

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 561 094**

51 Int. Cl.:

A61L 27/24 (2006.01)

A61L 27/36 (2006.01)

A61L 27/58 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.07.2012** **E 12748084 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.01.2016** **EP 2736545**

54 Título: **Productos de tejidos reticulados humanos o animales y sus métodos de fabricación y uso**

30 Prioridad:

28.07.2011 US 201161512801 P

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

24.02.2016

73 Titular/es:

HARBOR MEDTECH, INC. (100.0%)
4 Jenner, Suite 190
Irvine, CA 92618, US

72 Inventor/es:

MEZGER, W. JERRY y
MYERS, KEITH E.

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 561 094 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

Productos de tejidos reticulados humanos o animales y sus métodos de fabricación y uso

5 **Antecedentes de la invención****Campo de la invención**

10 Las realizaciones de la presente invención se dirigen a controlar un proceso de reticulación de colágeno para crear productos reticulados con velocidades de degradación adaptables para fines médicos. Las realizaciones adicionales se dirigen a productos tales como sustitutos de la piel y mallas quirúrgicas fabricadas a partir de tales procesos y a métodos para usar tales productos en procedimientos médicos tales como tratar heridas crónicas, cicatrizado suplementario, soporte tisular y cirugía reconstructiva.

15 **Descripción de la técnica relacionada**

Muchos productos médicos se componen de materiales basados en tejidos humanos o animales. Los ejemplos de estos productos médicos incluyen, por ejemplo, válvulas cardíacas, injertos vasculares, prótesis de vejiga urinaria, prótesis de tendón, parches de hernia, mallas quirúrgicas y sustitutos de la piel. Una ilustración de un producto basado en un tejido humano o animal específico es la prótesis de válvula cardíaca. Las prótesis de válvula cardíaca se fabrican normalmente a partir de válvulas aórticas porcinas o bien de pericardio bovino. Tales válvulas se fabrican normalmente pretratando el tejido con glutaraldehído u otros agentes de reticulación y cosiendo el tejido en una aleación metálica flexible o una endoprótesis vascular polimérica. Estos materiales de partida tisulares animales consisten principalmente en colágeno, que proporciona a los tejidos su resistencia mecánica y su flexibilidad necesarias.

Los materiales basados en colágeno, incluyendo el tejido completo, están encontrando un uso aumentado en la fabricación de dispositivos biomédicos, tales como implantes protésicos. El colágeno es una proteína de origen natural con buena biocompatibilidad. Es el principal componente estructural de los vertebrados, formando fibras extracelulares o redes en prácticamente cada tejido del cuerpo, incluyendo piel, hueso, cartílago y vasos sanguíneos. Como un componente natural de la matriz extracelular, el colágeno proporciona un buen medio fisiológico isotrópico que promueve el crecimiento y la función de diferentes tipos celulares y facilita un rápido sobrecrecimiento del tejido hospedador en dispositivos médicos después de la implantación.

35 Básicamente pueden identificarse tres tipos de materiales basados en colágeno, basándose en las diferencias en la pureza y la integridad de la red de haces de fibras de colágeno inicialmente presentes en el material. El primer tipo incluye el tejido completo incluyendo sustancias distintas de colágeno o células. Como resultado de usar el tejido completo, la composición de origen natural y la fuerza y la estructura nativas de la red de haces de fibras de colágeno se preservan. Los xenoinjertos de tejido completo se han usado en la construcción de prótesis de válvulas cardíacas y en muchas otras prótesis biomédicas. Sin embargo, la presencia de proteínas solubles, glucoproteínas, glucosaminoglucanos y componentes celulares en tales xenoinjertos de tejido completo pueden inducir una respuesta inmunológica del organismo hospedador al implante.

45 El segundo tipo de material basado en colágeno incluye solamente la matriz de colágeno sin las sustancias distintas de colágeno. La estructura de origen natural de la red de haces de fibras de colágeno se preserva de esta manera, pero la actividad antigénica de los materiales se reduce. Los materiales de colágeno fibrosos obtenidos retirando las sustancias distintas de colágeno antigénicas tendrán generalmente propiedades mecánicas adecuadas.

50 El tercer tipo de material basado en colágeno es colágeno fibroso purificado. El colágeno purificado se obtiene a partir del tejido completo dispersando o solubilizando en primer lugar el tejido completo por acción mecánica o bien enzimática. La dispersión o la solución de colágeno se reconstituye después por secado al aire, liofilizado o bien precipitado del colágeno. De este modo puede obtenerse a partir del colágeno diversas formas geométricas como láminas, tubos, esponjas o fibras. Los materiales resultantes, sin embargo, no tienen la resistencia mecánica de la estructura de colágeno fibroso de origen natural.

55 Un problema principal en el uso de materiales basados en colágeno para la implantación y especialmente los xenoinjertos de tejido completo en los que el donante y el receptor son filogenéticamente distantes, es que estos materiales son propensos al rechazo agudo. Esto es una reacción inmunológica rápida y violenta que da lugar a la destrucción del xenoinjerto. Para usar los materiales basados en colágeno en dispositivos médicos fabricados, particularmente implantes bioprotésicos, su durabilidad y su rendimiento *in vivo* normalmente necesitan protegerse de una reacción inmunológica aguda. Esto puede realizarse reticulando los materiales basados en colágeno para suprimir la capacidad antigénica del material para prevenir la reacción de rechazo agudo. Además, la reticulación se usa para conservar o incluso mejorar las propiedades mecánicas y para potenciar la resistencia a la degradación.

65 La reticulación puede realizarse por medio de métodos físicos, incluyendo, por ejemplo, radiación UV y reticulación deshidrotérmica. Estos métodos dan como resultado una reticulación directa pero generalmente de baja densidad.

Se conocen varios métodos de reticulación química para materiales basados en colágeno. Estos métodos implican la reacción de un reactivo bifuncional con los grupos amina de los restos lisina o hidroxilisina en diferentes cadenas polipeptídicas o la activación de grupos carboxilo de restos ácido glutámico y aspártico seguido de la reacción con un grupo amina de otra cadena polipeptídica para dar un enlace amina.

En comparación con otros métodos conocidos, la reticulación con glutaraldehído (GA) del colágeno proporciona materiales con el mayor grado de reticulación. Es actualmente el reactivo de reticulación química más frecuentemente usado para los materiales basados en colágeno. El glutaraldehído es un dialdehído. El aldehído es capaz de interactuar químicamente con grupos amino del colágeno para formar enlaces químicos. Este agente de reticulación está fácilmente disponible, es barato y forma soluciones acuosas que pueden reticular eficazmente tejidos en un periodo relativamente corto. Usando reticulación con GA, pueden lograrse resistencia aumentada a la biodegradación, capacidad antigénica reducida y propiedades mecánicas mejoradas de los materiales basados en colágeno. A pesar de la aceptación del hospedador probada, la reticulación de materiales basados en colágeno usando GA ha demostrado tener características citotóxicas, tanto *in vitro* como *in vivo*. Además, la reticulación de materiales basados en colágeno usando GA tiende a dar como resultado un endurecimiento del material y calcificación.

La reticulación también puede conseguirse con diisocianatos uniendo grupos amina en dos cadenas polipeptídicas adyacentes. En la primera etapa, se da la reacción del grupo isocianato con un grupo amina (hidroxil)lisina, dando como resultado la formación de un enlace urea. A partir de entonces se forma una reticulación por la reacción del segundo grupo isocianato con otro grupo amina. Los diisocianatos no muestran reacciones de condensación como se observa en la reticulación con GA. Además, no quedan reactivos residuales en el material. Una desventaja, sin embargo, es la toxicidad de los diisocianatos y la solubilidad en agua limitada de la mayoría de diisocianatos.

Otro método de reticulación implica la formación de una azida de acilo. El método de la azida de acilo implica la activación de grupos carboxilo en la cadena polipeptídica. Los grupos activados forman reticulaciones reaccionando con los grupos amina del colágeno de otra cadena. En primer lugar, los grupos carboxilo se esterifican reaccionando con un alcohol. Este éster se convierte después en una hidrazida reaccionando con hidracina ($\text{H}_2\text{N}-\text{NH}_2$). Los grupos azida de acilo se forman reaccionando con una solución ácida de nitrito sódico. A bajas temperaturas y a valores de pH básicos, el grupo azida de acilo reacciona con un grupo amina primaria para dar enlaces amida. Esta reacción multi-etapa da como resultado buenas propiedades del material; sin embargo, son necesarios tiempos de reacción largos (por ejemplo, 7 días). De forma alternativa, se ha desarrollado recientemente un método que no necesita una etapa de esterificación o el uso de hidracina. En este método, un grupo carboxilo se convierte en un grupo azida de acilo en una única etapa reaccionando con difenilfosforilazida (DPPA). Esto aumenta la velocidad de reacción significativamente; sin embargo, la reacción se lleva a cabo en un disolvente orgánico (por ejemplo, DMF), que es indeseable.

Además, pueden usarse carbodiimidas solubles en agua para activar los grupos carboxilo libres de los restos ácido glutámico y aspártico en el colágeno. La activación de los grupos carboxilo con las carbodiimidas, tales como 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida.HCl (EDC) da grupos O-acilisourea. Una reacción de condensación por ataque nucleofílico de un grupo amina libre de un resto de (hidroxil)lisina con urea como un grupo saliente da como resultado la formación de una reticulación amida. La O-acilisourea puede hidrolizarse también o redisponearse a una N-acilurea, que es mucho más estable y no reaccionará para formar una reticulación. Sin embargo, la adición de N-hidrosuccinimida (NHS) previene esta redistribución. En presencia de NHS, la O-acilisourea puede convertirse en un grupo carboxilo activado NHS, que también puede reaccionar con un grupo amina libre para formar una reticulación. La adición de NHS aumenta la velocidad de reacción. Además, la reticulación con EDC y NHS proporciona material de colágeno con un alto grado de reticulación; sin embargo, también da como resultado un material con una baja resistencia a la tracción.

Todavía otro método de reticulación usa compuestos epoxi para reticular colágeno. Véase, por ejemplo, los documentos de Patente de EEUU n.º 4.806.595 (Noishiki et al.), n.º 5.080.670 (Imamura et al.), n.º 5.880.242 (Hu et al.), n.º 6.117.979 (Hendriks et al.) y n.º 7.918.899 (Girardot et al.). Los compuestos epoxi (es decir, los epóxidos) pueden someterse tanto a reacciones catalizadas por ácidos y catalizadas por bases con un número de grupos funcionales, incluyendo grupos amina y grupos ácido carboxílico, en las condiciones apropiadas. Normalmente, la reticulación del colágeno con los epóxidos se lleva a cabo a un pH básico (por ejemplo, pH 8-10) con el resultado de que la reticulación se da a través de los grupos amino libres del colágeno.

El objeto común a todos estos métodos de reticulación es "reticular completamente" el colágeno (generalmente considerado como lograr reticulaciones entre al menos el 80 % de las moléculas de colágeno) para crear productos con baja inmunogenicidad y una alta resistencia al ataque enzimático por el cuerpo hospedador (y por lo tanto durabilidad a muy largo plazo). Sin embargo, se mantiene una necesidad de crear productos, específicamente materiales basados en colágeno, que tengan gran durabilidad (definida como retención de alta resistencia después del implante) pero cuyo fin sea degradarse durante la cicatrización de tal manera que se disuelvan completamente en esencia cuando el proceso de cicatrizado se complete.

El documento US2006/159641 A describe un método para producir un tejido biológico reticulado que comprende tratar un tejido mientras que se controla la reticulación para producir un tejido parcial o mínimamente reticulado y haciendo contactar el tejido con una solución de bloqueo que comprende un agente de bloqueo.

- 5 El documento WO02/49687 A describe un tratamiento de un tejido con un agente de reticulación, que incluye variar el pH desde un pH inicial de 1-3 hasta un pH final de 5-8 durante un tiempo de 30 min a 6 h.

10 El documento WO99/27979 A describe un método para preparar un tejido biológico fijado, que comprende reticular el tejido con glutaraldehído y poner en contacto simultánea o separadamente el material reticuladoo con un éter de poliglicidilo.

