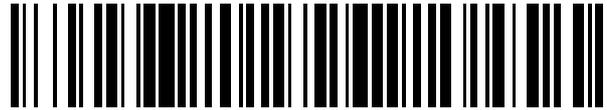


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 551 168**

51 Int. Cl.:

A61L 27/24 (2006.01)

A61L 27/58 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.04.2010** **E 10715551 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.09.2015** **EP 2424579**

54 Título: **Nuevos materiales de colágeno y procedimientos de obtención**

30 Prioridad:

28.04.2009 FR 0952768

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

16.11.2015

73 Titular/es:

**BIOM'UP (100.0%)
8, allée Irène Joliot-Curie
69800 Saint Priest, FR**

72 Inventor/es:

**GAGNIEU, CHRISTIAN;
FOREST, PATRICIA y
PICOT, SYLVAIN**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 551 168 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

Nuevos materiales de colágeno y procedimientos de obtención.

5 La invención se refiere a nuevos materiales de colágeno y más particularmente a membranas, tubos, películas, esponjas, geles, matrices e hilos de colágeno. Estos materiales combinan excelentes propiedades de elasticidad y de resistencia mecánica. La invención tiene asimismo por objeto un procedimiento de preparación de materiales de colágeno a partir de colágeno fibroso ácido de tendones que comprende también una reticulación controlada del colágeno. La invención se refiere también a un colágeno fibroso ácido de tendones que presenta unas fibras largas,
10 a su procedimiento de obtención, así como a sus aplicaciones en la fabricación en particular de membranas, de tubos, de películas, de esponjas, de geles, de matrices y de hilos de colágeno.

El colágeno es una proteína conocida desde la antigüedad. Desde hace numerosos años, se utiliza para la fabricación de dispositivos médicos ya que sus propiedades fisicoquímicas y biológicas son notables. Utilizado históricamente para la realización de compresas hemostáticas, su biocompatibilidad y su actividad sobre la cicatrización hacen de él un material muy bueno para la confección de biomateriales como membranas para la Regeneración Tisular Guiada en cirugía dental y para el recubrimiento de materiales de refuerzos parietales y de prótesis vasculares, para facilitar su integración y garantizar su estanqueidad.

20 Unos materiales totalmente de colágeno están disponibles en el mercado como compresas hemostáticas, membranas para la prevención de las adherencias, conductos de regeneración nerviosa (documentos WO 2007/147739, FR 2 810 889).

Con la condición de que el procedimiento de extracción del colágeno conduzca a una purificación suficiente, estos productos son perfectamente biocompatibles y desempeñan bien sus funciones.

Dependiendo de las indicaciones y por lo tanto de la duración de resorción deseada en el organismo, el colágeno puede ser reticulado. Los procedimientos de reticulación del colágeno son bien conocidos y están ampliamente descritos. Se citarán por ejemplo los documentos EP 0 862 468 y US nº 4.931.546. El documento US 2006/099268 describe un procedimiento de preparación de un material de colágeno a partir de una solución acuosa de colágeno que comprende una etapa de coagulación y fibrilación por tratamiento con amoníaco, seguida después del aclarado, de una etapa de reticulación fotoquímica, y después, de una etapa de secado. La utilización del glicógeno oxidado como reticulante del colágeno también se ha descrito en el documento FR 2 877 669 así como en las publicaciones Forest *et al.* y Rousseau *et al.* En función de la naturaleza y de la proporción de reticulante, así como de las condiciones de reticulación (pH, tiempo de reacción), es relativamente fácil hacer variar de manera controlada la duración de resorción de un material. Sin embargo, la dificultad de la reticulación reside en particular en la elección de la tasa de reticulación, que debe permitir producir un material estable, reproducible, con un tiempo de resorción deseado, que presente unas propiedades mecánicas definidas compatibles con la aplicación. Este problema es aún más importante para unos materiales de larga duración de vida ya que cuanto más reticulado está un material colagénico, más rígido es. Esta característica física que se traduce por un aumento de la susceptibilidad al desgarro y una disminución de la resistencia a la sutura, puede ser rehibitoria para algunas utilizaciones en cirugía. Ahora bien, no existe hasta ahora ningún procedimiento de reticulación que permita controlar de manera precisa y reproducible la tasa de reticulación del colágeno, y por lo tanto controlar la rigidez del material final.

45 Así, en algunos casos, y en particular cuando los productos están sometidos a fuertes tensiones mecánicas por parte del cirujano y/o por el paciente tras la implantación, estos materiales colagénicos existentes alcanzan sus límites. Es el caso por ejemplo del producto descrito en la patente FR 2 877 669 y en la publicación científica FOREST *et al.* (2007). Estos materiales desempeñan perfectamente sus funciones pero en casos extremos en los que las suturas son delicadas o las tensiones más fuertes, el material no es suficientemente resistente.

50 Las propiedades mecánicas de un producto de colágeno dependen de tres factores:

- la elección del nivel de estructuración del colágeno,
- la elección del reticulante y de la tasa de reticulación,
- 55 - los procedimientos de preparación y de conformación del material.

Frente a las nuevas técnicas quirúrgicas y a los campos posibles abiertos para los cirujanos, estos últimos investigan cada vez más productos biodegradables suficientemente resistentes para ser suturados y puestos en tensión, eventualmente sin que estén reforzados por un entramado textil por ejemplo. Es en particular el caso de las membranas para la regeneración tisular guiada. Para la realización de un material de este tipo, el experto en la materia seleccionará un colágeno muy estructurado y reticulará mucho el colágeno. Obtendrá sin embargo un producto muy rígido, rompible y no manipulable fácilmente por el cirujano. El colágeno seleccionado podrá ser un colágeno denominado fibroso, es decir poco desestructurado, pero la ausencia de control en el procedimiento de extracción limita las posibilidades de los materiales producidos con estos colágenos. La reticulación se realizará o bien por inmersión, o bien por puesta en contacto con vapor de formaldehído o de glutaraldehído por ejemplo sin permitir la obtención de una reticulación flexible y controlada. Así, no existe hasta ahora productos colagénicos al

mismo tiempo resistentes mecánicamente (tensión, sutura) que sean al mismo tiempo flexibles y moldeables y que presenten un tiempo de resorción adaptado (varios meses).

La fabricación de materiales de colágeno reticulado comprende habitualmente la preparación de una solución acuosa de colágeno, la adición eventual de un agente de reticulación, la conformación del material por vertido o moldeo de la solución de colágeno, la evaporación del disolvente y después el tratamiento del material obtenido mediante unos procedimientos físicos o químicos, en baños, vapores o a presión reducida que permita la formación de enlaces de reticulación, la eliminación y/o la desactivación del agente de reticulación residual o cualquier molécula indeseable, y después una nueva etapa de secado del material si la forma final del material lo necesita.

Estos procedimientos según el estado de la técnica necesitan numerosas manipulaciones del material de colágeno y no permiten un control satisfactorio de la etapa de reticulación, en particular a nivel de la densidad de los enlaces reticulantes y de la estructuración del colágeno. Estos procedimientos no permiten en particular una etapa de coagulación/fibrilación o una etapa de coagulación/fibrilación/reticulación suficientemente progresiva para permitir una organización tridimensional de las moléculas de colágeno. Por eso, los materiales reticulados obtenidos generalmente son o bien resistentes y rígidos, o bien flexibles pero poco resistentes.

La presente invención describe ahora un procedimiento que permite la obtención de un material de colágeno y en particular unas membranas de colágeno que tienen una resistencia elevada a la tracción y al desgarro, conservando al mismo tiempo una flexibilidad y una elasticidad suficiente para las aplicaciones quirúrgicas en particular.

