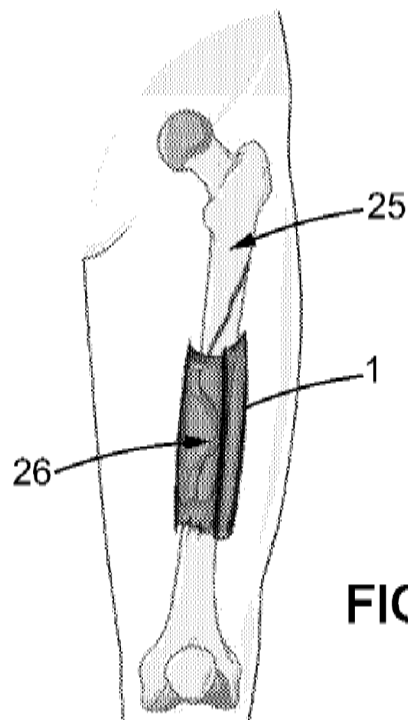


FIG. 3a

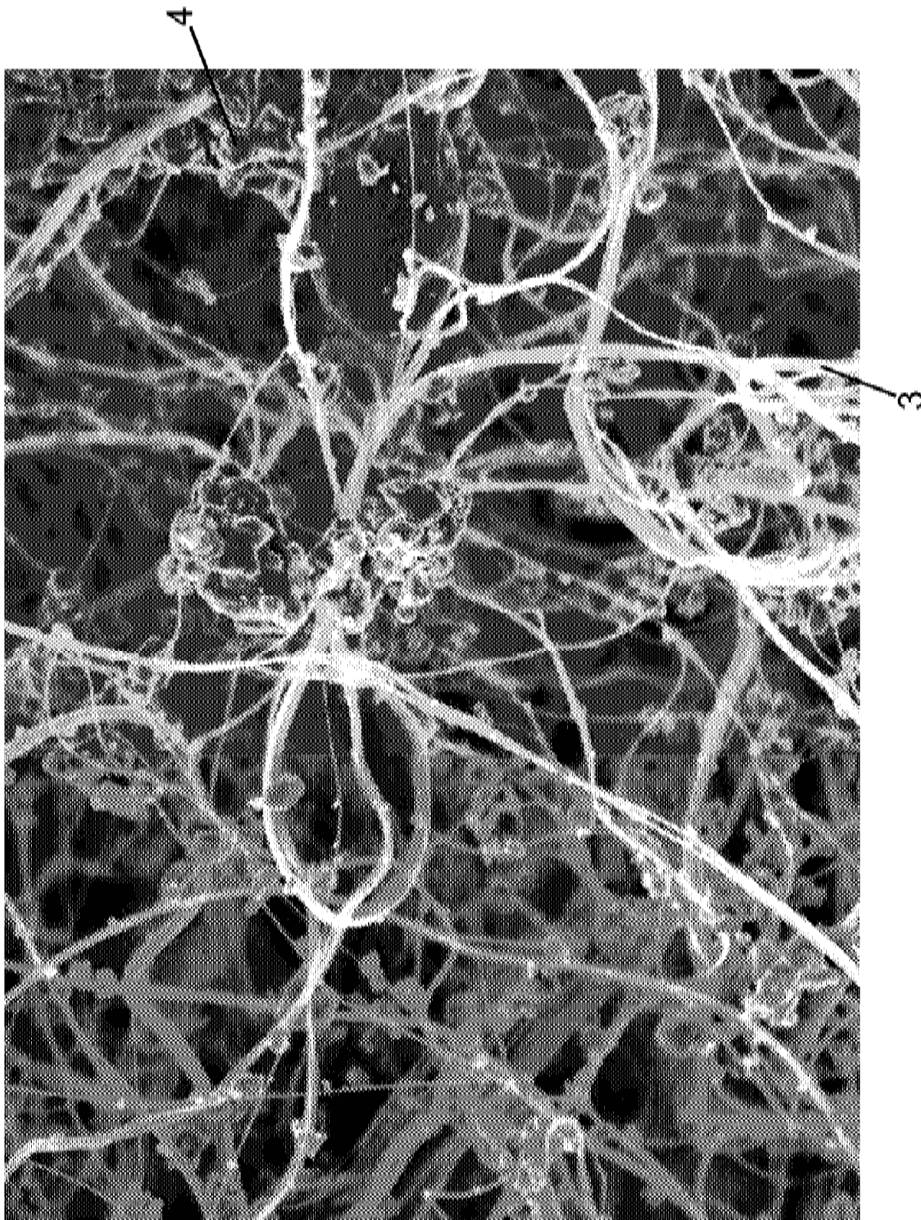




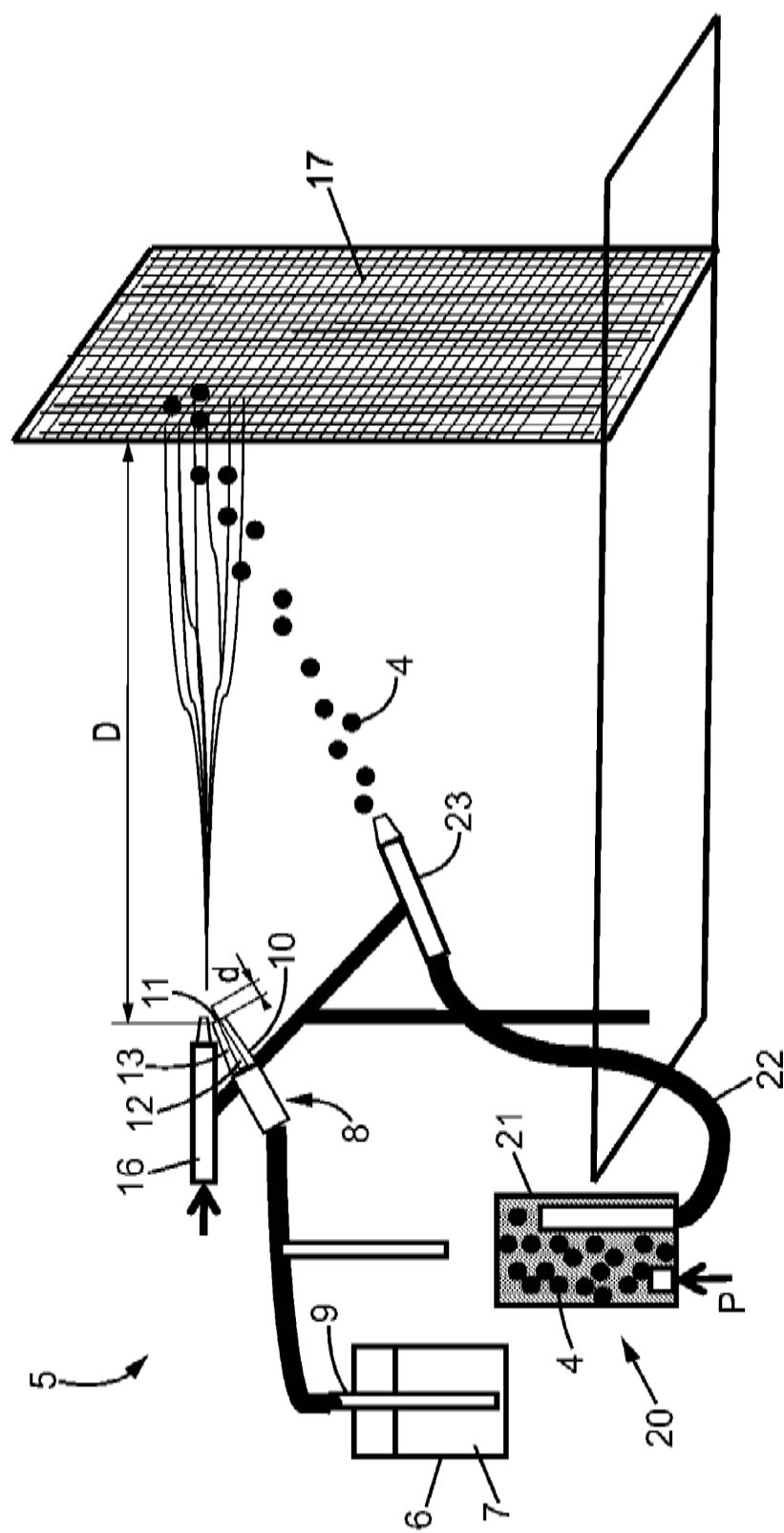