A pesar de la amplia diversidad de agentes de reticulación disponibles, los perfiles de degradación de los materiales de colágeno protésicos actualmente en uso para la reconstrucción quirúrgica general caen dentro de solamente dos categorías: 1) aquellos materiales de colágeno protésicos que se bioreabsorben rápidamente cuando están en uso o 2) aquellos materiales de colágeno protésicos que duran más de un año en uso y, para todos los intentos y fines, no son bioreabsorbibles. Dentro de la categoría de los materiales rápidamente bioreabsorbidos, dominan dos clases de materiales de colágeno bioprotésicos. El primero de tales materiales son materiales basados en colágeno que no se han reticulado (por ejemplo colágeno nativo). El segundo es colágeno que está completamente reticulado pero con reticulaciones que son hidrolizables, tales como reticulaciones basadas en éster. Generalmente, los materiales de colágeno rápidamente bioreabsorbibles tienen una duración funcional de 6 a 8 semanas en condiciones *in vivo* normales (tales como en una herida o un sitio quirúrgico). El tiempo tomado para reabsorberse puede ser incluso menor en medios más proteolíticos tales como en heridas crónicas tales como las úlceras de pie diabéticas. Durante la biodegradación, estos materiales de colágeno rápidamente bioreabsorbibles normalmente pierden resistencia prematuramente y otras características funcionales importantes antes de que la herida cicatrice completamente, de esta manera comprometiendo el éxito a largo plazo del procedimiento médico.

Las matrices de colágeno extracelular no bioreabsorbibles son materiales reticulados por completo históricamente con reticulaciones no hidrolizables. Los ejemplos típicos incluyen colágeno que tiene reticulaciones basadas en aminos. La reticulación basada en aminos proporciona un material que no es bioreabsorbible en el medio biológico *in vivo*. Los materiales de colágeno extracelular completamente reticulados con reticulaciones no hidrolizables tienden a durar muchos años, si no toda una vida, cuando se usa para la reparación o la reconstrucción quirúrgica. Como tales materiales retienen la resistencia durante el proceso de cicatrizado, su larga presencia puede ser problemática.

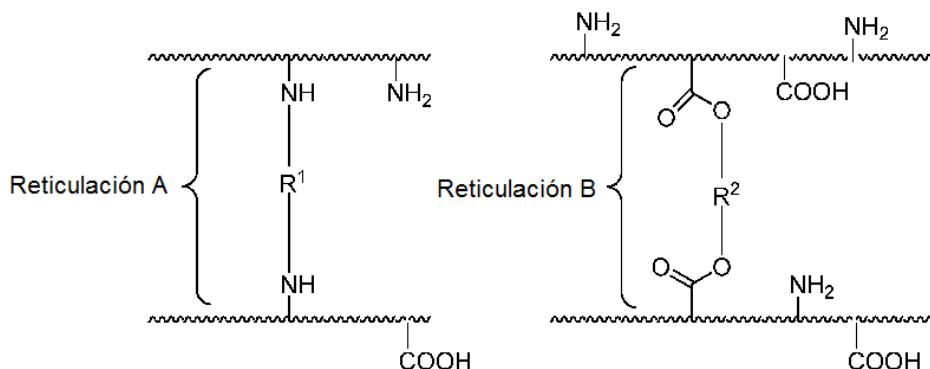
35 Sumario de la invención

Dadas las limitaciones de los actuales biomateriales basados en colágeno, ciertas realizaciones de la presente solicitud proporcionan métodos para sintetizar bioprótesis degradables (o individualmente una bioprótesis degradable), composiciones de bioprótesis degradables, productos fabricados a partir de las mismas y métodos para usar dichos productos y composiciones. Algunas realizaciones proporcionan un método para producir una bioprótesis degradable. En una realización, un método comprende proporcionar un material basado en colágeno, exponer el material basado en colágeno a una primera solución tamponada con un pH entre 8,0 y 10,5 (o entre aproximadamente 8,0 a aproximadamente 10,5) durante un primer periodo de tiempo para proporcionar un material tratado basado en colágeno, en el que la primera solución tamponada comprende una concentración de un primer agente de reticulación, exponer el material tratado basado en colágeno a una segunda solución tamponada con un pH entre aproximadamente 3,0 y aproximadamente 5,5) durante un segundo periodo de tiempo para proporcionar un material basado en colágeno reticulado adaptable, en el que la segunda solución tamponada comprende una concentración de un segundo agente de reticulación y aislar el material basado en colágeno reticulado adaptable para proporcionar una bioprótesis degradable. En algunas realizaciones, se proporciona una bioprótesis producida por el método anterior.

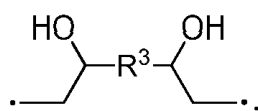
Otra realización de un método para producir una bioprótesis degradable comprende proporcionar un material basado en colágeno y reticular de manera controlable el colágeno de tal manera que solamente se entrecruce una porción del colágeno. En algunas realizaciones se proporciona una bioprótesis producida mediante el método anterior. A continuación se describen otros métodos para producir una bioprótesis biodegradable.

En algunas realizaciones, se proporciona un material basado en colágeno reticulado. En una realización, se proporciona un material basado en colágeno reticulado que comprende la Reticulación A y la Reticulación B representados por

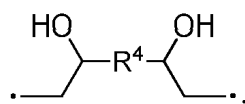
60



en las que $\sim$ indica hebras de colágeno, R^1 es

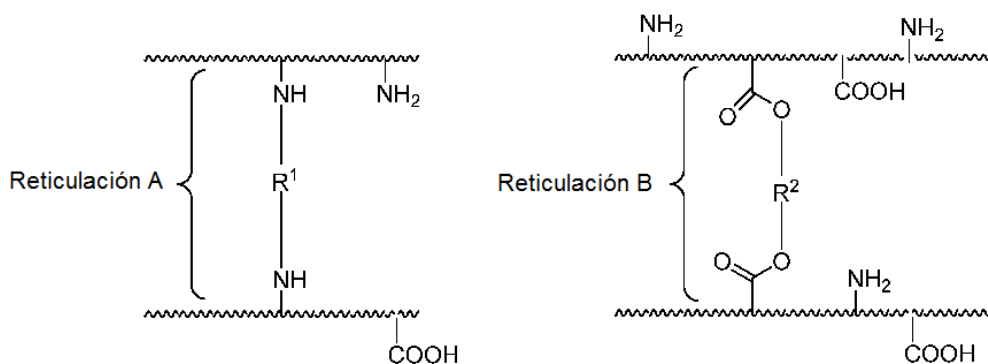


R^2 es

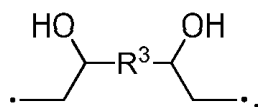


y R^3 y R^4 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en $-(CH_2)_n-$ y $-CH_2(O(CH_2)_n)_m-OCH_2-$ donde n y m son independientemente un número entero de 1-6 y la cantidad de aminas libres ($-NH_2$) en las hebras de colágeno está entre un 50 % y un 85 % (o entre aproximadamente un 50 % y aproximadamente un 85 %). A continuación se describen otros métodos para producir una bioprótesis biodegradable.

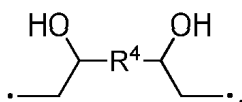
Algunas realizaciones proporcionan una bioprótesis que comprende un material basado en colágeno reticulado que comprende la Reticulación A y la Reticulación B:



en las que $\sim$ indica hebras de colágeno, R^1 es



R^2 es



y R^3 y R^4 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en $-(\text{CH}_2)_n-$ y $-\text{CH}(\text{O}(\text{CH}_2)_n)-\text{OCH}_2-$ donde n y m son independientemente un número entero de 1-6 y la cantidad de aminas libres ($-\text{NH}_2$) en las hebras de colágeno está entre un 50 % y un 85 % (o entre aproximadamente un 50 % y aproximadamente un 85 %).

Algunas realizaciones proporcionan una bioprótesis degradable que comprende un material adaptable basado en colágeno reticulado. En una realización, un material basado en colágeno comprende hebras de colágeno que comprenden adicionalmente reticulaciones basadas en aminas y reticulaciones basadas en ésteres y el material adaptable basado en colágeno reticulado tiene una velocidad de degradación de entre un 0,2 % y un 1,0 % (o entre aproximadamente un 0,2 % y aproximadamente un 1,0 %) por hora cuando se somete a un ensayo de digestión con pronasa. A continuación se describen otros métodos para producir una bioprótesis biodegradable.

En otra realización, se proporciona una bioprótesis biodegradable que comprende un sustituto biológico de la piel que comprende colágeno que está reticulado entre un 20 % y un 80 % (o entre aproximadamente un 20 % y aproximadamente un 80 %).

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es un diagrama de flujo que representa una realización del método para sintetizar una bioprótesis adaptable basada en colágeno reticulado.

La Figura 2 representa una realización del material basado en colágeno reticulado producido usando el proceso descrito en el presente documento.

La Figura 3 es un diagrama que muestra la temperatura de contracción para los Ejemplos 1-7 y el colágeno nativo.

La Figura 4 es un diagrama que muestra la resistencia a la digestión con proteasa de los Ejemplos 1-7 y del colágeno nativo.

La Figura 5 es un diagrama de flujo que muestra las velocidades de degradación (en % de pérdida de masa por hora) de los Ejemplos 1-7 y del colágeno nativo.

Descripción detallada de ciertas realizaciones de la invención

La presente divulgación se refiere a composiciones y métodos para sintetizar y usar tejido animal o humano basado en colágeno reticulado adaptado para producir dispositivos bioprotésicos con velocidades de degradación adaptadas.

Como se usa en el presente documento, la frase "material basado en colágeno" se refiere a materiales que se han extirpado de tejido animal o humano, que pueden o pueden no estar reticulados. Dependiendo del nivel del procesamiento del tejido natural, los materiales basados en colágeno pueden incluir colágeno, tropocolágeno, fibrillas de colágeno o fibras de colágeno. El colágeno existe como una triple hélice de cadenas de aminoácidos. Estas triples cadenas helicoidales, denominadas tropocolágeno, se ensamblan adicionalmente para formar fibrillas de colágeno. Estas fibrillas de colágeno se ensamblan para formar fibras de colágeno.

Como se usa en el presente documento, la frase "hebra de colágeno" se refiere al tropocolágeno, a las fibrillas de colágeno y/o a las fibras de colágeno. Las hebras de colágeno tienen grupos colgantes amina ($-\text{NH}_2$) y ácido carboxílico ($-\text{COOH}$) que son reactivos. Estas aminas y grupos ácido carboxílico se reticulan fácilmente entre las hebras de colágeno con diversos agentes de reticulación para formar estructuras con propiedades medias mejoradas. La reticulación puede realizarse tomando ventaja de los grupos reactivos colgantes en la hebra de colágeno.

Como se usa en el presente documento, la frase "tiempo de degradación" se refiere a la cantidad de tiempo que toma un material basado en colágeno para degradarse completamente o para degradarse hasta un grado tal que ya no sirva más para el fin que se pretendía médicamente.

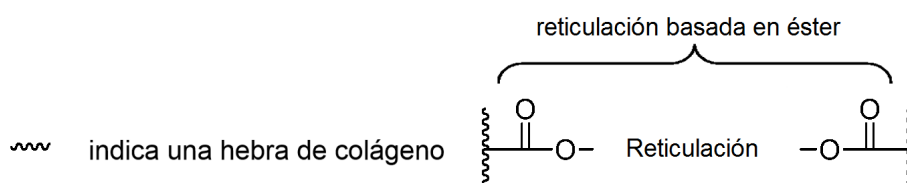
Como se usa en el presente documento, el término "diepóxido" se refiere a un compuesto que tiene dos funcionalidades epóxido reactivas. Los epóxidos se han usado durante mucho tiempo como agentes de reticulación para el colágeno porque, cuando reaccionan completamente, la reticulación de epóxido reduce la inmunogenicidad del colágeno mientras que mejora las propiedades físicas del material. Los diepóxidos útiles pueden incluir, pero no se limitan a, éter diglicidílico de glicol, éter diglicidílico de glicerol, éter diglicidílico de butanodiol, éter diglicidílico de resorcinol, éter diglicidílico de 1,6-hexanodiol, éter diglicidílico de etilenglicol, éter diglicidílico de dietilenglicol, éter diglicidílico de trietilenglicol, éter diglicidílico de polietilenglicol, éter diglicidílico de propilenglicol, éter diglicidílico de dipropilenglicol y éter diglicidílico de polibutadieno. Un ejemplo del diepóxido que puede usarse para reticular hebras de colágeno es éter diglicidílico de 1,4-butanodiol (BDDGE).