En efecto, los inventores han desarrollado un nuevo procedimiento de preparación de material de colágeno que comprende un tratamiento de colágeno fibroso en el estado húmedo con amoníaco en el estado gaseoso en su conformación. Este tratamiento progresivo con amoníaco gaseoso permite obtener al mismo tiempo una coagulación y una fibrilación del colágeno fibroso en su conformación. La invención se refiere por lo tanto asimismo a un procedimiento de conformación de colágeno fibroso y en particular a la utilización de una base débil tal como el amoníaco en el estado gaseoso para asegurar la coagulación y fibrilación completa del colágeno en forma de gel. Este procedimiento permite también la reticulación concomitante del colágeno en su conformación por la adición directa del agente de reticulación en la solución de colágeno fibroso antes de la conformación de este por vertido o moldeo. La tasa de reticulación del colágeno puede así ser controlada de manera precisa y reproducible.

Por otro lado, el procedimiento puede permitir una reticulación sustancialmente homogénea en el material, es decir que la tasa de reticulación puede ser sustancialmente idéntica en el exterior y en el interior del material. Esto permite en particular que este material tenga propiedades mejoradas con respecto a los materiales cuya reticulación es mucho más importante en el exterior que en el interior, incluso inexistente en el interior.

El procedimiento puede así conducir a un material que presenta unas propiedades mecánicas y/o de resorción mejoradas. Sin querer estar vinculado por esta teoría, es posible que la velocidad de resorción esté mejor controlada gracias a la homogeneidad de reticulación y/o de estructura en el volumen del material. Por "mejor controlada" se puede entender en particular en el sentido de la presente invención que una muestra de un producto a otro, en particular procedente de dos lotes de fabricación diferentes, y/o de un paciente a otro, la velocidad de resorción presenta unas diferencias más bajas que en el caso de productos procedentes de procedimientos conocidos en la técnica anterior.

Por otra parte, el material puede presentar una resorción sustancialmente constante, o lineal, en función del tiempo. Esto puede conducir así a una liberación progresiva de las partes degradadas.

Por el contrario, en los casos de los materiales existentes, en los que la reticulación no es homogénea en volumen, la degradación puede ser "brutal". Sin querer estar vinculado por esta teoría, es probable que una vez cumplida la degradación de la parte externa, la parte interna, que presenta un grado de reticulación menor, se degrada mucho más, incluso muy rápidamente. Esto puede provocar por lo tanto un aumento rápido de la cantidad de productos de degradación, lo cual puede causar reacciones inflamatorias, incluso unos brotes inflamatorios brutales.

Preferentemente, estos procedimientos se realizan con colágeno fibroso y preferentemente con colágeno que presenta unas fibras largas. Los inventores han desarrollado asimismo un procedimiento de preparación de colágeno fibroso ácido de tendones que tiene la particularidad de presentar unas fibras particularmente largas y elásticas. El colágeno fibroso obtenido es útil para la preparación de materiales de colágeno, en particular de membranas, películas, esponjas, geles, matrices, hilos y tubos según la invención.

Los procedimientos según la presente invención permiten fabricar unos dispositivos médicos y en particular unas membranas, películas, esponjas, geles, matrices, hilos y tubos que presentan unas propiedades en términos de resistencia mecánica, elasticidad, suturabilidad y conformabilidad jamás alcanzados con los procedimientos clásicos de producción de materiales de colágeno. Los materiales obtenidos mediante los procedimientos según la invención pueden ser utilizados en cirugía general y especializada, en particular para las cirugías urológica, ginecológica, cardíaca, torácica, vascular, articular, digestiva, plástica, espinal, neurológica, ortopédica, traumatológica, dental, maxilofacial y estomatológica, para la cicatrización guiada o la sustitución de los tejidos (duramadre, encías, huesos,

nervios, tendones, ligamentos, vísceras, pericardio, peritoneo, tejido conjuntivos en general, dermis, músculo, cartílago), sea cual sea la forma que puede adoptar el material así fabricado.

5 Estos materiales, teniendo en cuenta sus características, pueden ser utilizados en forma de membrana o película como barrera de cicatrización guiada y/o anti-adherencia en cualquier cirugía en la que la separación de dos órganos o tejidos es necesaria durante las fases de cicatrización, como guía de regeneración en forma de tubo o de manguitos fabricados por el cirujano a su conveniencia en la regeneración nerviosa y tendinosa, como matriz de regeneración para la ingeniería tisular cuando el colágeno está en forma de esponja por ejemplo. La conformabilidad de los productos debida al colágeno utilizado para su fabricación, los hace fáciles de utilizar y les permite coincidir con las formas de los tejidos en los que se colocan, siendo al mismo tiempo suturables con el fin de ser mantenidos en su sitio si es necesario. En función del sitio de implantación y de la duración de resorción deseada, se puede ajustar la reticulación haciendo variar la proporción de los grupos reactivos del reticulante y las del colágeno en la solución de colágeno de partida (y/o aumentado o disminuyendo la cantidad de amoniaco y/o el tiempo de contacto con el amoniaco). El grosor del material puede también ser ajustado con los mismos fines.

15 Las aplicaciones preferidas son la obtención de membranas (para la regeneración tisular guiada y sustitución de tejidos (duramadre, pericardio, etc.) en numerosas cirugías), de tubos (para la regeneración nerviosa, por ejemplo para la regeneración tendinosa y de los ligamentos), y de matrices (por ejemplo para la ingeniería tisular).

20 **Resumen de la invención**

La invención se refiere a un procedimiento de preparación de un material de colágeno que comprende las etapas siguientes:

- 25 a) preparación de una solución acuosa de colágeno en forma ácida,
b) adición de un agente de reticulación aldehídico no reactivo a pH ácido,
c) moldeo o vertido de la solución acuosa de colágeno,
d) coagulación, y reticulación, de la solución acuosa de colágeno por tratamiento con amoniaco gaseoso,
e) eliminación del amoniaco en exceso y obtención del material de colágeno por secado.

30 Preferentemente, la solución acuosa de la etapa a) comprende 0,05 a 3% en peso de colágeno en forma ácida.

Preferentemente, el colágeno en forma ácida es colágeno nativo o colágeno desnaturalizado.

35 Preferentemente, la solución acuosa de la etapa a) se prepara con colágeno fibroso ácido seleccionado de entre los colágenos de tendones de cerdo, de tendones de ternera, de tendones de cordero y de tendones de potro.

40 En un modo de realización ventajoso, la coagulación, y opcionalmente la reticulación de la solución de colágeno se efectúan por tratamiento con amoniaco gaseoso durante por lo menos 24 horas.

40 En un modo de realización ventajoso, el procedimiento comprende la adición de un agente de reticulación aldehídico no reactivo a pH ácido, la coagulación y la reticulación de la solución acuosa de colágeno por tratamiento con amoniaco gaseoso.

45 Ventajosamente, el agente de reticulación aldehídico se selecciona de entre el glicógeno y las amilopectinas aldehídicas.

Más ventajosamente, el agente de reticulación aldehídico es glicógeno oxidado.

50 Preferentemente, el agente de reticulación aldehídico se añade en unas proporciones que van de 0,05 a 5 para la relación CHO entre el agente de reticulación aldehídico y NH₂ del colágeno.

55 En un modo de realización preferido del procedimiento según la invención, el material de colágeno es una membrana, en la etapa c) la solución de colágeno se deposita en un molde plano y en la etapa e) se elimina el amoniaco en exceso y se obtiene una membrana de colágeno por secado.

60 La invención se refiere también a un material de colágeno susceptible de ser obtenido mediante un procedimiento según la invención y/o tal como se describe en la presente descripción, más particularmente dicho material se obtiene mediante dicho procedimiento, incluso dicho material se obtiene directamente mediante dicho procedimiento.

Según otro de sus aspectos, la invención tiene también por objeto un material, en particular una membrana, de colágeno que presenta una reticulación homogénea.

65 Por "reticulación homogénea" se entiende en el sentido de la presente invención que la diferencia entre la reticulación sobre la superficie externa y la reticulación en el interior, en particular hacia el centro del material es inferior o igual al 25%, en particular inferior o igual al 20%, en particular inferior o igual al 15%, incluso inferior o igual

al 10%, y más particularmente inferior o igual al 5%.