**FIG. 3b**



**FIG. 6**



**FIG. 3c**



**FIG. 4**

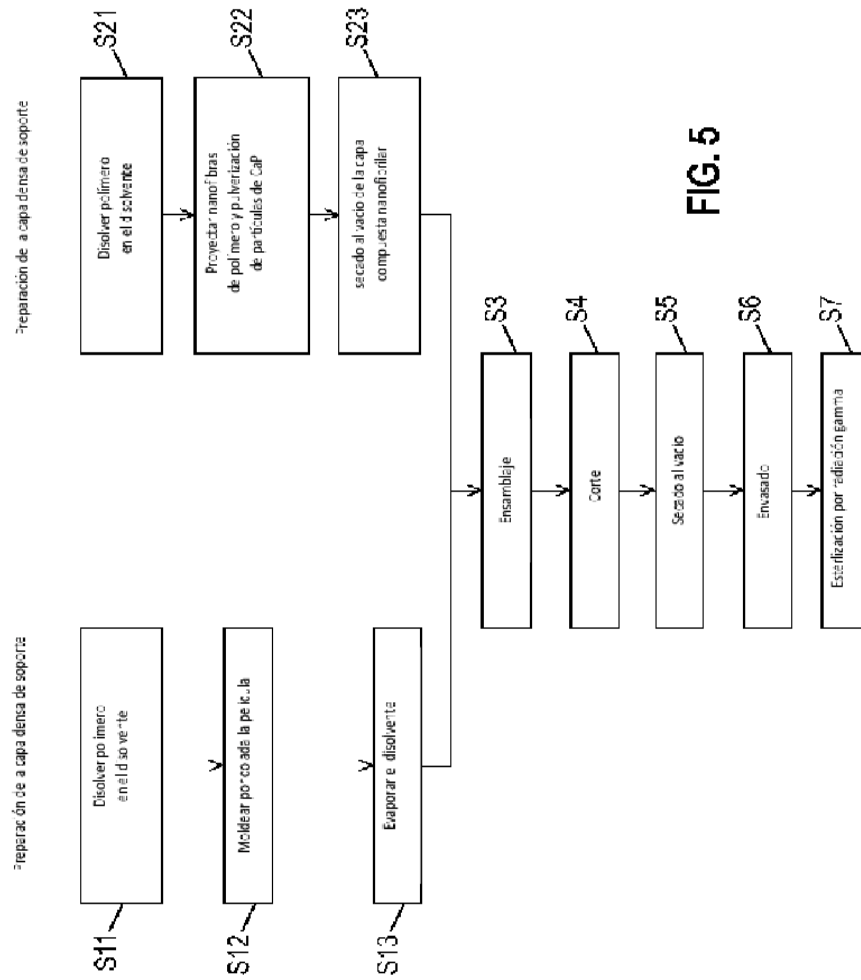