Como se usa en el presente documento, la frase "agente de reticulación" puede referirse a diepóxidos o compuestos con tres o más grupos funcionales epóxido. Los agentes de reticulación útiles pueden incluir, pero no se limitan a, los diepóxidos anteriormente mencionados, éter triglicídico de glicerol, éter poliglicídico de sorbitol, éter poliglicídico de poliglicerol, éter poliglicídico de pentaeritritol, éter poliglicídico de diglicerol, éter poliglicídico de glicerol y éter poliglicídico de trimetilolpropano.

Una necesidad sin cubrir en el área de la cicatrización de heridas, la cirugía general y la cirugía ortopédica es un material basado en colágeno que pueda adaptarse para degradarse en intervalos, por ejemplo, más de 8 semanas pero menos de 1 año. Esta velocidad de degradación adaptada puede hacer que se comporte como el ciclo de cicatrización de cada afección específica. Los ejemplos de estas afecciones incluyen procedimientos tales como reparación de hernias, cicatrizado de úlcera diabética de pie y reparaciones de tendones ortopédicas por nombrar sólo unas pocas. Las realizaciones de la presente invención son objetivos hacia composiciones que tengan tiempos de degradación adaptables.

Algunas realizaciones de la presente invención se dirigen hacia el control de la relación de los reticulaciones basadas en aminas a los reticulaciones basadas en ésteres dentro de un material basado en colágeno para proporcionar un material adaptable basado en colágeno reticulado. Los inventores de la presente invención han encontrado sorprendentemente que controlando el pH y el tiempo de reacción durante la reticulación de los materiales basados en colágeno usando epóxidos, puede obtenerse un material adaptable basado en colágeno reticulado. Sin desear quedar ligados a teoría alguna, los presentes inventores han descubierto que controlando el pH de la reacción, la relación de reticulación basada en amina (Reticulación A) al reticulación basada en éster (Reticulación B) en un material basado en colágeno puede controlarse para producir una bioprótesis con una velocidad de degradación controladamente adaptada. Como se ha mencionado previamente, los reticulaciones basadas en aminas forman enlaces estables. De esta manera, cuanto mayor sea la relación de los reticulaciones basadas en aminas, menor será la velocidad de degradación de los materiales basados en colágeno. De forma alternativa, los reticulaciones basadas en ésteres se hidrolizan rápidamente *in vivo*. De esta manera, cuanto mayor sea la relación de los reticulaciones basadas en ésteres, mayor será la velocidad de degradación de los materiales basados en colágeno. Manipulando la relación de reticulaciones basadas en aminas y en ésteres, la velocidad de degradación puede ajustarse de forma adaptada a franjas de tiempo clínicamente relevantes.

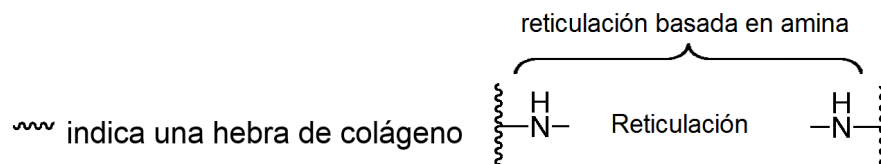
En algunas realizaciones, se ha demostrado que el diepóxido BDDGE reticula completamente el colágeno a una concentración del 4 % en peso a volumen, un pH por debajo de 6 y un tiempo de reacción de 160 horas. Como se usa en el presente documento, la frase "% en peso a volumen" o "% p/v" se refiere al peso de soluto (g) / volumen de solución (ml) x 100. Se cree que a un pH bajo (por ejemplo, pH 3,0-5,5), la reticulación se da principalmente a través de una reacción de carboxilatos en la hebra de colágeno con epóxidos en el BDDGE. A pH bajo, se cree que los ácidos carboxílicos de la hebra de colágeno son más nucleofílicos que los grupos amina de la hebra de colágeno. A pH bajo, alguna cantidad de grupo ácido carboxílico existe como un carboxilato ($-RCOO^{\ominus}$) que es en algún grado nucleofílico, mientras que el grupo amina principalmente se protona para formar un amonio primario ($-R'NH_3^{\oplus}$), que no es nucleofílico. El carboxilato, por lo tanto, actúa preferentemente como un nucleófilo en una reacción con un agente de reticulación epóxido. El grupo funcional resultante es un éster, formando de esta manera un reticulación basada en éster (como se muestra a continuación).



Los reticulaciones basadas en éster se hidrolizan fácilmente y se biorreabsorben rápidamente. De esta manera, el tiempo de degradación del colágeno que se reticula completamente con reticulaciones basadas en ésteres está cerca del colágeno nativo a alrededor de 8 semanas o menos. De esta manera, a pesar de la inmunogenicidad mejorada sobre el colágeno nativo, la reticulación a través de estos grupos éster hace poco para ralentizar la velocidad de degradación del colágeno nativo. La velocidad de degradación del colágeno se mide por un % de pérdida en la masa por unidad de tiempo medida en horas. Un experto en la materia también reconocerá que cuando se lleva a cabo un reticulación basada en diepóxido a un pH bajo, alguna cantidad de reticulaciones basadas en aminas se formará probablemente, así como reticulaciones que se basan en la reacción de tanto un carboxilato como una amina con un diepóxido (una hetero-reticulación).

También se sabe que reticular colágeno a pH 9,2 con BDDGE durante 160 horas reticulará completamente el colágeno. Se cree que esta reticulación se da principalmente a través de los grupos amina en las hebras de colágeno, que a mayor pH existen en algún grado como aminas libres altamente nucleofílicas ($-R'NH_2$). El grupo funcional resultante de la reacción de una amina con un epóxido es una amina, de esta manera esto es un

reticulación basada en amina.



Este reticulación basada en amina da lugar a un material no reabsorbible con una velocidad de degradación que excede un año *in vivo*. Debido a que el reticulación basada en amina es muy fuerte, no se degrada fácilmente en condiciones *in vivo* típicas. Un experto en la materia también reconocerá que cuando se lleva a cabo un reticulación basada en diepóxido a un pH alto, alguna cantidad de reticulaciones basadas en ésteres se formará probablemente, así como reticulaciones que se basan en la reacción de tanto un carboxilato como una amina con un diepóxido (una hetero-reticulación).

En algunas realizaciones, el tiempo de reacción es lo suficientemente largo para asegurar la reticulación sustancialmente completo de las hebras de colágeno. La reticulación sustancialmente completa de estas hebras de colágeno puede ser importante para 1) instilar el material basado en colágeno reticulado con buenas propiedades mecánicas y 2) reducir el número de grupos funcionales epóxido sin reaccionar colgantes unidos al material basado en colágeno reticulado y de esta manera disminuir la citotoxicidad. En algunas realizaciones, los tiempos de reacción son suficientes para disminuir el número de epóxidos colgantes hasta un grado tal que los materiales resultantes sean biocompatibles. De esta manera, las realizaciones de la estrategia actual dan como resultado un material reticulado que es altamente adaptable y biocompatible.

En algunas realizaciones, la relación de Reticulación A a Reticulación B puede ajustarse controlando la cantidad de tiempo que un material basado en colágeno se expone a una solución tamponada de un diepóxido a un primer pH, después controlando la cantidad de tiempo que el material tratado se expone a una segunda solución tamponada de un diepóxido a un segundo pH.

Las realizaciones de la presente invención proporcionan métodos para producir una bioprótesis degradable (por ejemplo, un implante o un dispositivo que se puede implantar, o un apósito para heridas aplicado tópicamente) que comprende un material basado en colágeno que se ha reticulado de forma controlada y se diseña intencionadamente para degradarse durante un periodo prescrito de tiempo en el cuerpo, siendo tal tiempo generalmente menor de un año. En algunas realizaciones, estos métodos también implican reticular parcialmente el material basado en colágeno. Ventajosamente, estos métodos producen un material con una capacidad de predicción y un grado repetidamente moderado de reticulación, estabildades de reticulación variables y una resistencia moderada/adaptada hacia la digestión enzimática después de la implantación.

Método para producir bioprótesis

Algunas realizaciones proporcionan un método para producir una bioprótesis degradable como se muestra en la Figura 1. La primera etapa 101 implica proporcionar un material basado en colágeno. En algunas realizaciones, el tejido animal o humano se disecciona y se somete a un proceso de descelularización para dar como resultado un material basado en colágeno. En algunas realizaciones, dependiendo del nivel de procesamiento del tejido natural, los materiales basados en colágeno pueden ser colágeno, tropocolágeno, fibrillas de colágeno o fibras de colágeno. En algunas realizaciones el material basado en colágeno se extirpa del pericardio de un animal o de un humano.

La etapa 102 implica exponer el material basado en colágeno a una primera solución tamponada que comprende un primer agente de reticulación a un primer pH durante un primer periodo de tiempo para proporcionar un material tratado basado en colágeno. En algunas realizaciones, el primer pH es suficientemente alto para dar como resultado reticulaciones que se basan en aminas principalmente. En algunas realizaciones, la primera solución tamponada tiene un pH entre 8,0 y 10,5 (o aproximadamente 8,0 a aproximadamente 10,5). En algunas realizaciones, el pH de la primera solución tamponada puede ser de 8,9 a 9,5 (o de aproximadamente 8,9 a aproximadamente 9,5), de 9,0 a 9,4 (o de aproximadamente 9,0 a aproximadamente 9,4) o de 9,1 a 9,3 (o de aproximadamente 9,1 a aproximadamente 9,3). En algunas realizaciones, el pH de la primera solución tamponada puede ser 9,2 (o aproximadamente 9,2). La concentración del primer agente de reticulación en la primera solución puede ser del 1 % al 10 % (o de aproximadamente el 1 % a aproximadamente el 10 %) (p/v), del 2 % al 8 % (o de aproximadamente el 2 % a aproximadamente el 8 %) (p/v), del 3 % al 7 % (o de aproximadamente el 3 % a aproximadamente el 7 %) (p/v) o del 4 % al 6 % (o de aproximadamente el 4 % a aproximadamente el 6 %) (p/v). En algunas realizaciones, la concentración del primer agente de reticulación en la primera solución es el 4 % (o aproximadamente el 4 %) (p/v). El primer periodo de tiempo para la reacción de reticulación depende del nivel deseado de reticulación y puede ser de 0,5 horas a 64 horas (o de aproximadamente 0,5 horas a aproximadamente 64 horas). En algunas realizaciones, el primer periodo de tiempo puede ser de 1 hora a 60 horas (o de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 60 horas), de 10 horas a 50 horas (o de aproximadamente 10 horas a aproximadamente 50 horas) o de 20 horas a 40

horas (o de aproximadamente 20 horas a aproximadamente 40 horas). En algunas realizaciones el primer periodo de tiempo puede ser de 0,5 horas a 10 horas (o de aproximadamente 0,5 horas a aproximadamente 10 horas), de 10 horas a 20 horas (o de aproximadamente 10 horas a aproximadamente 20 horas), de 20 horas a 30 horas (o de aproximadamente 20 horas a aproximadamente 30 horas), de 30 horas a 40 horas (o de aproximadamente 30 horas a aproximadamente 40 horas), de 40 horas a 50 horas (o de aproximadamente 40 horas a aproximadamente 60 horas), de 50 horas a 60 horas (o de aproximadamente 50 horas a aproximadamente 60 horas) o de 60 horas a 64 horas (o de aproximadamente 60 horas a aproximadamente 64 horas). En algunas realizaciones, el material tratado basado en colágeno comprende hebras de colágeno parcialmente reticuladas y las reticulaciones son principalmente reticulaciones basadas en aminas.