La diferencia de reticulación en % puede corresponder al valor absoluto de $\frac{[(\text{reticulación externa} - \text{reticulación interna})/(\text{reticulación interna} + \text{reticulación externa})] \times 100}$.

5 La reticulación se puede evaluar por el número de moles de lisina libre por mg de material, en particular de la manera descrita en el ejemplo 7.

10 El material, en particular la membrana, que presenta una reticulación homogénea puede tener un grosor seco de por lo menos 50 μm , y muy particularmente su longitud, su anchura y su altura son cada uno superior o igual a 50 μm .

Muy particularmente, el material se presenta en forma de una membrana que tiene un grosor seco de por lo menos 50 μm . La longitud y la anchura de dicha membrana pueden ser superior o igual a 1 cm, incluso a 5 cm.

15 Según también otro de sus aspectos, la invención tiene por objeto un material de colágeno que presenta una temperatura de desnaturalización superior o igual a 3°C, en particular superior o igual a 5°C, incluso superior o igual a 7°C, con respecto al material de colágeno no reticulado. Esta diferencia de temperatura de reticulación se puede medir por Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC), en particular de la manera descrita en el ejemplo 8.

20 El material de colágeno reticulado puede presentar un aumento de la temperatura de desnaturalización con respecto al material no reticulado de por lo menos 5%, en particular 8%, particularmente de por lo menos 10%.

Este % de aumento de la temperatura corresponde a la ecuación siguiente:

25
$$[\frac{(\text{temperatura de desnaturalización del material reticulado} / \text{temperatura del material no reticulado}) - 1}{1} \times 100]$$

El aumento de la temperatura de desnaturalización del material reticulado con respecto a la temperatura de desnaturalización del material no reticulado puede permitir verificar que dicho material está efectivamente reticulado.

30 Preferentemente, este material de colágeno puede consistir en una membrana de colágeno, una película de colágeno, un hilo de colágeno, un tubo de colágeno, una esponja de colágeno o un gel de colágeno.

35 En un modo de realización preferido, la invención tiene por objeto una membrana de colágeno susceptible de ser obtenida mediante el procedimiento según la invención y que tiene un grosor seco comprendido entre 30 y 200 μm , preferentemente de 80 a 120 μm .

Preferentemente, la membrana de colágeno está constituida por una monocapa de colágeno, no porosa, de grosor seco comprendido entre 50 y 150 μm , preferentemente de 80 a 120 μm .

40 La membrana de colágeno obtenida según la invención tiene ventajosamente una densidad comprendida entre 12 mg/cm^2 y 16 mg/cm^2 , una tasa de hinchamiento inferior a 6, una resistencia a la sutura superior a 1 N, una tensión a la ruptura superior a 4 MPa y un porcentaje de degradación enzimático a la tripsina inferior al 35%.

45 La invención tiene también por objeto una membrana de colágeno que tiene un grosor seco comprendido entre 80 y 120 μm , una densidad comprendida entre 12 mg/cm^2 y 16 mg/cm^2 , una tasa de hinchamiento inferior a 6, una resistencia a la sutura superior a 1 N, una tensión a la ruptura superior a 4 MPa y un porcentaje de degradación enzimática a la tripsina inferior al 35%.

50 Más preferentemente, la invención se refiere a una membrana de colágeno que presenta una tasa de hinchamiento comprendida entre 4 y 6, una resistencia a la sutura comprendida entre 1 N, y 2,5 N, una tensión a la ruptura comprendida entre 4 y 7 MPa y un porcentaje de degradación enzimática a la tripsina comprendido entre 20 y 35%.

Ventajosamente, la membrana de colágeno obtenida está armada con un textil resorbible o no.

55 Descripción detallada de la invención

60 La extracción del colágeno a partir de tendones de animales jóvenes que conducen a un colágeno cuya longitud y elasticidad de las fibras permiten a continuación, en su utilización en la fabricación de dispositivos médicos, la obtención de productos resistentes mecánicamente, elásticos, suturables y confortables, se realiza mediante un procedimiento de preparación de colágeno fibroso ácido de tendones que comprende las etapas siguientes:

- a) hinchamiento de los tendones de cerdo, de vacuno, de cordero, de potro y de sus mezclas en una solución acuosa de ácido acético entre 0,1 y 0,5 M durante por lo menos siete días,
- 65 b) trituración mecánica de los tendones para obtener una suspensión acuosa,

- c) precipitación y lavados del colágeno fibroso a partir de la suspensión acuosa de la etapa b),
- d) deshidratación del colágeno.

5 Preferentemente, la extracción de colágeno fibroso se efectúa a partir de tendones de animales jóvenes que tienen menos de 10 meses y más preferentemente a partir de tendones de cerdos que tienen menos de 10 meses.

10 La primera etapa comprende entonces la extracción de los tendones de pies de cerdos de menos de 10 meses (los tendones pueden también ser extraídos de vacunos, corderos y potros), la limpieza, la eliminación al máximo de los tejidos conjuntivos y otros tejidos no tendinosos y después el corte de los tendones en trozos de 1 cm de largo aproximadamente, y el aclarado con agua.

15 El hinchamiento se efectúa durante por lo menos 7 días y hasta 15 días, preferentemente 15 días en un baño de ácido acético a una concentración comprendida entre 0,1 y 0,5 M, preferentemente 0,3 M bajo agitación, a razón de 1 kg de tendones en un volumen comprendido entre 20 y 30 l, preferentemente 25 l.

20 La segunda etapa consiste en una trituration suave, que permite la liberación de fibras tendinosas largas a partir de los fragmentos hinchados de tendones. La trituration de un volumen del baño de hinchamiento que contiene los trozos de tendones hinchados se efectúa por ejemplo durante 2 minutos a 3000 rpm, y después se realizan unas etapas que comprenden cada una una dilución del medio por agua seguida de una trituration en las mismas condiciones, hasta obtener una pasta de concentración en materia seca comprendida entre 4,8 y 6,5 g/kg.

25 La tercera etapa consiste en la precipitación del colágeno fibroso a partir de la pasta procedente de la trituration, y en su purificación según unos procedimientos clásicos. Esta etapa puede comprender una o más precipitaciones por cloruro de sodio a una concentración final comprendida entre 0,45 M y 1,2 M y más particularmente a la concentración de 0,6 M y una o varias etapas de lavado del colágeno precipitado en una solución de NaCl 0,45-1,2 M, preferentemente 0,6 M. En general, está también prevista una etapa de desactivación viral en una solución de hidróxido de sodio 1 N, a 20°C durante 1 h. Debido a su acción hidrolítica sobre las proteínas no colagénicas, esta etapa constituye una purificación suplementaria. Al final de esta etapa, se realizan nuevos lavados con NaCl 0,6 M. Con el fin de deshidratar el colágeno y eliminar las sales, se efectúa a continuación un tratamiento con acetona que conduce a la obtención de una fibra seca.

35 Este procedimiento particular aplicado a tendones conduce a un colágeno diferente de los colágenos existentes, ya que está compuesto por largas fibras sin que por ello contenga trozos de tejidos y conservando al mismo tiempo una parte de colágeno soluble.

El protocolo de medición de las fracciones del colágeno fibroso inferiores a 5 µm y superiores a 50 µm es el siguiente:

- 40 - Preparación de una solución acuosa de colágeno al 0,1% bajo agitación magnética o mecánica durante 16 a 24 h (utilización de 500 mg),
- Depósito de la solución sobre una tela de nilón de mallas calibradas de 5 µm o 50 µm montada sobre un soporte circular de 9 cm de diámetro. La difusión de las moléculas en la tela tiene lugar a presión atmosférica. La presión ejercida sobre la tela está considerada como despreciable, la altura de la columna de agua no podría superar 4 cm para una sección de 63 cm².
- 45 - La solución sobre la tela se agita con una pala cuadrada plana que no frota sobre la tela, sino que está posicionada a algunos milímetros (como máximo 5) por encima de la tela. La velocidad de agitación es de 80 rpm.
- 50 - La anchura de la pala es de 7 cm. Está posicionada en el centro del soporte circular.
- Después de detener el flujo de la solución de colágeno a través de la tela, el retentado se lava mediante 50 ml de ácido acético 0,05 M, respetando los diferenciales de presión y hasta detención del flujo. Esta operación se repite 3 veces.
- 55 - Las fracciones se recuperan a continuación (filtrado y retentado) y el colágeno se precipita a partir de cada una de las fracciones por adición de NaCl con el fin de alcanzar una concentración de 0,6 M final.