FIG. 5

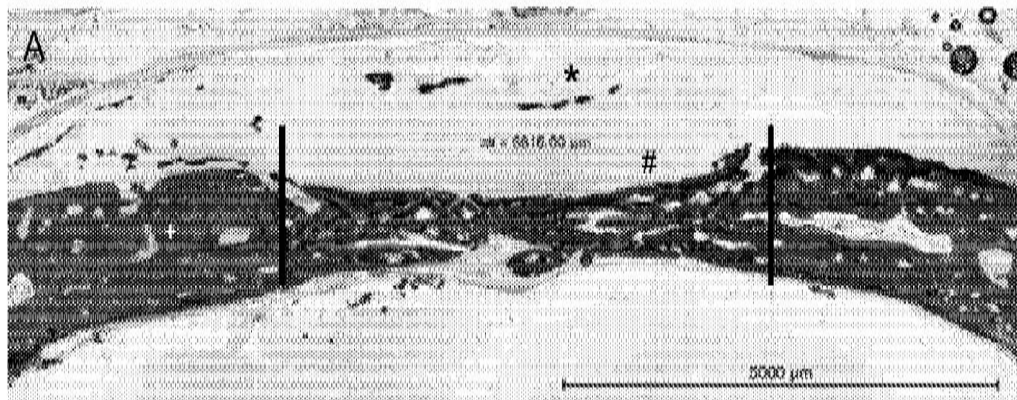


FIG. 7a

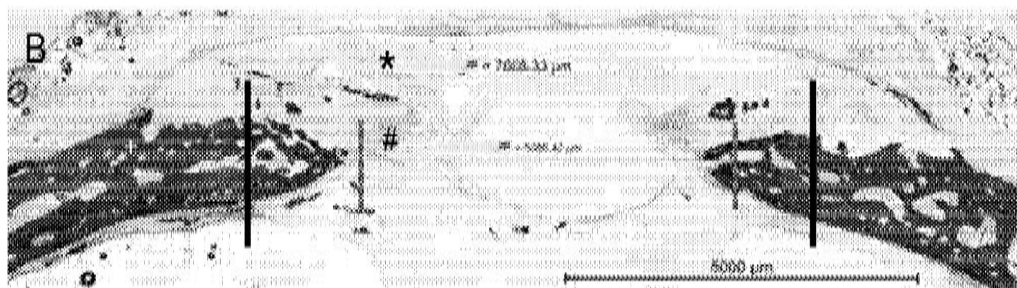


FIG. 7b