La etapa 103 implica exponer el material tratado basado en colágeno a una segunda solución tamponada que comprende un segundo agente de reticulación a un pH bajo durante un segundo periodo de tiempo para proporcionar un material adaptable basado en colágeno reticulado. El pH de la segunda solución tamponada es lo suficientemente bajo para dar como resultado reticulaciones que son principalmente basadas en ésteres. En algunas realizaciones, el pH de la segunda solución tamponada puede ser de 3,0 a 5,5 (o de aproximadamente 3,0 a aproximadamente 5,5). En algunas realizaciones, el pH de la segunda solución tamponada puede ser de 4,2 a 4,8 (o de aproximadamente 4,2 a aproximadamente 4,8), de 4,3 a 4,7 (o de aproximadamente 4,3 a aproximadamente 4,7) o de 4,4 a 4,6 (o de aproximadamente 4,4 a aproximadamente 4,6). En algunas realizaciones, el pH de la segunda solución tamponada puede ser 4,5 (o aproximadamente 4,5). La concentración del segundo agente de reticulación en la segunda solución puede ser del 1 % al 10 % (o de aproximadamente el 1 % a aproximadamente el 10 %) (p/v), del 2 % al 8 % (o de aproximadamente el 2 % a aproximadamente el 8 %) (p/v), del 3 % al 7 % (o de aproximadamente el 3 % a aproximadamente el 7 %) (p/v) o del 4 % al 6 % (o de aproximadamente el 4 % a aproximadamente el 6 %) (p/v). En algunas realizaciones, la concentración del primer agente de reticulación en la primera solución es el 4 % (o aproximadamente el 4 %) (p/v). El segundo periodo de tiempo para la reticulación puede ser de 100 horas a 160 horas (o de aproximadamente 100 horas a aproximadamente 160 horas). En algunas realizaciones, el segundo periodo de tiempo para la reticulación puede ser de 100 horas a 170 horas (o de aproximadamente 100 horas a aproximadamente 170 horas), de 110 horas a 160 horas (o de aproximadamente 110 horas a aproximadamente 160 horas), de 120 horas a 150 horas (o de aproximadamente 120 horas a aproximadamente 150 horas) o de 130 horas a 140 horas (o de aproximadamente 130 horas a aproximadamente 140 horas). En algunas realizaciones, el segundo periodo de tiempo para la reticulación puede ser de 100 horas a 110 horas (o de aproximadamente 100 horas a aproximadamente 110 horas), de 110 horas a 120 horas (o de aproximadamente 110 horas a aproximadamente 120 horas), de 120 horas a 130 horas (o de aproximadamente 120 horas a aproximadamente 130 horas), de 130 horas a 140 horas (o de aproximadamente 130 horas a aproximadamente 140 horas), de 140 horas a 150 horas (o de aproximadamente 140 horas a aproximadamente 150 horas), de 150 horas a 160 horas (o de aproximadamente 150 horas a aproximadamente 160 horas) o de 160 horas a 170 horas (o de aproximadamente 160 horas a aproximadamente 170 horas). En algunas realizaciones, el segundo periodo de tiempo para la reticulación puede realizarse durante un periodo que exceda 170 horas.

En algunas realizaciones, el segundo periodo de tiempo para la reticulación es suficiente para reducir la cantidad de epóxidos colgantes hasta el punto en que el material ya no sea citotóxico.

En algunas realizaciones, el tiempo de exposición total a la primera y a la segunda soluciones tamponadas (el total del primer periodo de tiempo y el segundo periodo de tiempo) es tal que el material adaptable basado en colágeno reticulado resultante se entrecruce sustancialmente por completo. En algunas realizaciones, el tiempo de exposición total será suficiente para producir un material que contenga una pequeña cantidad suficiente de epóxidos libres colgantes de tal manera que el material sea biocompatible. En algunas realizaciones, la suma del primer periodo de tiempo y del segundo periodo de tiempo es de 100,5 horas a 110 horas (o de aproximadamente 100,5 horas a aproximadamente 110 horas), de 110 horas a 120 horas (o de aproximadamente 110 horas a aproximadamente 120 horas), de 120 horas a 130 horas (o de aproximadamente 120 horas a aproximadamente 130 horas), de 130 horas a 140 horas (o de aproximadamente 130 horas a aproximadamente 140 horas), de 140 horas a 150 horas (o de aproximadamente 140 horas a aproximadamente 150 horas) y/o de 150 horas a 160 horas (o de aproximadamente 150 horas a aproximadamente 160 horas). En algunas realizaciones, la suma del primer periodo de tiempo y del segundo periodo de tiempo es 160 horas (o aproximadamente 160 horas). En algunas realizaciones, la suma del primer y del segundo periodos de tiempo es más largo de 160 horas.

De forma alternativa, el pH de las soluciones tamponadas y de los tiempos de reacción en las etapas 102 y 103 puede invertirse en algunas realizaciones. En algunas realizaciones, la etapa 102 se realiza antes de la etapa 103. En otras realizaciones, la etapa 102 puede seguir a la etapa 103. El material basado en colágeno puede exponerse a una solución de agente de reticulación con un pH bajo primero y después a una segunda solución de agente de reticulación con un segundo pH alto. En este caso, la primera solución tamponada tiene un pH bajo, mientras que la segunda solución tamponada tiene un pH alto.

Los agentes de reticulación de las etapas 102 y 103 (el primer agente de reticulación y el segundo agente de reticulación) pueden ser un epóxido. En algunas realizaciones, el primer agente de reticulación y el segundo agente de reticulación pueden ser diepóxido. En algunas realizaciones, el primer y el segundo agentes de reticulación se seleccionan independientemente del grupo que consiste en éter diglicídico de glicol, éter diglicídico de glicerol, éter

triglicidilo de glicerol y éter diglicidílico de butanodiol. En algunas realizaciones, el primer y el segundo agentes de reticulación son el mismo. En algunas realizaciones, el primer y el segundo agentes de reticulación son BDDGE. En algunas realizaciones, el primer y el segundo agentes de reticulación usados en la presente invención son solubles en agua, epoxis no poliméricos tales como poliglicidiléteres de poliol.

La etapa 104 implica aislar el material adaptable basado en colágeno reticulado para proporcionar una bioprótesis degradable. El material adaptable basado en colágeno reticulado comprende Reticulación A y Reticulación B. En algunas realizaciones, la relación de Reticulación A a Reticulación B es de 90:10 a 10:90 (o de aproximadamente 90:10 a aproximadamente 10:90), de 80:20 a 20:80 (o de aproximadamente 80:20 a aproximadamente 20:80), de 70:30 a 30:70 (o de aproximadamente 70:30 a aproximadamente 30:70), de 60:40 a 40:60 (o de aproximadamente 60:40 a aproximadamente 40:60) o 1:1 (o aproximadamente 1:1). En algunas realizaciones, la concentración del primer agente de reticulación en la primera solución puede ser del 1 % al 10 % (o de aproximadamente el 1 % a aproximadamente el 10 %) (p/v), del 2 % al 8 % (o de aproximadamente el 2 % a aproximadamente el 8 %) (p/v), del 3 % al 7 % (o de aproximadamente el 3 % a aproximadamente el 7 %) (p/v) o del 4 % al 6 % (o de aproximadamente el 4 % a aproximadamente el 6 %) (p/v) o el 4 % (o aproximadamente el 4 %). En algunas realizaciones, la concentración del segundo agente de reticulación en la segunda solución puede ser del 1 % al 10 % (o de aproximadamente el 1 % a aproximadamente el 10 %) (p/v), del 2 % al 8 % (o de aproximadamente el 2 % a aproximadamente el 8 %) (p/v), del 3 % al 7 % (o de aproximadamente el 3 % a aproximadamente el 7 %) (p/v) o del 4 % al 6 % (o de aproximadamente el 4 % a aproximadamente el 6 %) (p/v) o el 4 % (o aproximadamente el 4 %).

En algunas realizaciones, la cantidad de aminas libres en el material basado en colágeno reticulado varía del 50 % al 85 % (o de aproximadamente el 50 % a aproximadamente el 85 %), del 60 % al 75 % (o de aproximadamente el 60 % a aproximadamente el 75 %), del 65 % al 70 % (o de aproximadamente el 65 % a aproximadamente el 70 %) con respecto al número de aminas libres en el material basado en colágeno antes de exponerlo a ningún agente de reticulación.

Algunas realizaciones proporcionan un método para producir una bioprótesis degradable que implica controlar la reticulación para producir una bioprótesis degradable que se reticula parcialmente. En algunas realizaciones, para crear una bioprótesis degradable parcialmente reticulada, la reacción de reticulación puede ralentizarse. En algunas realizaciones, por ejemplo, la reacción de reticulación puede ralentizarse disminuyendo la concentración del agente de reticulación, tal como del 10 % hasta un 1 % en solución (o de aproximadamente el 10 % a aproximadamente un 1 %). En algunas realizaciones, la concentración del agente de reticulación puede controlarse dentro del intervalo del 1 % al 2 % (o de aproximadamente el 1 % a aproximadamente el 2 %), del 2 % al 3 % (o de aproximadamente el 2 % a aproximadamente el 3 %), del 3 % al 4 % (o de aproximadamente el 3 % a aproximadamente el 4 %), del 4 % al 5 % (o de aproximadamente el 4 % a aproximadamente el 5 %), del 5 % al 6 % (o de aproximadamente el 5 % a aproximadamente el 6 %), del 6 % al 7 % (o de aproximadamente el 6 % a aproximadamente el 7 %), del 7 % al 8 % (o de aproximadamente el 7 % a aproximadamente el 8 %), del 8 % al 9 % (o de aproximadamente el 8 % a aproximadamente el 9 %) o del 9 % al 10 % (o de aproximadamente el 9 % a aproximadamente el 10 %).

En algunas realizaciones, el método comprende combinar un agente de reticulación con el material basado en colágeno en un medio acuoso a un pH básico o ácido para reaccionar con una porción predeterminada de los grupos amina o carboxilo del colágeno para formar una bioprótesis degradable.

En algunas realizaciones, la reacción de reticulación puede ralentizarse reduciendo la acidez de un agente de reacción de reticulación que se pretende que reaccione con los grupos carboxilo del colágeno o reduciendo la alcalinidad de un agente de reacción de reticulación que se pretende que reaccione con los grupos amina del colágeno. En algunas realizaciones, la reacción de reticulación puede ralentizarse, por ejemplo, reduciendo la temperatura a la que tiene lugar la reacción de reticulación. En algunas realizaciones, la reacción de reticulación puede ralentizarse, por ejemplo, reduciendo la presión a la que tiene lugar la reacción de reticulación.

En algunas realizaciones, para crear una bioprótesis degradable parcialmente reticulada, se reduce la longitud del tiempo en que el material basado en colágeno se expone al agente de reacción de reticulación. En algunas realizaciones, para crear una bioprótesis degradable parcialmente reticulada, el material basado en colágeno se enmascara por medios químicos o físicos, permitiendo la exposición de solamente parte del material basado en colágeno al agente de reacción de reticulación. En algunas realizaciones, otra manera de crear una bioprótesis degradable parcialmente reticulada es exponer solamente una porción o menos de todas las superficies del material basado en colágeno al agente de reacción de reticulación.

Todos estos métodos anteriormente mencionados para ralentizar la reacción de reticulación o para acortar el tiempo de reacción o para ralentizar, inhibir, limitar o prevenir la exposición del material basado en colágeno al agente de reacción de reticulación pueden usarse individualmente o en cualquier combinación para lograr las propiedades óptimas del material.

Por ejemplo, en algunas realizaciones, reducir la concentración del agente de reticulación del 5 % al 1 % en combinación con reducir el pH del agente de reticulación de 10 a 8,5, ralentizará sustancialmente la reacción de reticulación. En algunas realizaciones, exponer solamente una superficie o un lado del material basado en colágeno al agente de reacción de reticulación puede ralentizar o inhibir la reacción de reticulación y de esta manera limitar la

cantidad de colágeno que se reticula.