60 El precipitado es recogido después por centrifugación o filtración y después deshidratado por acetona, se seca bajo presión reducida y se pesa.

65 La invención tiene por objeto un procedimiento de preparación de un material de colágeno caracterizado por que comprende las etapas siguientes:

- a) preparación de una solución acuosa de colágeno en forma ácida,
- b) adición de un agente de reticulación aldehídico no reactivo a pH ácido,
- c) moldeo o vertido de la solución acuosa de colágeno,
- d) coagulación y reticulación de la solución acuosa de colágeno por tratamiento con amoníaco gaseoso,
- e) eliminación del amoníaco y obtención del material de colágeno.

5

La primera etapa de los procedimientos según la invención consiste en la preparación de una solución acuosa de colágeno. Por solución acuosa de colágeno se entiende también una suspensión de colágeno.

10 El procedimiento según la invención utiliza colágeno en forma ácida, por colágeno en forma ácida, se entiende un colágeno cuya mayoría de las funciones carboxílicas están protonadas, y que da un pH ácido en solución o suspensión en agua.

15 Preferentemente, el procedimiento de preparación de material de colágeno según la invención utiliza colágeno fibroso ácido.

20 Por colágeno fibroso, se entiende un colágeno en el que las moléculas de colágeno no están, o los están muy poco, individualizadas, que está compuesto por lo tanto por fibras y fibrillas constituidas por moléculas de colágeno naturalmente unidas entre sí por unos enlaces débiles y covalentes, y por unos agregados de estas estructuras. El colágeno fibroso, en particular, está constituido por partículas de grandes tamaños (mayoritariamente superiores a 5 µm cuando están hidratadas) que dan una suspensión homogénea por dispersión en medio acuoso.

25 El colágeno fibroso puede ser en particular un colágeno fibroso de piel o un colágeno fibroso de tendones. El colágeno fibroso de piel comprende unas fibras relativamente cortas debido a la organización natural del tejido, colágeno ácido-soluble y unos agregados de pequeño tamaño. El colágeno de tendones comprende unas fibras largas y muy poco colágeno soluble.

30 Preferentemente, los procedimientos según la presente invención se realizan con colágeno fibroso de tendones, preferentemente con colágeno fibroso de tendones de cerdos, y más preferentemente con colágeno de tendones de cerdos jóvenes de menos de 10 meses.

De manera ventajosa, los procedimientos de la presente invención utilizan colágeno fibroso ácido de tendones preparado según el procedimiento descrito anteriormente y que presenta unas fibras largas.

35 La primera etapa consiste por lo tanto en la puesta en solución del colágeno en agua. Se efectúa según unos métodos clásicos descritos en la bibliografía. Cuando el colágeno es un colágeno fibroso ácido, esta etapa permite la puesta en suspensión de fibras rodeadas de colágeno micro-fibrilares y de colágeno denominado soluble que ha conservado una estructura necesaria para la fibrilación.

40 Típicamente, la solución acuosa de colágeno comprende entre 0,05% y 3% en peso de colágeno y preferentemente entre 0,05, 0,1, 0,8%, 1, 1,5, 2, 2,5 y 3% de colágeno. Ventajosamente, la solución acuosa comprende 0,8% de colágeno en peso. Esta puesta en solución se efectúa habitualmente en agua por agitación mecánica, preferentemente a presión reducida. La suspensión o solución también puede ser calentada a una temperatura comprendida entre 30°C y 100°C durante 2 a 20 minutos para desnaturalizar parcial o completamente el colágeno.

45 Los procedimientos según la invención permiten obtener diversos materiales de colágeno en función de la conformación seleccionada en el moldeo o el vertido. El material de colágeno puede así adoptar la forma en particular de una membrana, de una matriz, de una película, de un hilo, de un gel, de un tubo o de una esponja.

50 El vertido o el moldeo de una solución acuosa de colágeno son bien conocidos por el experto en la materia y están descritos en la bibliografía. La segunda etapa es por lo tanto el vertido o el moldeo de la solución de colágeno en unos moldes, variando el grosor en función del material deseado y en función de la superficie del molde.

55 Las membranas de colágeno son unos materiales en dos dimensiones que resultan del secado en un molde plano de una suspensión homogénea o de una solución de colágeno que contiene una proporción de fibras y de fibrillas. El colágeno puede estar reticulado o no. La concentración de la suspensión secada condiciona el grosor del material final. Puede ir desde algunos micrones hasta varios centenares de micrones.

60 Una película de colágeno es un material en dos dimensiones que resulta del secado en un molde plano de una solución homogénea de colágeno. El colágeno puede estar reticulado o no. La concentración de la solución secada condiciona el grosor del material final. Las películas y las membranas pueden estar replegadas para formar unos manguitos que pueden ser cerrados si es necesario por suturas o pegamento. El grosor puede variar desde algunos micrones hasta varios centenares de micrones. Un tubo de colágeno es un objeto cilíndrico en tres dimensiones hueco cuyas paredes pueden ser una película o una membrana de colágeno. Los tubos pueden ser obtenidos por moldeo alrededor de un molde o por extrusión. El colágeno puede estar reticulado o no. El grosor de las paredes está condicionado por la cantidad de colágeno depositada sobre los moldes o utilizada en la solución de extrusión.

65

Un hilo de colágeno es un conjunto macizo de colágeno y cuya resistencia mecánica es suficiente para entrar en la composición de un hilo multihebra más gordo, de un textil compuesto o no, de otro material de colágeno.

5 Una esponja de colágeno se puede obtener por liofilización de una solución o de una suspensión de colágeno (o de una mezcla de los dos). Antes o después de la liofilización, el colágeno puede ser reticulado. La liofilización conduce a unos materiales lo más frecuentemente en 3 dimensiones o a unos polvos.

10 Para la obtención de una membrana o de una película, la solución de colágeno puede ser depositada en un molde plano para obtener un material en dos dimensiones después del secado de la solución o de la suspensión. La película o la membrana se pueden obtener por evaporación del disolvente.

15 Unos tubos de colágeno se obtienen mediante el depósito de la solución o de la suspensión sobre un molde cilíndrico y secado o liofilización.

Para la obtención de esponjas, la extracción del disolvente se puede realizar por liofilización y no por evaporación del disolvente en forma líquida.

20 Ya se conocía utilizar amoníaco para la coagulación y conformación del colágeno, pero en general se trataba de la utilización del amoníaco para coagular una solución o un gel durante procedimientos de extrusión por ejemplo. El tratamiento con amoníaco era entonces muy rápido y en baños. El procedimiento según la invención se basa en la velocidad de difusión del amoníaco en la solución de colágeno, velocidad que depende esencialmente de la concentración de esta base en la superficie de la solución. El colágeno y el amoníaco se dejan en contacto un tiempo suficiente para permitir la coagulación del colágeno pero también su fibrilación sobre la totalidad de la solución tratada. Esto conduce a la preparación de materiales de colágeno que presentan unas propiedades mecánicas que no se obtienen con los procedimientos del estado de la técnica, en el plano de la resistencia a la tracción, de la elasticidad y de la resistencia a la sutura.

30 La tercera etapa es por lo tanto la coagulación del colágeno por tratamiento con amoníaco durante un tiempo suficiente para permitir al mismo tiempo la coagulación y la fibrilación del colágeno. Típicamente, el tratamiento con amoníaco se efectúa para una duración de 4, 8, 12, 24, 36 a 48 h. Preferentemente, el tiempo de tratamiento es superior a 24 o 36 horas.