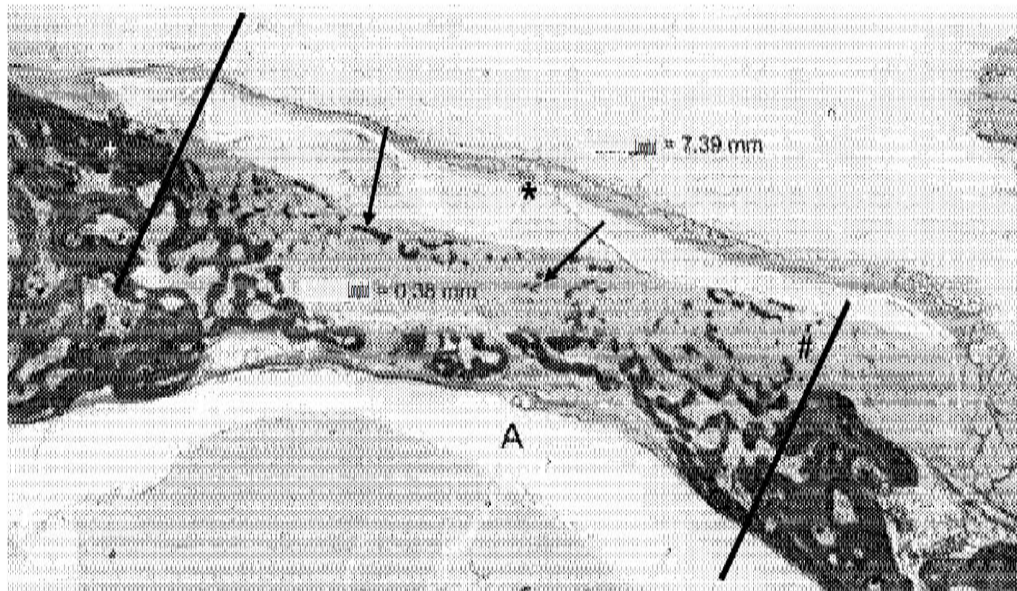
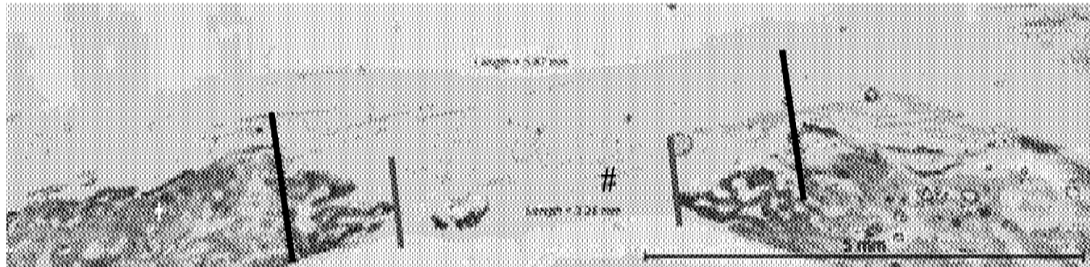
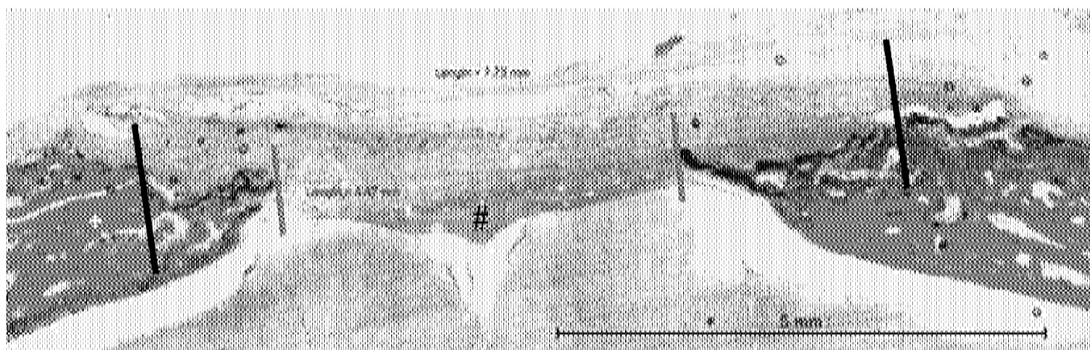