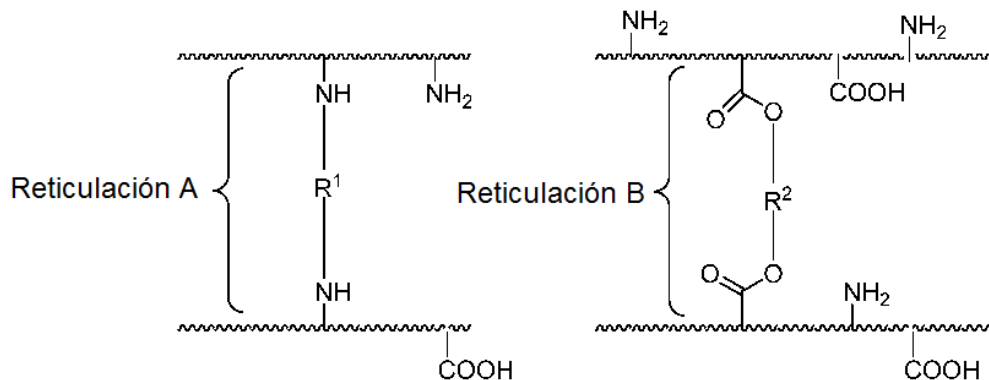
Los detalles adicionales con respecto a los procesos de reticulación y los materiales relevantes a esta divulgación se describen en la Patente de Estados Unidos n.º 5.880.242, la totalidad de la cual se incorpora por la presente por referencia.

Las realizaciones de la presente invención logran un grado predeterminado de reticulación por el control preciso de la concentración del agente de reticulación, del pH del agente de reticulación, de la longitud del tiempo en el que el material basado en colágeno se expone al agente de reticulación y de la temperatura a la que el material basado en colágeno se expone al agente de reticulación. Un grado preferido de reticulación sería reticular sólo aproximadamente un 50 % de los grupos amina o carboxilo libres que permitiría que la bioprótesis degradable retenga suficiente resistencia a la degradación enzimática prematura y que retenga suficiente fuerza para completar el papel terapéutico que se pretende, aunque permitiendo que el dispositivo bioprotésico se disuelva al final, de esta manera evitando un implante permanente.

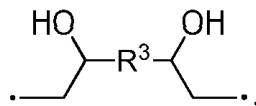
Un método para formar, por ejemplo, un sustituto de la piel parcialmente reticulado comienza con un material basado en colágeno tal como pericardio porcino que se ha lavado primero de material extraño. El material basado en colágeno se trata con una solución detergente genérica para retirar el material celular animal, dejando atrás principalmente la matriz extracelular que consiste casi enteramente en colágeno de tipo 1. La matriz extracelular se monta después en un marco y se impregna durante aproximadamente 50 a aproximadamente 150 horas en el agente de reacción de reticulación, tal como BDDGE, que se ha diluido a la concentración deseada (que varía de aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 10 %). Durante el proceso de reticulación, la temperatura del agente de reacción de reticulación se mantiene a una temperatura establecida (que varía de aproximadamente -50 °C a aproximadamente 100 °C) o a diferentes temperaturas a intervalos preprogramados. Al completar la reacción de reticulación, la matriz extracelular se retira del agente de reacción de reticulación, se aclara exhaustivamente con agua para retirar el agente de reticulación, después se seca, se envasa, se esteriliza.

Material basado en colágeno reticulado

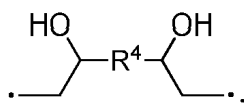
Algunas realizaciones proporcionan un material basado en colágeno reticulado que comprende Reticulación A y Reticulación B:



donde $\sim$ indica hebras de colágeno; R^1 de la Reticulación A se define adicionalmente como



y R^2 de la Reticulación B se define adicionalmente como



R^3 y R^4 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en $-(CH_2)_n-$ y $-(O(CH_2)_n)_m-$, donde n y m son independientemente un número entero de 0-6 y la cantidad de aminas libres ($-NH_2$) en las hebras de colágeno está entre un 50 % y un 85 % (o entre aproximadamente un 50 % y aproximadamente un 85 %), con respecto al número de aminas libres en el material basado en colágeno antes de cualquier reacción.

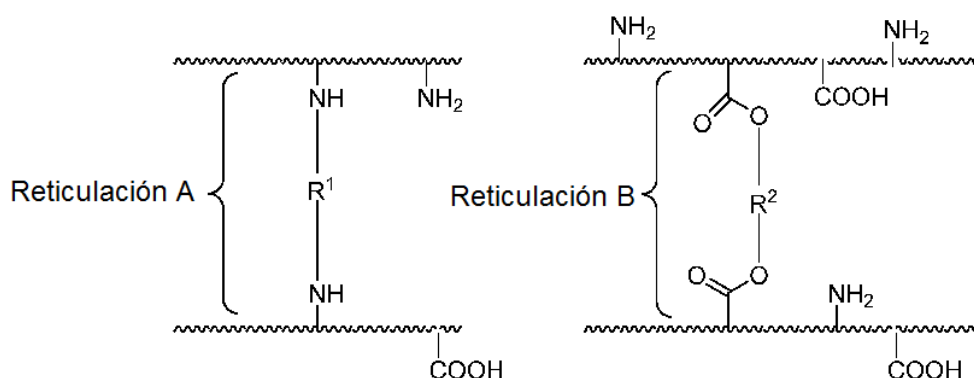
En algunas realizaciones, R^3 y R^4 son iguales. En algunas realizaciones, los R^1 y R^2 de anteriormente son iguales. En algunas realizaciones, la cantidad de aminas libres en el material basado en colágeno reticulado varía del 60 % al 75 % (o de aproximadamente el 60 % a aproximadamente el 75 %) o del 65 % al 70 % (o de aproximadamente el 65 % a aproximadamente el 70 %) con respecto al número de aminas libres en el material basado en colágeno antes de exponerlo a cualquier agente de reticulación. En algunas realizaciones, el material basado en colágeno reticulado comprende adicionalmente grupos ácido carboxílico libres. En algunas realizaciones, el material basado en colágeno sin reaccionar tiene un primer porcentaje de grupos amina libres en sus hebras de colágeno y el material basado en colágeno reticulado tiene un segundo porcentaje de grupos amina libres, en el que el segundo porcentaje de grupos amina libres es menor que el primer porcentaje como se describe a continuación. En algunas realizaciones, el material basado en colágeno reticulado tiene un porcentaje de aminas que es inferior que aquel del colágeno nativo.

En algunas realizaciones, los grupos amina libres del material adaptable basado en colágeno reticulado pueden bloquearse usando un agente de bloqueo. Un agente de bloqueo es un resto reactivo mono-funcional capaz de formar un enlace covalente estable con un grupo amina o carboxilo libre en las proteínas, de esta manera bloqueando la reticulación. Los agentes de bloqueo típicos incluyen compuestos que contienen un grupo amina o un grupo ácido carboxílico, para bloquear ácidos carboxílicos libres y aminas libres respectivamente.

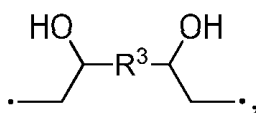
En algunas realizaciones, la relación de Reticulación A a Reticulación B en el material basado en colágeno reticulado varía de 100:1 a 1:100 (o de aproximadamente 100:1 a aproximadamente 1:100). En algunas realizaciones, la relación de Reticulación A a Reticulación B es de 90:10 a 10:90 (o de aproximadamente 90:10 a aproximadamente 10:90), de 80:20 a 20:80 (o de aproximadamente 80:20 a aproximadamente 20:80), de 70:30 a 30:70 (o de aproximadamente 70:30 a aproximadamente 30:70), de 60:40 a 40:60 (o de aproximadamente 60:40 a aproximadamente 40:60) o 1:1 (o de aproximadamente 1:1).

Bioprótesis

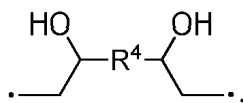
Algunas realizaciones proporcionan una bioprótesis degradable sintetizada usando cualquiera de los métodos descritos anteriormente. En algunas realizaciones, la bioprótesis degradable comprende un material basado en colágeno reticulado que comprende Reticulación A y Reticulación B:



donde $\sim$ indica hebras de colágeno; R^1 de la Reticulación A se define adicionalmente como



y R^2 de la Reticulación B se define adicionalmente como



R^3 y R^4 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en $-(CH_2)_n-$ y $-(O(CH_2)_n)_m-$, donde n y m son independientemente un número entero de 0-6; y la cantidad de aminas libres ($-NH_2$) en las hebras de colágeno está entre un 50 % y un 85 % (o entre aproximadamente un 50 % y aproximadamente un 85 %), con respecto al número de aminas libres en el material basado en colágeno antes de cualquier reacción.

En algunas realizaciones, R^3 y R^4 son iguales. En algunas realizaciones, los R^1 y R^2 de anteriormente son iguales. En algunas realizaciones, la cantidad de aminas libres en la bioprótesis degradable varía del 60 % al 75 % (o de aproximadamente el 60 % a aproximadamente el 75 %) o del 65 % al 70 % (o de aproximadamente el 65 % a aproximadamente el 70 %) con respecto al número de aminas libres en el material basado en colágeno antes de exponerlo a cualquier agente de reticulación.

En algunas realizaciones, la relación de Reticulación A a Reticulación B en la bioprótesis degradable varía de 100:1 a 1:100 (o de aproximadamente 100:1 a aproximadamente 1:100). En algunas realizaciones, la relación de Reticulación A a Reticulación B es de 90:10 a 10:90 (o de aproximadamente 90:10 a aproximadamente 10:90), de 80:20 a 20:80 (o de aproximadamente 80:20 a aproximadamente 20:80), de 70:30 a 30:70 (o de aproximadamente 70:30 a aproximadamente 30:70), de 60:40 a 40:60 (o de aproximadamente 60:40 a aproximadamente 40:60) o 1:1 (o aproximadamente 1:1).

En algunas realizaciones, la bioprótesis degradable comprende un material adaptable basado en colágeno reticulado como se describe anteriormente, en el que el material adaptable basado en colágeno reticulado comprende reticulaciones basadas en aminas y reticulaciones basadas en ésteres en las relaciones descritas anteriormente. En algunas realizaciones, como se describe anteriormente, la bioprótesis degradable comprende adicionalmente aminas libres.

En algunas realizaciones, la bioprótesis degradable tiene una velocidad de degradación de aproximadamente un 0,2 % a aproximadamente un 1,0 % por hora cuando se mide usando el ensayo de digestión de la pronasa descrito en la sección de EJEMPLOS. En algunas realizaciones, la bioprótesis degradable tiene una velocidad de degradación que varía de un 0,1 % a un 1,10 % (o de aproximadamente un 0,1 % a aproximadamente un 1,10 %) por hora, de un 0,3 % a un 1,0 % (o de aproximadamente un 0,3 % a aproximadamente un 1,0 %) por hora, de un 0,4 % a un 0,9 % (o de aproximadamente un 0,4 % a aproximadamente un 0,9 %) por hora, de un 0,5 % a un 0,8 % (o de aproximadamente un 0,5 % a aproximadamente un 0,8 %) por hora, de un 0,6 % a un 0,7 % (o de aproximadamente un 0,6 % a aproximadamente un 0,7 %) por hora, de un 0,2 % a un 0,3 % (o de aproximadamente un 0,2 % a aproximadamente un 0,3 %) por hora, de un 0,3 % a un 0,4 % (o de aproximadamente un 0,3 % a aproximadamente un 0,4 %) por hora, de un 0,4 % a un 0,5 % (o de aproximadamente un 0,4 % a aproximadamente un 0,5 %) por hora, de un 0,5 % a un 0,6 % (o de aproximadamente un 0,5 % a aproximadamente un 0,6 %) por hora, de un 0,4 % a un 0,7 % (o de aproximadamente un 0,6 % a aproximadamente un 0,7 %) por hora, de un 0,7 % a un 0,8 % (o de aproximadamente un 0,7 % a aproximadamente un 0,8 %) por hora, de un 0,8 % a un 0,9 % (o de aproximadamente un 0,8 % a aproximadamente un 0,9 %) por hora, de un 0,9 % a un 1,0 % (o de aproximadamente un 0,9 % a aproximadamente un 1,0 %) por hora o de un 1,0 % a un 1,1 % (o de aproximadamente un 1,0 % a aproximadamente un 1,1 % por hora). Se apreciará por un experto en la materia que los resultados de los ensayos de degradación con pronasa, de degradación basada en enzimas y de degradación basada en proteasa tendrán velocidades de degradación variables dependiendo del tipo de ensayo usado y/o de las condiciones usadas durante el ensayo.