35 La cantidad de amoníaco se deberá ajustar para permitir un aumento de pH del gel de colágeno de un pH ácido hasta un pH por lo menos superior a 8. En efecto, la reticulación del colágeno empieza cuando el gel de colágeno alcanza un pH por lo menos superior a 8. Este tratamiento largo permite un aumento progresivo del pH del colágeno que conduce no sólo a la coagulación, sino también a la fibrilación de este. En función de la longitud de las fibras de colágenos utilizada, esta fibrilación forma un enmallado que confiere a los productos al mismo tiempo resistencia mecánica y elasticidad.

40 En un modo de realización preferido, el amoníaco gaseoso se prepara a partir de una solución de amoníaco de la cual se libera. Se obtiene generalmente una cantidad apropiada de amoníaco gaseoso con una solución de amoníaco a por lo menos 30%, a una temperatura comprendida entre 10°C y 25°C. Preferentemente, esta etapa se realiza en un recinto cerrado herméticamente, de manera que el amoníaco gaseoso se expanda en el interior del recinto y entre en contacto con la solución de colágeno, la cual no está en contacto con la solución de amoníaco.

50 El gel de colágeno obtenido se trata para eliminar el amoníaco en exceso y se conserva o bien tal cual, o bien se deshidrata. Para ello, el gel puede ser colocado en un recinto provisto de un sistema de eliminación de la humedad y/o de un absorbente de amoníaco. Después de la eliminación del amoníaco en exceso, las membranas, películas y tubos se obtienen por deshidratación del gel bajo corriente de aire seco, mientras que las esponjas, las matrices 3D o los tubos también se obtienen por liofilización del gel. Los geles pueden ser mantenidos hidratados.

55 En este procedimiento de preparación de materiales de colágeno, el proceso de fibrilación tiene lugar en un medio líquido altamente viscoso. Esta fibrilación se produce desde el exterior hacia el interior de la solución y progresa en profundidad a medida que se produce el aumento de pH unido a la difusión del amoníaco. Se produce cuando el pH ha alcanzado un valor superior a 4-5. La ventaja del procedimiento en vapor de amoníaco es que el producto no necesita ser sumergido en soluciones de neutralización, lo cual permite una ganancia de tiempo, de rentabilidad y de homogeneidad.

60 Cuando se desea aumentar la duración de resorción de un dispositivo médico colagénico y también reforzar sus propiedades mecánicas, el material de colágeno debe ser reticulado. Existen numerosos métodos de reticulación del colágeno bien conocidos por el experto en la materia. Están clasificadas en dos grandes categorías: las reticulaciones físicas como por ejemplo la deshidratación térmica y las reticulaciones químicas por adición o puesta en presencia de agentes reticulantes. Los reticulantes del colágeno más conocidos son los agentes aldehídicos, en particular el formaldehído y el glutaraldehído. Estos procedimientos de reticulación se pueden utilizar evidentemente sobre los materiales de colágeno obtenidos anteriormente.

5 Así, con el fin de aumentar la resistencia mecánica del colágeno o de los materiales de colágeno, se puede proceder por lo tanto a su reticulación. Se efectúa por ejemplo por inmersión del material de colágeno en un baño que comprende un agente reticulante seleccionado de entre el formaldehído, el glutaraldehído, el glicógeno oxidado y la amilopectina oxidada.

10 De manera particularmente ventajosa, la reticulación se puede realizar por el contrario en una sola etapa, pero de manera secuencial con la coagulación y la fibrilación del colágeno. En este caso, se introduce en la solución de colágeno de partida un agente reticulante aldehídico que no reacciona con el colágeno a pH ácido, y después se procede al tratamiento con amoníaco para obtener un pH por lo menos superior a 8.

15 El agente de reticulación aldehídico se selecciona preferentemente de entre los polisacáridos y más particularmente los polisacáridos oxidados. Preferentemente, el agente de reticulación aldehídico se selecciona de entre el glicógeno oxidado y las amilopectinas oxidadas. Unos agentes de reticulación que se pueden utilizar en los procedimientos según la presente invención son, por ejemplo, el almidón oxidado, el dextrano oxidado, la celulosa oxidada, conocidos por el experto en la materia. Preferentemente, el agente de reticulación aldehídico es glicógeno oxidado.

20 El agente de reticulación se añade en unas proporciones que van de 0,05, 0,1, 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5 a 5 para la relación CHO entre el agente de reticulación aldehídico y NH₂ del colágeno. Las proporciones de agente de reticulación podrán ser ajustadas por el experto en la materia en función de la tasa de reticulación deseada. La cantidad de agente de reticulación a introducir en la solución de colágeno se podrá así determinar utilizando los conocimientos generales del experto en la materia.

25 Preferentemente, se procede entonces a la preparación de una solución acuosa concentrada (15%) del polisacárido oxidado seleccionado. La tasa de oxidación y la cantidad de reticulante a añadir se deberán apreciar en función de la resorción deseada y de las propiedades mecánicas buscadas. Es posible entonces añadir el reticulante al colágeno en una cantidad perfectamente controlada y reproducible (a diferencia de las reticulaciones por vapor de formol por ejemplo o por inmersión en baños). En este caso, sólo puede reaccionar el reticulante introducido. La solución de reticulante se añade a la solución de colágeno antes del vertido o de la conformación, es decir al final de la
30 homogeneización a presión reducida. El medio resultante es una mezcla homogénea del colágeno y del reticulante, pero los enlaces entre los dos no se crean mientras que el conjunto no haya alcanzado un pH básico. Las etapas siguientes son idénticas a las de la fibrilación del colágeno; realizándose la fibrilación y la reticulación sucesivamente y en este orden.

35 El experto en la materia sabrá adaptar la cantidad de amoníaco y la duración de exposición para alcanzar la fibrilación y la reticulación deseada.

Esta etapa del procedimiento según la invención es remarcable por varias razones.

40 La reticulación por los polisacáridos aldehídicos ya se ha descrito en la bibliografía (Gagnieu CH y Forest PO, EP 0 862 468). Esta reticulación se puede llevar a cabo o bien por inmersión de los productos a reticular en una solución del polisacárido oxidado, o bien por introducción en el producto del polisacárido oxidado y después inmersión del producto seco en un baño que permite la reacción de reticulación (aumento del pH). En general, el
45 cambio de pH se efectúa por un tampón y teniendo en cuenta el principio de la reticulación bien conocido (reacción de Maillard → reacción de los CHO del reticulante sobre los NH₂ del colágeno), se evita realizar el cambio de pH por unas bases que presentan ellas mismas unos restos de amina. Así, en presencia de amoníaco, la teoría predice que el polisacárido oxidado reaccionará con la amina del amoníaco y por lo tanto se desactivará. La reticulación no puede por lo tanto tener lugar.

50 En la práctica, resulta que la presencia de amoníaco modifica bien el pH del gel de colágeno para permitir la fibrilación pero también la reticulación. De manera completamente sorprendente, la reticulación tiene lugar a una tasa eficaz ya que la reacción de Maillard que debería haberse producido entre el amoníaco y los aldehídos del reticulante, que desactiva este último, está o bien ausente, o bien es de baja amplitud, o bien no es competitiva con la reacción de reticulación de los grupos aldehídos del polisacárido oxidado sobre las aminas de las lisinas del
55 colágeno. Esto se demuestra por el hecho de que los materiales reticulados por esta vía ya no son solubles en medio acuoso ácido, presentan degradaciones al contacto de enzimas proteolíticas inferiores a unos materiales no reticulados y de que las propiedades mecánicas de los materiales en forma hidratada, y en particular la resistencia mecánica, también han mejorado con respecto a un material no reticulado.