FIG. 8





**FIG. 9a**



**FIG. 9b**

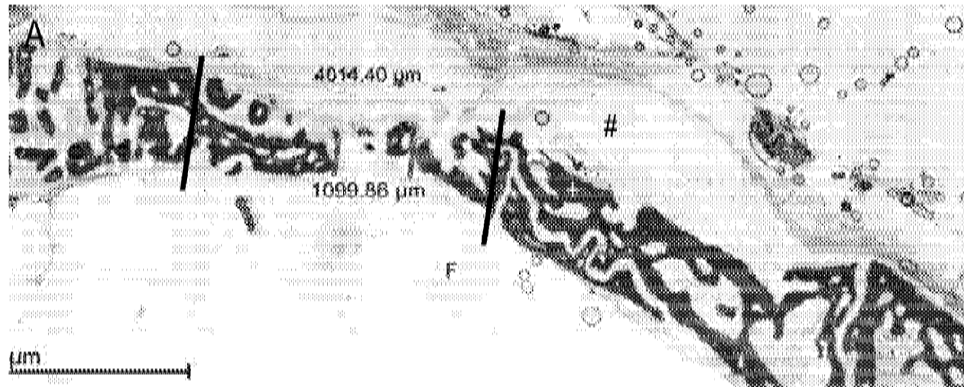


FIG. 10a

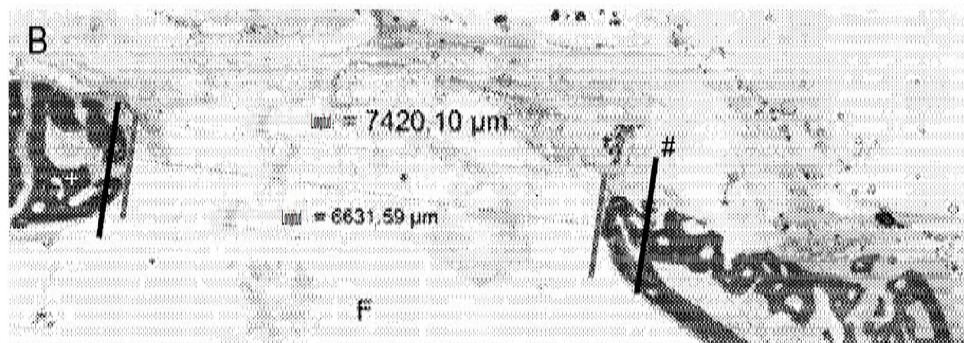


FIG. 10b

11a

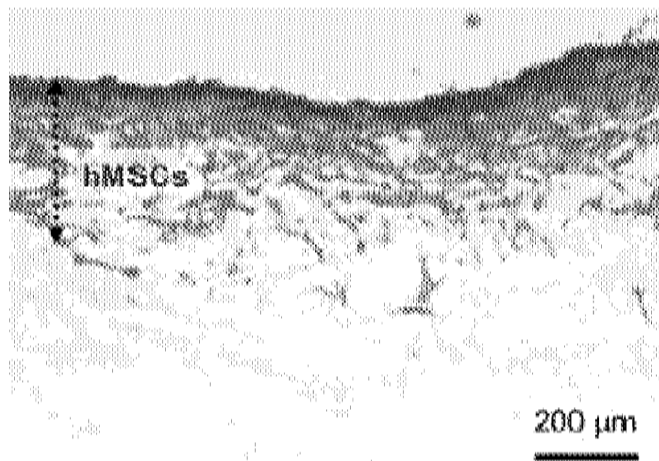


FIG. 11a

11b

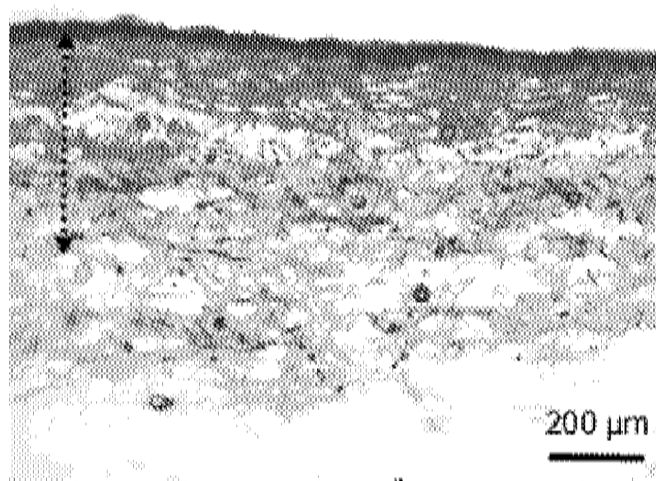


FIG. 11b