El calentamiento del colágeno inducirá una transición estructural de la estructura de triple hélice nativa a una cierta temperatura dependiente de la naturaleza y del grado de reticulación. La introducción de reticulaciones covalentes aumentará la estabilidad de la triple hélice, aumentando de esta manera la temperatura de desnaturalización. La temperatura a la que la desnaturalización tiene lugar también se denomina temperatura de contracción (T_s), ya que la contracción es la manifestación macroscópica de la transformación de la estructura de triple hélice nativa a la configuración en espiral aleatoria. De esta manera, la T_s puede usarse para medir el nivel de reticulación. En algunas realizaciones, la T_s de la bioprótesis degradable es mayor que la del colágeno nativo. En algunas realizaciones, la T_s de la bioprótesis degradable está por encima de 70 °C (o aproximadamente 70 °C). En algunas realizaciones, la bioprótesis degradable tiene una T_s de por encima de 75 °C (o aproximadamente 75 °C), por encima de 77 °C (o aproximadamente 77 °C) o por encima de 78 °C (o aproximadamente 78 °C).

En algunas realizaciones, la cantidad de aminas libres se relaciona con las propiedades estructurales de la bioprótesis degradable. En algunas realizaciones, la cantidad de aminas libres en la bioprótesis degradable tiene los intervalos descritos anteriormente. En algunas realizaciones, la cantidad de aminas libres en la bioprótesis degradable es proporcional a la velocidad de degradación de la bioprótesis degradable. En algunas realizaciones, la cantidad de aminas libres que quedan en la bioprótesis degradable es proporcional a la temperatura de contracción o la temperatura de desnaturalización de la bioprótesis degradable.

En algunas realizaciones, la bioprótesis degradable como se describe en el presente documento se le da forma de una lámina flexible de cualquier forma y de 1 a 500 (o de aproximadamente 1 a aproximadamente 500) centímetros cuadrados para aplicarse al cuerpo. Por ejemplo, a una lámina flexible puede darse apropiadamente un tamaño para colocarse sobre un sitio de tratamiento. En algunas realizaciones, la lámina flexible puede tratarse para incluir un agente antimicrobiano para ayudar a prevenir la infección en la lámina o en el sitio de tratamiento y/o para transportar un agente antimicrobiano al sitio de tratamiento para tratar una infección existente. En algunas realizaciones, los métodos descritos anteriormente pueden utilizarse para formar un sustituto de la piel parcialmente reticulado. El sustituto de la piel puede ser un tejido distinto de humano tal como tejido porcino. El sustituto de la piel puede procesarse de tal manera que el tejido porcino que contiene colágeno sólo está parcialmente reticulado y por ejemplo, puede estar reticulado solamente un 20 %-80 % (o aproximadamente un 20 % a aproximadamente un

80 %). En otra realización, el tejido que contiene colágeno puede estar reticulado solamente un 40 %-60 % (o aproximadamente un 40 % a aproximadamente un 60 %). La reticulación del tejido puede lograrse usando las técnicas descritas en la Patente de Estados Unidos n.º 5.880.242, en combinación con los métodos para lograr la reticulación parcial como se describe anteriormente.

Una lista no limitante de pacientes en necesidad de una bioprótesis degradable incluye pacientes que padecen defectos del tejido. En algunas realizaciones, los pacientes en necesidad de una bioprótesis degradable padecen heridas que incluyen aquellas en necesidad de sustitutos de la piel para quemaduras y úlceras de la piel. Las bioprótesis degradables también pueden usarse en el tratamiento de úlceras diabéticas de pie, úlceras venosas de pierna, úlceras de presión, sitios de amputación, en otros traumatismos de la piel o en el tratamiento de otras heridas o dolencias. Los pacientes en necesidad de una bioprótesis degradable también incluyen pacientes en necesidad de reparación y suplementación de tendones, ligamentos, fascia y duramadre. Las prótesis degradables pueden usarse suplementando el tejido en procedimientos que incluyen, pero no se limitan a, reparación del manguito rotador, reparación del tendón de Aquiles, reparación de tendón o de ligamento de pierna o de brazo (por ejemplo, rotura de ACL), reparación del prolapso vaginal, cabestrillos de vejiga para la incontinencia urinaria, reconstrucción de mama después de la cirugía, reparación de hernias, refuerzo de grapas o líneas de sutura, reparación de cirugía bariátrica, reconstrucción del suelo pélvico, reparación de duramadre, reparación de encías e injerto y reconstrucción de huesos. Además, un paciente en necesidad de una bioprótesis degradable también incluye uno en necesidad de reemplazamiento de tejidos u órganos. En algunas realizaciones, el material adaptable basado en colágeno reticulado descrito en el presente documento puede usarse para reemplazar tejidos u órganos actuando como una matriz extracelular artificial. En una aplicación tal, este material adaptable basado en colágeno reticulado puede usarse para soportar el crecimiento celular y tisular. Brevemente, las células pueden tomarse de un paciente o de un hospedador viable y sembrarse en el material adaptable basado en colágeno reticulado *in vivo* o bien *ex vivo*. Después ya que los tejidos naturales del paciente invaden el material reticulado, se adapta para degradarse y dejar solamente tejidos y células de origen natural. Otros usos para los productos y los métodos descritos en el presente documento pueden ser para cirugía ortopédica y para reparación de hernias, reconstrucción de mamas u otro tejido blando y reparación uroginecológica.

Los sustitutos de la piel u otros materiales o productos fabricados a partir del procesamiento descrito anteriormente pueden usarse en el tratamiento de heridas crónicas tóxicas y quirúrgicas o en procedimientos reconstructivos quirúrgicos. Siempre que se use un tejido humano o animal (productos biológicos) para tratar heridas, la respuesta inmunológica normal del cuerpo es reconocer el tejido extraño y lanzar un ataque enzimático para degradar/disolver el colágeno del tejido tan rápidamente como sea posible. Hace tiempo se demostró que la reticulación de las moléculas de colágeno en el tejido biológico podría enmascarar el colágeno extraño al cuerpo hospedador y proteger el colágeno extraño del ataque enzimático.

En algunas realizaciones, el tratamiento de un sitio de amputación se realiza usando la bioprótesis degradable. Después de la amputación el muñón quirúrgicamente creado comúnmente tiene problemas al cicatrizar debido a la presión y a la abrasión durante el proceso de cicatrizado así como al adaptarse a las extremidades artificiales. En algunas realizaciones, la bioprótesis biodegradable puede usarse para ayudar en la cicatrización de estas heridas y protegerlas durante el proceso de cicatrización.

El manguito rotatorio es un grupo de músculos y sus tendones que actúan para estabilizar el hombro. En algunas realizaciones, la bioprótesis degradable puede usarse para aumentar, reforzar o reemplazar manguitos rotatorios con desgarros o rupturas comunes. Los desgarros del manguito rotatorio son lesiones deportivas comunes y problemas degenerativos del hombro relacionados con la edad. En algunas realizaciones, la bioprótesis degradable puede funcionar como una barrera de adhesión; las adhesiones son un problema post-operatorio común con las reparaciones de su estructura tendinosa. En algunas realizaciones, los desgarros o las rupturas comunes del tendón de Aquiles pueden aumentarse, reforzarse o reemplazarse con bioprótesis degradables. En algunas realizaciones, la bioprótesis degradable puede funcionar también como una barrera de adhesión. Las adhesiones son un problema común con las reparaciones de este tendón debido a la acción de deslizamiento largo que requiere conforme el pie va a través de su intervalo de movimiento normal. En algunas realizaciones, la bioprótesis degradable puede usarse para aumentar, reforzar o reemplazar tendones y ligamentos de la pierna, a mano, el brazo o cualquier otra parte del cuerpo.

En algunas realizaciones, la bioprótesis degradable proporciona el material estructural adicional necesario y un material biológico que elimina la necesidad de materiales sintéticos permanentes que se dejan en el abdomen durante el tratamiento del prolapso vaginal. El prolapso de la cúpula vaginal es un defecto que se da mucho en la vagina e implica una aproximación quirúrgica a través de la vagina o del abdomen. La corrección quirúrgica de esta afección normalmente implica una técnica llamada una suspensión de la cúpula vaginal, en la que el cirujano fija la vagina al tejido fuerte en la pelvis o a un hueso llamado el sacro, que se localiza en la base de la espina dorsal. En algunas realizaciones, la bioprótesis degradable puede usarse para proporcionar soporte adicional para la suspensión en el tratamiento del prolapso vaginal.

En algunas realizaciones, la bioprótesis degradable puede usarse como un cabestrillo de vejiga (o un cabestrillo del fascia pubovaginal) en el tratamiento de la incontinencia urinaria. Durante este tipo de operación el urólogo fija una

- pieza de fascia (material plano, resistente, parecido al tendón - aproximadamente 2,5 cm (1 pulgada) de anchura y 12,5 cm (5 pulgadas) de longitud) alrededor del cuello de la vejiga para mantener la orina dentro, incluso con estrés. Los cabestrillos se fabrican comúnmente con tejido humano del paciente o bien de un donante. En algunas realizaciones, la bioprótesis degradable puede reemplazar o aumentar el material del donante humano para este procedimiento. El cabestrillo suburetral se fabrica comúnmente con una malla sintética colocada bajo la uretra que actúa como una hamaca, elevando y comprimiendo la uretra, previniendo fugas. En alguna realización, la bioprótesis degradable puede reemplazar o aumentar esta malla sintética.
- En algunas realizaciones, después de una mastectomía o una lesión traumática en la mama, la bioprótesis degradable puede usarse para reparar o reconstruir fibras de colágeno estructurales, tendones y fascia que faltan durante los procedimientos de cirugía plástica.
- En algunas realizaciones, la bioprótesis degradable puede usarse para reforzar o reemplazar la reparación y la reconstrucción quirúrgica de la pared abdominal, llenar los huecos donde queda tejido insuficiente proporcionando un andamiaje para la remodelación biológica y promover el crecimiento durante la reparación de hernias. La hernia resulta del fallo físico de la estructura de fascia y muscular abdominal que permite la protrusión de los contenidos de la cavidad corporal. Las adhesiones son comunes en las hernias. En algunas realizaciones, la bioprótesis degradable, puede actuar también como una barrera de adhesión de forma post-operatoria.
- Las líneas de sutura, especialmente en tejidos más quebradizos tales como el tejido pulmonar, los materiales tendinosos debilitados o degenerativos, la cirugía cardíaca, el trasplante de órganos por nombrar unos pocos requieren un apósito o un refuerzo de sutura para prevenir que la sutura o la grapa sea "alambre de queso" o corte a través del tejido delgado o debilitado. En algunas realizaciones, la bioprótesis degradable puede usarse como un apoyo para prevenir que corte a través de la sutura o la grapa protegiendo el tejido nativo.
- En algunas realizaciones, la bioprótesis degradable puede usarse en lugar de o junto con suturas o grapas para proporcionar una reconstrucción estable de los fascia y el perímetro exteriores del estómago y durante la cirugía bariátrica. La cirugía bariátrica para reducir el volumen del estómago se realiza comúnmente como un remedio para la obesidad.
- En algunas realizaciones, la bioprótesis degradable puede usarse para reconstruir y soportar el tejido conectivo nativo debilitado y dañado durante la reconstrucción del suelo pélvico. La cirugía reconstructiva del suelo pélvico consiste en varios procedimientos para corregir una afección denominada prolapso de los órganos pélvicos. Cuando los músculos del suelo pélvico se dañan o se vuelven débiles - normalmente debido a un parto - normalmente son incapaces de soportar el peso de algunos o todos los órganos pélvicos y abdominales. Si esto ocurre, uno o más de los órganos puede caer (prolapsar) por debajo de sus posiciones normales, provocando síntomas que incluyen incomodidad, dolor, presión e incontinencia urinaria. La meta de la reconstrucción del suelo pélvico es restaurar la estructura y la función normales de los órganos pélvicos femeninos.
- En algunas realizaciones, después de la lesión traumática o la cirugía cerebral, la bioprótesis degradable puede usarse para volver a sellar o parchear cualquier perforación y fuga debido al efecto de la duramadre. La duramadre, el fascia protector que cubre el cerebro es crítico para mantener el fluido que rodea al cerebro.
- En algunas realizaciones, durante el proceso de reparar los segmentos de hueso dañados o enfermos, la bioprótesis degradable puede modelarse quirúrgicamente para recrear segmentos que faltan o huecos o para el reemplazamiento de hueso dañado a través de toda la estructura esquelética. El colágeno en el hueso cortical puede recuperarse de material de fuente ósea de animal o humana. El proceso de primero desmineralizar el hueso y después reticular la estructura de colágeno que queda puede dar como resultado un material que puede funcionar como un relleno de huecos de hueso semisólido.
- En algunas realizaciones, la bioprótesis degradable puede proporcionar una fuente alternativa de procedimientos de enfermedad del material de las encías. Como resultado de una enfermedad periodontal donde el tejido de las encías se ha perdido, el dentista o el periodontista puede insertar quirúrgicamente un injerto de tejido blando, en el que el material sintético o el tejido tomado de otro área de tu boca se usa para cubrir las raíces expuestas de los dientes.
- En algunas realizaciones, la bioprótesis degradable puede usarse para reemplazar o suplementar otros materiales usados en el tratamiento de la enfermedad periodontal.
- En algunas realizaciones, después de identificar un paciente viable para los métodos de tratamiento anteriores, la siguiente etapa es identificar la velocidad a la que la bioprótesis degradable debería degradarse para funcionar eficazmente. En algunas realizaciones, esta etapa implica determinar la velocidad de cicatrización de la herida o de otro defecto tisular. En algunas realizaciones, esta etapa implica determinar la velocidad a la que el crecimiento celular natural alcanzaría un nivel en el que la bioprótesis degradable ya no fuera necesaria.
- Ventajosamente, el sustituto de la piel, la herida u otros productos de tratamiento de defectos tisulares fabricados a partir de los procesos descritos anteriormente pueden sincronizarse para degradarse con el proceso de cicatrizado de heridas. Por ejemplo, un sustituto de la piel producido usando los procesos descritos en el presente documento