60 La invención tiene asimismo por objeto un material de colágeno susceptible de ser obtenido mediante los procedimientos según la invención. Preferentemente, el material de colágeno está reticulado. Este material de colágeno puede consistir por ejemplo en una membrana de colágeno, un hilo de colágeno, un tubo de colágeno, una esponja de colágeno o un gel de colágeno.

65 La invención se refiere así también a unas películas, hilos y tubos de colágeno susceptibles de ser obtenidos mediante los procedimientos según la presente invención. En un modo de realización ventajoso, la invención se

refiere a unas membranas de colágeno susceptibles de ser obtenidas mediante los procedimientos según la invención.

5 Los procedimientos según la invención permiten la preparación de membranas secas de grosor variable que puede ir desde algunos micrones hasta algunos centenares de micrones. El grosor utilizado generalmente para asegurar la cicatrización guiada (= conservación de los planos de escisión) o la sustitución de tejidos en cirugías urológica, ginecológica, cardíaca, torácica, vascular, articular, digestiva, plástica, espinal, neurológica, ortopédica, traumatológica, dental, maxilofacial y estomatológica, para la cicatrización guiada de los tejidos (duramadre, encía, hueso, nervios, tendones, ligamentos, vísceras, pericardio, peritoneo, tejidos conjuntivos en general, dermis, músculo, cartílago) está comprendido entre 30 y 200 μm .

15 La invención tiene por lo tanto por objeto unas membranas de colágeno susceptibles de ser obtenidas mediante los procedimientos según la invención, que tienen un grosor seco comprendido entre 30 y 200 μm . Preferentemente, estas membranas están reticuladas.

Ventajosamente, estas membranas están constituidas por una monocapa de colágeno, no porosa, de grosor seco comprendido entre 50 y 150 μm .

20 En un modo de realización, la invención tiene por objeto unas membranas de colágeno que tienen un grosor seco comprendido entre 80 y 120 μm , una densidad comprendida entre 12 mg/cm^2 y 16 mg/cm^2 , una tasa de hinchamiento inferior a 6, una resistencia a la sutura superior a 1 N, una tensión a la ruptura superior a 4 MPa y un porcentaje de degradación enzimática a la tripsina inferior al 35%.

25 En un modo de realización preferido, la invención tiene por objeto las membranas de colágeno descritas previamente que presentan una tasa de hinchamiento comprendida entre 4 y 6, una resistencia a la sutura comprendida entre 1 y 2,5 N, una tensión a la ruptura comprendida entre 4 y 7 MPa y un porcentaje de degradación enzimática a la tripsina comprendido entre 20 y 35%.

30 La tasa de hinchamiento se mide de la siguiente manera: se sumergen 20 mg de producto en "Phosphate Buffer Saline 1X" pH 7,4, durante 60 minutos a 37°C. Al final de la hora, el exceso de agua se retira con papel absorbente y la muestra se pesa de nuevo. La tasa de hinchamiento se calcula por la relación masa del producto húmedo/masa del producto seco.

35 Las mediciones de tensiones mecánicas (resistencia a la sutura y tensión) se miden en una probeta humidificada de 5 mm de anchura con la ayuda de un banco de ensayo de tracción. En lo referente a la sutura, se pasa un hilo de sutura de tipo trenzado de poliamida 3/0 a través de la membrana y después se mide la fuerza máxima a aplicar para romper la sutura con la ayuda de un banco de ensayo de tracción.

40 Para determinar la degradación enzimática a la tripsina, se sumergen unos fragmentos de producto de masas comprendidas entre 10 y 20 mg en 3 ml de PBS 1X pH 7,6, y se añaden 500 unidades de tripsina a la muestra. Después de 48 horas de degradación, se recogen, se deshidratan y se pesan las muestras digeridas. La pérdida de masa con respecto a la masa de partida se calcula a continuación.

45 La invención se refiere también a unas membranas de colágeno armadas con un textil, resorbible o no. Estas membranas armadas con un textil constituyen un refuerzo parietal y están particularmente adaptadas para la cirugía visceral y uro-ginecológica o un parche ligamentario para reforzar, prolongar o sustituir un ligamento o un tendón.

50 La invención tiene por lo tanto también por objeto un material compuesto que comprende, o que consiste en, un textil recubierto en una cara por un material de colágeno tal como el descrito anteriormente.

Puede tratarse en particular de un textil que lleva una membrana de colágeno según la invención en una de sus caras. Dichos tejidos protéticos y sus procedimientos de fabricación están descritos, por ejemplo, en el documento US nº 6.451.032.

55 Unas membranas de colágeno armadas con un tejido según la invención pueden ser fabricadas por otro lado según unos procedimientos bien conocidos por el experto en la materia.

En el marco de la presente invención, un procedimiento de este tipo puede comprender las etapas siguientes:

- 60
- preparación de una solución acuosa de colágeno en forma ácida,
 - adición de un agente de reticulación aldehídico no reactivo a pH ácido,
 - moldeo o vertido de la solución acuosa de colágeno,
 - depósito del textil sobre el colágeno,
 - coagulación y reticulación de la solución acuosa de colágeno por tratamiento con amoníaco,
 - 65 - eliminación del amoníaco y obtención del material de colágeno.

Las membranas armadas con un textil sobre una cara obtenidas según el procedimiento anterior convienen particularmente para la cirugía parietal.

Alternativamente, el procedimiento puede comprender las etapas siguientes:

- 5
- preparación de una solución acuosa de colágeno en forma ácida,
 - adición de un agente de reticulación aldehídico no reactivo a pH ácido,
 - moldeo o vertido de la solución acuosa de colágeno,
 - inclusión del textil en el colágeno,
- 10
- coagulación y reticulación de la solución acuosa de colágeno por tratamiento con amoníaco,
 - eliminación del amoníaco y obtención del material de colágeno.

Los textiles que comprenden así una membrana según la invención por los 2 lados están particularmente adaptados para la cirugía de ligamentos por ejemplo.

15 La invención tiene por lo tanto también por objeto un material compuesto que comprende, incluso que consiste en, un textil recubierto en dos, en particular sobre cada una, de sus caras por un material de colágeno tal como el descrito anteriormente, en particular, el textil puede ser incluido en el material de colágeno.

20 Otros procedimientos que permiten asociar un material de colágeno según la invención con un textil son conocidos por el experto en la materia.

La invención se refiere por lo tanto también a un material de colágeno según la invención, y en particular a una membrana, asociado a un textil.

25 Los procedimientos según la invención conducen también a la preparación de tubos para asegurar el guiado de órganos en cirugía nerviosa, tendinosa y de ligamentos, vascular. Las membranas también pueden, para esta indicación, ser enrolladas y cerradas en forma de manguito por sutura y/o pegamento.

30 Por último, los procedimientos permiten la preparación de matrices 3D de un grosor superior a 200 µm, porosas o no, que permiten, entre otros, la inoculación de células previamente o no a la implantación quirúrgica del material para unas aplicaciones en medicina regenerativa o que permiten la obtención de parches suturables y elásticos para aplicaciones cardíacas, regeneración de duramadre, guiado de tejidos blandos y duros.

35 Ejemplos

Ejemplo 1: Producción de colágeno fibroso ácido de tendones

→ Hinchamiento de los tendones

40 Se limpia 1 kg de tendones de pies de cerdos para retirar las partes musculares y aponeuróticas. Se sumergen en 25 l de una solución acuosa de ácido acético 0,3 M durante 10 días a 20°C (+/- 2°C) bajo agitación lenta.

→ Trituración de los tendones

45 Se trituran 3 l de suspensión obtenida a 300 rpm en un triturador de cuchillas durante 2 minutos. El medio se diluye mediante 2 l de agua y el conjunto se homogeneiza durante 1 minuto. El medio se filtra sobre un filtro de porosidad de 200 µm y el filtrado se ajusta a 0,6 M de NaCl para hacer precipitar el colágeno.

50 → Recuperación del colágeno y lavados

La suspensión se filtra o centrifuga para separar el precipitado del sobrenadante. El precipitado se recoge y se lava en 10 l de NaCl 0,6 M bajo agitación durante por lo menos 1 hora; el precipitado se recoge de nuevo por filtración sobre tela o centrifugación. La etapa de lavado puede ser realizada el número de veces deseado en función de la pureza del colágeno final deseado (idealmente 2 veces).

→ Desactivación viral y lavados

60 El colágeno precipitado y escurrido se disuelve al 1% en agua durante 16 horas bajo agitación. La concentración del medio se lleva a 1 M de NaOH y la solución se agita durante 1 hora a 20°C. Al final de la etapa de desactivación, la solución se neutraliza por ácido clorhídrico 6 M hasta precipitación del colágeno. El colágeno se recupera por filtración o centrifugación. El colágeno se puede lavar de nuevo en 10 l de NaCl 0,6 M y después recogido por filtración sobre tela o centrifugación. La etapa de lavado se puede realizar el número de veces deseado en función de la pureza del colágeno final deseado (idealmente 2 veces).

→ Recogida y secado

Al final del procedimiento de purificación, el colágeno precipitado se escurre y después se seca en baños de acetona. El colágeno se seca por último bajo flujo de aire controlado para eliminar la acetona residual y después se conserva por ejemplo a -20°C.

Ejemplo 2: Caracterización de un lote de colágeno fibroso ácido de tendones

Se ponen en dispersión 603 mg de colágeno fibroso ácido de tendones que presentan una tasa de humedad del 17,05% en 500 ml de agua desmineralizada durante 16 h bajo agitación magnética. Una tela de porosidad calibrada de 50 µm se coloca en un soporte cilíndrico de 9 cm de diámetro por encima de un recipiente. Se vierte un volumen de solución de colágeno sobre la tela de manera que no sobrepase 4 cm de altura. Una pala de 7 cm de diámetro se coloca a 2 mm de la tela y se efectúa una agitación de 80 rpm, la solución de colágeno fluye progresivamente a través de la tela. Cuando el volumen contenido en la cámara superior no disminuye más, el sistema se recarga de manera que nunca sobrepase 4 cm de altura. Estas operaciones se realizan hasta que se agote la solución preparada. Cuando se equilibre el sistema, el retentado se lava mediante 3 x 50 ml de ácido acético 0,05 M con el mismo sistema, respetando los diferenciales de presión. Se recoge la fracción superior.

La fracción inferior se recupera y continúa el análisis de la misma manera sobre una tela calibrada de 5 µm de porosidad. El retentado así como el filtrado se recogen.

Las 3 fracciones, es decir el retentado de la filtración sobre 50 µm, el retentado y el filtrado de la filtración sobre 5 µm se llevan a 0,6 M de NaCl y el colágeno se recupera por centrifugación y después se seca mediante 2 baños de acetona 70 y 3 baños de acetona 100. El exceso de acetona se elimina por secado bajo flujo de aire. Las fracciones se pesan y se aplican a la masa total recogida. El análisis conduce a 6,5% de fibras retenidas sobre un filtro de 50 µm, 27% de fibras que han atravesado un filtro de 5 µm y 66,5% comprendido entre 5 y 50 µm.

Ejemplo 3: Preparación de una película/membrana de colágeno reticulado nº 1

Se ponen en suspensión 800 mg de colágeno fibroso ácido de tendones bajo agitación mecánica en 100 ml de agua durante 16 horas. La suspensión viscosa se vierte en un molde a razón de 4 mg de colágeno/cm². El molde que contiene la solución de colágeno se coloca en un recinto cerrado herméticamente de 3 l que contiene 2 ml de amoníaco al 30% durante 24 horas a 20°C. El gel se coloca en un recinto que permite eliminar el exceso de amoníaco con un absorbente de amoníaco y de humedad para obtener una película de un grosor próximo a 40 µm. La película se puede utilizar tal cual o reticulada por inmersión en un baño de formaldehído, glutaraldehído, glicógeno oxidado, amilopectina oxidada de diversas concentraciones durante unos tiempos que pueden variar entre 2 minutos y 24 h. Los reticulantes son desactivados por inmersión de la película en una solución de glicina 0,1 M; pH 8 durante 2 horas. La película se seca de nuevo a continuación.

Por ejemplo, la película obtenida después del primer secado se sumerge durante 1 h en un baño de formaldehído al 0,1%, pH 8 y después se aclara en un baño de glicina 0,1 M pH 8 durante 2 horas. Después de un aclarado con agua, la película se seca de nuevo.

Ejemplo 4: Preparación de una membrana de colágeno reticulado nº 2

Para la obtención de una membrana que contiene 10 mg de colágeno/cm², se ponen en suspensión 100 g de colágeno en 12,5 l de agua bajo agitación mecánica durante 16 horas. Paralelamente, se preparan 2,5 g de glicógeno oxidado disuelto al 15% en tampón fosfato pH 7,7 y se añaden a la suspensión al final de las 16 horas. Después de la homogeneización, la solución se vierte en un molde de 1 m² (o equivalente). El o los moldes que contienen la solución de colágeno se colocan en un recinto cerrado herméticamente de 300 l aproximadamente que contiene 160 ml de amoníaco 32% repartidos de manera homogénea durante 48 horas a 20°C. Al final de la fase de fibrilación, reticulación, el o los geles se colocan en un recinto que permite eliminar el exceso de amoníaco con un absorbente de amoníaco y de humedad para obtener una membrana de grosor próxima a 100 µm.

Ejemplo 5: Medición de la tasa de hinchamiento de una membrana preparada en el ejemplo 4

Se pesan de manera precisa 3 muestras de 20,5/22 y 20 mg de producto, y se sumergen en 3 ml de PBS 1X pH 7,4 durante 1 hora a 37°C. Al final de la hora, se retira el exceso de agua de cada muestra y se pesan de nuevo las muestras. Los resultados son los siguientes:

	Masa extraída (mg)	Masa después del hinchamiento (mg)	Tasa de hinchamiento
Muestra 1	20,5	110	5,5
Muestra 2	22	127,6	5,8
Muestra 3	20	114	5,7
Media			5,66

Ejemplo 6: Esponja de colágeno fibroso ácido reticulado por las amilopectinas oxidadas

Se obtiene una solución acuosa de colágeno fibroso ácido mezclando 0,8 g en 100 ml de agua. El medio se agita durante 16 horas a 20°C. Se calientan 28 mg de amilopectina que contiene 1,4 moles de aldehídos/moles de sacáridos a 75°C en 1 ml de tampón fosfato 0,1 M, pH 7,7 hasta disolución completa. Después del enfriamiento a 20°C, esta solución se vierte bajo agitación en la solución de colágeno al 0,8%. El medio homogéneo se vierte en un molde sobre una altura de 5 mm y se transfiere a un recinto cerrado herméticamente de un volumen de aproximadamente 3 l que contiene 3 ml de amoníaco al 28% durante 16 horas. El dispositivo que contiene el gel se coloca después en un recinto herméticamente cerrado que contiene un absorbente de amoníaco hasta la desaparición total del amoníaco en el recinto. El gel de colágeno se congela a continuación y se liofiliza para dar una esponja de atelocolágeno reticulado.

Ejemplo 7: Medición de la homogeneidad de reticulación

Un gel de aproximadamente 1 cm de grosor se ha preparado mediante el procedimiento descrito en el ejemplo 4 hasta la etapa de reticulación.

Al final de esta etapa de reticulación, el gel se desmoldó, se cortó en dos, aproximadamente hacia el centro, en el sentido horizontal y los dos fragmentos se secaron separadamente.

Una muestra "externa" y una muestra "interna" de material (aproximadamente 10 mg cada una) se extraen respectivamente sobre lo que corresponde a la parte externa y a la parte interna del gel.

La tasa de reticulación se determina mediante una dosificación de las aminas que han permanecido libres en el colágeno por TNBS (ácido 2,4,6-trinitrobenzeno sulfónico). Este reactivo TNBS reacciona específicamente sobre las aminas de los residuos lisina y de los aminoácidos terminales libres.