puede adaptarse para que empiece a degradarse a una velocidad más o menos lenta, pero constante, que se sincroniza con el proceso de cicatrización y la reducción del tamaño de la herida, de tal manera que tras completarse la cicatrización de la herida, el producto bioprotésico reticulado se ha disuelto completamente, completándose tal proceso normalmente en 6-12 (o de aproximadamente 6 a aproximadamente 12) semanas. En algunas realizaciones, la velocidad de degradación del sustituto de la piel es tal que el sustituto de la piel se degrada completamente dentro del intervalo de tiempo entre aproximadamente 8 semanas y aproximadamente 1 año.

Otros ejemplos, tales como redes quirúrgicas, se producen usando los procesos descritos en el presente documento y pueden adaptarse para resistir o limitar la degradación y de esta manera retienen alta resistencia a la tracción, durante un periodo de tiempo tal como 1-3 (o de aproximadamente 1 a aproximadamente 3) meses o hasta un tiempo tal que el tejido que rodea o el nuevo haya cicatrizado lo suficiente para soportar el peso o absorber los estreses normales sin daño, después de lo que el producto continúa degradándose a una velocidad lenta pero constante hasta que se ha disuelto completamente, completándose tal proceso en un año o aproximadamente un año.

Dependiendo de la velocidad de cicatrizado de la herida, se selecciona entonces usar una bioprótesis degradable.

La etapa final implica implantar la bioprótesis degradable. En algunas realizaciones, esto implica colocar la bioprótesis degradable en, sobre o dentro del defecto tisular. En algunas realizaciones, la bioprótesis degradable se implanta quirúrgicamente en el paciente en el área diana. En algunas realizaciones, la bioprótesis degradable se implanta quirúrgicamente dentro de o sobre la herida. En algunas realizaciones, la bioprótesis degradable se fija dentro de o sobre la herida con puntos de sutura, pegamento, grapas u otros adhesivos. En algunas realizaciones, la bioprótesis degradable se siembra primero con células autólogas u homólogas antes de la implantación.

En algunas realizaciones, se forma un material parcialmente reticulado o un material adaptable basado en colágeno reticulado como se describe en el presente documento como una lámina flexible de cualquier forma y de 1 a 500 (o de aproximadamente 1 a aproximadamente 500) centímetros cuadrados para aplicarse al cuerpo. Por ejemplo, a una lámina flexible puede darse un tamaño apropiadamente para colocarse sobre el sitio de tratamiento. En algunas realizaciones, la lámina flexible puede tratarse para incluir un agente antimicrobiano para ayudar a prevenir la infección en la lámina o en el sitio de tratamiento y/o para transportar un agente antimicrobiano en el sitio de tratamiento para tratar una infección existente.

En algunas realizaciones, el producto puede esterilizarse usando diversos métodos de esterilización, incluyendo óxido de etileno, gamma, vapor y haz de electrones. En algunas realizaciones, puede esterilizarse un sustituto biológico de la piel u otro producto de manera que minimice o prevenga la desnaturalización del colágeno, tal como controlando el número de ciclos, el tiempo, la temperatura y la dosis de la radiación.

Ejemplos

Materiales y equipo:

Lo siguiente es una lista de materiales y equipo usados a través de toda la sección de EJEMPLOS: Perkin Elmer modelo DSC 4000, Calorímetro diferencial de barrido; Horno científico Boekel modelo 132000; Balanza analítica Mettler Toledo modelo AL54; Balanza Mettler Toledo New Classic ML; Calibrador, Mitutoyo Corp., 505-626 Dial Caliper; Liofilizador Labconco modelo Freezone 6 con bandeja secadora; Bisturí, Cuchilla estéril de acero inoxidable Bard-parker n.º 10; Tru-Punch Sklar, punción para biopsia desechable; pH metro VWR SympHony SB70P; Agua destilada; Solución de dodecil sulfato sódico al 0,1 %; Baño de ultrasonidos = Branson 2510; Pericardio equino; Solución de NaCl al 0,9 %; Éter diglicidílico de 1,4-butanodiol; Tampón HEPES convencional; Tampón fosfato 0,1 M pH 4,5 (obtenido de Teknova; n.º de catálogo: P4000); Tampón de fijado pH 9,2.

Medición del contenido de aminos libres

Además de los ensayos descritos a continuación, también puede calcularse el contenido de aminos. En algunas realizaciones, el contenido de grupos amina libres del material adaptable basado en colágeno reticulado, expresado como un porcentaje del material basado en colágeno (%), puede determinarse usando un ensayo colorimétrico de ácido 2,4,6-trinitrobencensulfónico (TNBS; solución 1,0 M en agua, Fluka, Buchs, Suiza). A una mezcla de 2-4 miligramos (mg) de material adaptable basado en colágeno reticulado puede añadirse una solución de 1 ml de una solución acuosa de NaHCl₃ (pH 9,0; Aldrich, Bornem, Bélgica) al 4 % (peso/volumen) y 1 ml de una solución acuosa de TNBS al 0,5 % (peso/volumen) preparada recientemente. Después de la reacción durante 2 horas a 40 °C, pueden añadirse 3,0 ml de HCl 6 M (Merck, Darmstadt, Alemania) y la temperatura puede elevarse a 60 °C. Cuando se logra la solubilización completa del material adaptable basado en colágeno reticulado, la solución resultante se diluye con 15 ml de agua desionizada y se midió la absorbancia en un espectrofotómetro Hewlett-Packard HP8452A UV/VIS a una longitud de onda de 345 nm. Se prepara un control aplicando el mismo procedimiento salvo por que el HCl se añadió antes de la adición del TNBS. El contenido de grupos amina libres se calcula usando un coeficiente de absorción molar de 14600 l mol⁻¹ cm⁻¹ para trinitrofenil lisina [Wang C. L., et al., Biochim. Biophys. Acta, 544, 555-567 (1978)].

El contenido de grupos amina libres del material adaptable basado en colágeno reticulado también puede determinarse usando un ensayo de ninhidrina. Lo siguiente describe los procedimientos generales para ensayar el contenido de aminas de un material basado en colágeno. Brevemente, se recoge una muestra de 1-25 miligramos (mg) de material adaptable basado en colágeno reticulado. Después, se prepara una solución de 1 ml de ninhidrina al 4 % (peso/volumen) en celosolva metilica. Después se prepara un tampón citrato sódico 0,2 M disolviendo 1,05 g de monohidrato de ácido cítrico y 0,04 g de dihidrato de cloruro de estaño en 11 ml de NaOH 1,0 N y añadiendo 14 ml de agua purificada. El pH del tampón citrato sódico se ajusta de 4,9 a 5,1 con HCl y/o NaOH. Después, la solución de ninhidrina al 4 % y el tampón citrato sódico se mezclan en una botella oscura para uso inmediato. Ahora se prepara una solución de N-acetilisina (ALys) disolviendo 47,1 mg de ALys en 50 ml de agua purificada. La ALys se usa como una solución patrón para calibrar la absorbancia que se lee a 570 nm. Después de que se grafique una curva patrón, se ensayan las muestras de tejido seco. Cada solución a leerse por absorbancia se prepara usando 1 ml de ninhidrina tamponada, 100 ml de agua purificada y el tejido o la muestra control. Las soluciones se calientan a 100 °C durante 20 minutos, se enfrían, después se añaden 5 ml de alcohol isopropílico. La absorbancia se lee después y la cantidad de moles de amina por gramo de muestra y control se calcula usando la siguiente ecuación: $A = mX + b$ donde, A = absorbancia, X = contenido de ALys en micromoles, m = la pendiente y b = la intersección con y. El contenido de micromoles de amina libre en la muestra es entonces $X_{muest} = (A_{muest} - b) / m$.

Propiedades mecánicas:

Las curvas de tensión-deformación de la bioprótesis degradable pueden tomarse usando medias uniaxiales usando un ensayador mecánico. Las barras de tensión (40,0 mm x 4,0 mm x 1,4 mm) pueden cortarse usando un cuchillo con forma de mancuerna y puede hidratarse durante al menos una hora en PBS a temperatura ambiente. El grosor de las muestras puede medirse por triplicado usando un micrómetro tipo resorte (Mitutoyo, Tokio, Japón). Se usó una longitud de calibre inicial de 10 mm y puede aplicarse una velocidad del cabezal de 5 mm/minuto hasta que se da la ruptura del espécimen de ensayo. Puede aplicarse una precarga de 0,05 N para pre-estirar el espécimen antes de la medida real. Pueden calcularse la resistencia a la tensión, la elongación en el alineamiento, la elongación en la rotura, el módulo de tensión bajo y el módulo de tensión alto de la muestra a partir de cinco medidas independientes.

Preparación de pericardio para formar material basado en colágeno

Se adquirieron sacos pericárdicos equinos frescos de Cárnico de Jerez S.A. de C.V. y se fletaron con aire en una solución de NaCl al 0,9 % en hielo. Inmediatamente al recibirlos, todos los sacos se enjuagaron en fresco, con solución de NaCl al 0,9 % fría, se desbridaron de grasa y de exceso de tejido fibroso y se ajustaron con un bisturí quirúrgico para crear 8 parches similares de aproximadamente 10 cm x 15 cm. Todos los parches se descelularizaron mediante un proceso sometiendo a ultrasonidos durante 20 minutos en una solución de Dodecil sulfato sódico (SDS) al 0,1 % seguido de tres aclarados separados en 500 ml de solución de NaCl al 0,9 % para retirar el exceso de SDS. Se pretende que el proceso de descelularización retire cualquier exceso de materiales intracelulares. El tensioactivo aniónico (SDS) usado en el proceso también ayuda a reducir las grasas y los aceites en exceso. El tratamiento de los parches resultantes produjo 8 parches pericárdicos desbridados descelularizados. Uno de estos parches se reservó como un control para los experimentos de reticulación.

Preparación de soluciones de reticulación:

A 1 l de agua desionizada se añadió carbonato potásico (6,5 gramos) y bicarbonato sódico (16,6 gramos). La solución se mezcló hasta que se disolvieron todos los sólidos. El pH de la solución se midió usando un pH metro en el que el pH objetivo era $9,2 \pm 0,2$ añadiendo NaOH diluido o HCl diluido. Después, a la solución tamponada (tampón bicarbonato) se añadió BDDGE (40 g) para producir una solución al 4 % en peso de BDDGE. Esta solución se agitó para dar una solución homogénea de BDDGE a pH $9,2 \pm 0,2$.

A una solución tamponada de fosfato (PBS, 0,5 l, pH $4,5 \pm 0,2$) se añadió BDDGE (20 g) para producir una solución al 4 % en peso de BDDGE. Esta solución se agitó para producir una solución homogénea de BDDGE a pH $4,5 \pm 0,2$.