Se extraen las muestras interna y externa y se incuban en una solución agua - propanol (1 ml) a 60°C durante 1 h. Se añaden 500 µl de bicarbonato al 8% y 1 ml de TNBS diluido a 1/120ª. La reacción tiene lugar durante 3 horas a 40°C.

Después del enfriamiento, se añaden 200 µl de HCl 6 N para detener la reacción. El exceso de TNBS se extrae por 5 ml de acetato de etilo. Una hidrólisis ácida (3 ml de HCl 6 N durante 1 h 15) libera todos los aminoácidos. Se extraen los aminoácidos terminales N-TNBS de la misma manera que para el exceso de TNBS.

Después de una dilución adecuada, se mide la absorbancia de la fase a 345 nm. El coeficiente de extinción molar del complejo a 345 nm, medido según el protocolo descrito por Kakade *et al.* es de $1,46 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, permite calcular la cantidad de lisina que ha permanecido libre en la membrana. El resultado se expresa en µmol de lisina libre por mg de membrana.

Para una membrana reticulada con glicógeno oxidado a razón de 0,4 CHO del glicógeno oxidado para 1 NH₂, los resultados son los siguientes:

	µmol de lisina libres/mg de membrana
Muestra externa	0,161
Muestra interna	0,150

La diferencia de reticulación es por lo tanto de 3,5%, es decir $((0,161 - 0,150)/(0,161 + 0,150) \times 100)$. Las tasas de reticulación de la parte externa y de la parte interna son por lo tanto sustancialmente equivalentes. La reticulación está por lo tanto sustancialmente homogénea sobre todo el grosor del material.

Ejemplo 8: Medición de la reticulación

Se ha preparado una membrana denominada "reticulada" según el protocolo descrito en el ejemplo 4, incluyendo la etapa de adición del amoníaco.

Se ha preparado una membrana denominada "no reticulada" según el procedimiento descrito en el ejemplo 4 en el que se ha omitido la etapa de adición del amoníaco.

La reticulación se puede caracterizar mediante una medición de DSC (Differential Scanning Calorimetry o calorimetría diferencial por barrido). Este método mide las diferencias de los intercambios de calor entre una muestra a analizar y una referencia.

Permite determinar las transiciones de fase:

- la temperatura de transición vítrea (T_g)

- las temperaturas de fusión o desnaturalización
- las entalpías de reacción (para conocer las tasas de reticulación de los polímeros).

5 Los análisis se realizan bajo barrido de un gas inerte (por ejemplo nitrógeno o argón) para evitar cualquier reacción del material a estudiar con la atmósfera del horno.

10 En lo referente a un colágeno, la reticulación provoca el aumento de la temperatura de desnaturalización. Para demostrar que la incubación de la solución de colágeno que contiene el reticulante en unos vapores de amoníaco conduce a la formación de enlaces químicos estables de reticulación entre el colágeno y el reticulante. Se ha efectuado el perfil en DSC de una membrana reticulada y una membrana no reticulada.

	Temperatura de desnaturalización (°C)
Membrana reticulada	49,62
Membrana no reticulada	42,37

15 La temperatura de desnaturalización de la membrana reticulada es por lo tanto muy superior a la de la membrana no reticulada. La reacción entre el reticulante aldehídico y el colágeno tiene lugar por lo tanto durante la incubación de las soluciones en los vapores de amoníaco.

Referencias

20 Forest PO, Karoum R, Gagnieu CH. Influence of gradual introduction of hydrophobic groups (stearic acid) in denatured atelocollagen on fibroblasts behavior in vitro, J Biomed Mater Res A. 2007 Mar 1;80(3):758-67.

Gagnieu CH, Forest PO. In vivo biodegradability and biocompatibility of porcine type 1 atelocollagen newly crosslinked by oxidized glycogen, Biomed Mater Eng. 2007;17(1): 9-18).

25 Rousseau, C.F. y C.H. Gagnieu, In vitro cytocompatibility of porcine type I atelocollagen crosslinked by oxidized glycogen. Biomaterials, 2002. 23(6): p. 1503-10.

Kakade ML., Liener IE, Détermination of available lysine in proteins, Anal Biochem, 1969; 27(2): 273-280

30 Referencias de patente

WO 2007/147739
FR 2 810 889
FR 2 877 669
35 EP 0 862 468
US nº 4.931.546

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de preparación de un material de colágeno, caracterizado por que comprende las etapas siguientes:
- 5
- a) preparación de una solución acuosa de colágeno nativo o desnaturalizado en forma ácida,
 - b) adición de un agente de reticulación aldehídico no reactivo a pH ácido,
 - c) moldeo o vertido de la solución acuosa de colágeno,
 - d) coagulación y reticulación de la solución acuosa de colágeno por tratamiento con amoniaco gaseoso,
 - 10 e) eliminación del amoniaco en exceso y obtención del material de colágeno por secado.
2. Procedimiento de preparación de un material de colágeno según la reivindicación 1, caracterizado por que la solución acuosa de la etapa a) comprende de 0,05 a 3% en peso de colágeno en forma ácida.
- 15
3. Procedimiento de preparación de un material de colágeno según la reivindicación 1 o 2, caracterizado por que la solución acuosa de la etapa a) se prepara con colágeno fibroso ácido seleccionado de entre los colágenos de tendones de cerdo, de tendones de ternera, de tendones de cordero y de tendones de potro.
- 20
4. Procedimiento de preparación de un material de colágeno según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que en la etapa d) la coagulación y la reticulación de la solución de colágeno se efectúan por tratamiento con amoniaco gaseoso durante por lo menos 24 horas.
- 25
5. Procedimiento de preparación de un material de colágeno según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que el agente de reticulación aldehídico se selecciona de entre el glicógeno y las amilopectinas aldehídicas.
- 30
6. Procedimiento de preparación de un material de colágeno según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que el agente de reticulación aldehídico es glicógeno oxidado.
- 35
7. Procedimiento de preparación de un material de colágeno según cualquiera de las reivindicaciones 5 o 6, caracterizado por que el agente de reticulación aldehídico se añade en unas proporciones que van de 0,05 a 5 para la relación CHO entre el agente de reticulación aldehídico y NH_2 del colágeno.
- 40
8. Procedimiento de preparación de un material de colágeno según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado por que el material de colágeno es una membrana, por que en la etapa c) la solución acuosa de colágeno se deposita en un molde plano, y por que en la etapa e) se elimina el amoniaco en exceso y se obtiene una membrana de colágeno por secado.
- 45
9. Material de colágeno obtenido mediante el procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que presenta una reticulación homogénea, que presenta una diferencia entre la reticulación en la superficie exterior y la reticulación en el interior del material inferior o igual al 25%.
- 50
10. Material de colágeno según la reivindicación 9, que presenta una temperatura de desnaturalización superior o igual a 3°C con respecto al material de colágeno no reticulado.
- 55
11. Material de colágeno reticulado según cualquiera de las reivindicaciones 9 o 10, que presenta un aumento de la temperatura de desnaturalización con respecto al material no reticulado de por lo menos 5%.
- 60
12. Material de colágeno según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, que consiste en una membrana de colágeno, una película de colágeno, un hilo de colágeno, un tubo de colágeno, una esponja de colágeno o un gel de colágeno.
13. Material de colágeno según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, que consiste en una membrana de colágeno que tiene un grosor seco comprendido entre 80 y 120 μm , una densidad comprendida entre 12 mg/cm^2 y 16 mg/cm^2 , una tasa de hinchamiento inferior a 6, una resistencia a la sutura superior a 1 N, una tensión a la ruptura superior a 4 MPa y un porcentaje de degradación enzimático a la tripsina inferior al 35%.
14. Material compuesto que comprende un textil recubierto sobre una de sus caras o sobre cada una de sus caras por un material tal como el descrito según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, en particular el textil puede estar incluido en el material de colágeno.