EJEMPLO 1

A una solución a pH bajo de BDDGE (BDDGE al 4 % p/v, pH $4,5 \pm 0,2$, exceso) se añadió un parche pericárdico descelularizado desbridado de aproximadamente 10 x 15 cm. El parche se mantuvo en la solución de BDDGE/PBS durante 160 horas en cuyo tiempo el parche se aclaró con agua destilada exhaustivamente.

EJEMPLO 2

A una solución a pH alto de BDDGE (BDDGE al 4 % p/v, pH $9,2 \pm 0,2$, exceso) se añadió un parche pericárdico descelularizado desbridado de aproximadamente 10 x 15 cm. El parche se mantuvo en la solución de BDDGE al 4 % p/v, pH $9,2 \pm 0,2$ durante 8 horas, en cuyo tiempo se añadió a una solución a pH bajo de BDDGE (BDDGE al 4 % p/v, pH $4,5 \pm 0,2$, exceso). Después de 152 horas, el parche se retiró de la solución de BDDGE a pH bajo y se aclaró con agua destilada exhaustivamente.

EJEMPLO 3

A una solución a pH alto de BDDGE (BDDGE al 4 % p/v, pH $9,2 \pm 0,2$, exceso) se añadió un parche pericárdico descelularizado desbridado de aproximadamente 10 x 15 cm. El parche se mantuvo en la solución de BDDGE al 4 % p/v, pH $9,2 \pm 0,2$ durante 24 horas, en cuyo tiempo se añadió a una solución a pH bajo de BDDGE (BDDGE al 4 % p/v, pH $4,5 \pm 0,2$, exceso). Después de 136 horas, el parche se retiró de la solución de BDDGE a pH bajo y se aclaró con agua destilada exhaustivamente.

EJEMPLO 4

A una solución a pH alto de BDDGE (BDDGE al 4 % p/v, pH $9,2 \pm 0,2$, exceso) se añadió un parche pericárdico descelularizado desbridado de aproximadamente 10 x 15 cm. El parche se mantuvo en la solución de BDDGE al 4 % p/v, pH $9,2 \pm 0,2$ durante 36 horas, en cuyo tiempo se añadió a una solución a pH bajo de BDDGE (BDDGE al 4 % p/v, pH $4,5 \pm 0,2$, exceso). Después de 124 horas, el parche se retiró de la solución de BDDGE a pH bajo y se aclaró con agua destilada exhaustivamente.

EJEMPLO 5

A una solución a pH alto de BDDGE (BDDGE al 4 % p/v, pH $9,2 \pm 0,2$, exceso) se añadió un parche pericárdico descelularizado desbridado de aproximadamente 10 x 15 cm. El parche se mantuvo en la solución de BDDGE al 4 % p/v, pH $9,2 \pm 0,2$ durante 48 horas, en cuyo tiempo se añadió a una solución a pH bajo de BDDGE (BDDGE al 4 % p/v, pH $4,5 \pm 0,2$, exceso). Después de 112 horas, el parche se retiró de la solución de BDDGE a pH bajo y se aclaró con agua destilada exhaustivamente.

EJEMPLO 6

A una solución a pH alto de BDDGE (BDDGE al 4 % p/v, pH $9,2 \pm 0,2$, exceso) se añadió un parche pericárdico descelularizado desbridado de aproximadamente 10 x 15 cm. El parche se mantuvo en la solución de BDDGE al 4 % p/v, pH $9,2 \pm 0,2$ durante 64 horas, en cuyo tiempo se añadió a una solución a pH bajo de BDDGE (BDDGE al 4 % p/v, pH $4,5 \pm 0,2$, exceso). Después de 96 horas, el parche se retiró de la solución de BDDGE a pH bajo y se aclaró con agua destilada exhaustivamente.

EJEMPLO 7

A una solución a pH alto de BDDGE (BDDGE al 4 % p/v, pH $9,2 \pm 0,2$, exceso) se añadió un parche pericárdico descelularizado desbridado de aproximadamente 10 x 15 cm. El parche se mantuvo en la solución de BDDGE al 4 % p/v, pH $9,2 \pm 0,2$ durante 160 horas, en cuyo tiempo el parche se retiró de la solución de BDDGE a pH bajo y se aclaró con agua destilada exhaustivamente. La Figura 2 representa una lámina de material basado en colágeno reticulado durante 160 horas a pH 9,2 con BDDGE. Cada uno de los materiales de colágeno de los Ejemplos 1-6 es idéntico en apariencia al material de la Figura 2 cuando se vieron a simple vista.

Temperatura de contracción (Ts):

Se cortaron tres muestras de 3 mm de diámetro de cada uno de los materiales reticulados resultantes de los ejemplos 1-7 y el control usando un punzón de biopsia Skylar de 3 mm.

Cada muestra se selló en un portamuestras volátil Perkin Elmer DSC (0219-0062). Un porta vacío se ejecuta en paralelo con la muestra de ensayo en el Calorímetro Diferencial de Barrido (DSC). A través de la comparación del flujo de calor del porta vacío y del porta de ensayo, la temperatura pico de entalpía indica la temperatura de transición o la temperatura de contracción (Ts) de la muestra expresada en °C.

Las Ts de las muestras se comparan a aquella del control o no reticulada para determinar el nivel comparativo de la reticulación de aminos presente. La Tabla 1 contiene los resultados de cada muestra, separados por cada número de ejemplo. La Figura 3 contiene una representación gráfica de los resultados de la Tabla 1.

TABLA 1: Resultados de la temperatura de contracción (°C)

n.º de muestra	1	2	3	Med	SD
Ejemplo 1	69,63	70,90	69,71	70,08	0,58
Ejemplo 2	72,81	72,40	72,41	72,54	0,19
Ejemplo 3	73,91	74,09	74,19	74,06	0,12
Ejemplo 4	76,17	75,98	76,03	76,06	0,08
Ejemplo 5	78,31	78,54	78,53	78,46	0,11
Ejemplo 6	77,58	77,11	76,98	77,22	0,26

Ejemplo 7	77,26	77,30	78,21	77,59	0,44
Control	69,19	68,94	68,55	68,89	0,26

Ensayo de digestión con pronasa

5 Se cortaron tres muestras de 1 cm x 1 cm de cada uno de los ejemplos 1-7 y del control y se ensayaron para la Digestión con Pronasa MF3-00X. Para el procedimiento MF3-00X cada muestra se colocó en un vial de centelleo de vidrio de 5 ml con 4 ml de una solución tamponada HEPES con 95 mg/100 ml de proteasa bacteriana derivada de *Streptomyces griseus*.

10 Las muestras se incubaron a 45 °C durante 24 horas, se secaron con papel secante y se liofilizaron en el liofilizador Labconco. Después cada muestra se pesó usando la balanza analítica Mettler Toledo. Todas las muestras se volvieron a pesar usando la balanza analítica Mettler Toledo.

15 El porcentaje de degradación se determinó calculando el cambio en porcentaje en el peso antes y después de 24 horas de exposición a la proteasa. La Tabla 2 contiene los resultados de cada muestra, separados por cada número de ejemplo. La Figura 4 contiene una representación gráfica de los resultados de la Tabla 2.

TABLA 2: % de digestión de la proteasa después de 24 horas de exposición a la proteasa

n.º de muestra	1	2	3	% Med restante	SD
Ejemplo 1	5,30/7,60	5,40/7,30	5,60/7,30	73,47 %	2,87
Ejemplo 2	7,80/10,10	8,30/10,50	10,60/13,20	78,86 %	1,26
Ejemplo 3	10,60/11,90	10,80/12,20	12,40/13,80	89,15%	0,55
Ejemplo 4	10,50/11,90	11,30/12,90	12,70/13,90	89,07 %	1,65
Ejemplo 5	14,30/14,80	15,70/16,00	19,80/20,50	97,11 %	0,72
Ejemplo 6	5,00/5,40	6,10/6,40	5,10/5,50	93,54 %	1,25
Ejemplo 7	11,50/12,00	12,10/12,60	12,60/12,90	96,51 %	0,83
Control	8,60/13,40	8,80/13,40	9,40/13,50	66,49 %	2,30

20 La velocidad de degradación se calculó después dividiendo el % de digestión después de 24 horas para producir % degradado / hora. La Tabla 3 muestra esos resultados. La Figura 5 contiene una representación gráfica de los resultados de la Tabla 3.

TABLA 3: Velocidad de degradación en %/h

n.º de muestra	1	2	3	Med	SD
Ejemplo 1	1,26	1,08	0,97	1,11	0,15
Ejemplo 2	0,95	0,87	0,82	0,88	0,06
Ejemplo 3	0,46	0,48	0,42	0,45	0,03
Ejemplo 4	0,49	0,52	0,36	0,46	0,08
Ejemplo 5	0,14	0,08	0,14	0,12	0,04
Ejemplo 6	0,31	0,20	0,30	0,27	0,06
Ejemplo 7	0,17	0,17	0,10	0,15	0,04
Control	1,49	1,43	1,27	1,40	0,12

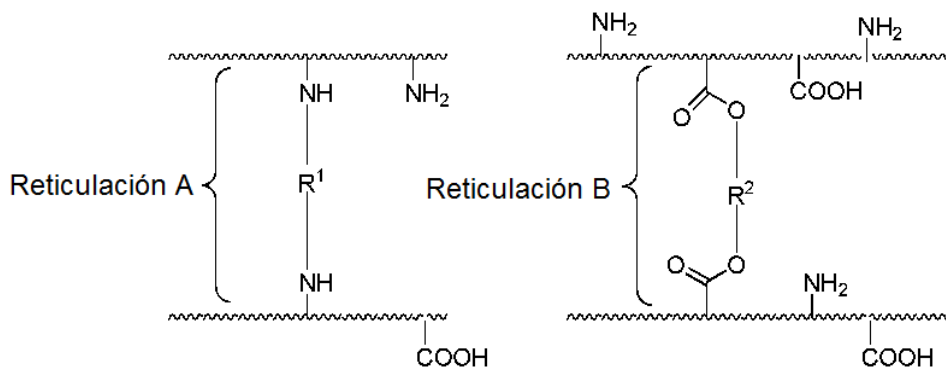
25 El estudio demostró que un desplazamiento de pH de alto (9,2) a bajo (4,5) dentro de las primeras 64 horas de un proceso de reticulación con BDDGE al 4 % dio como resultado una matriz de colágeno extracelular con valores de Ts progresivamente menores, menor resistencia a la proteasa y una velocidad de bioreabsorción significativamente más rápida.

30 El proceso de modulación de pH del proceso de reticulación con BDDGE del material de matriz de colágeno extracelular es un método factible para producir un dispositivo médico para la reparación quirúrgica general con una velocidad de bioreabsorción predeterminada controlada.

REIVINDICACIONES

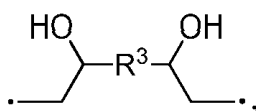
1. Una bioprótesis degradable, que comprende:

5 un material basado en colágeno reticulado que comprende la Reticulación A y la Reticulación B:

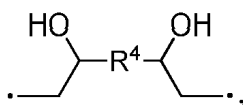


en el que:

~~~~~ indica hebras de colágeno;  
 $R^1$  es



$R^2$  es



$R^3$  y  $R^4$  se seleccionan independientemente del grupo que consiste en  $-(\text{CH}_2)_n-$  y  $-\text{CH}_2(\text{O}(\text{CH}_2)_n)_m-\text{OCH}_2-$ ,  
 $n$  y  $m$  son independientemente un número entero de 1-6 y  
la cantidad de aminas libres ( $-\text{NH}_2$ ) en las hebras de colágeno está entre un 50 % y un 85 %.

2. La bioprótesis degradable de la reivindicación 1, en la que  $R^3$  y  $R^4$  son iguales.

3. La bioprótesis degradable de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la relación de Reticulación A a Reticulación B es de 100:1 a 1:100.

4. La bioprótesis degradable de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el material derivado de colágeno reticulado tiene una velocidad de degradación del 0,2 % al 1,1 % por hora cuando se somete a un ensayo de digestión con pronasa.

5. La bioprótesis degradable de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que las hebras de colágeno derivan de pericardio animal.

6. La bioprótesis degradable de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la prótesis degradable tiene una temperatura de contracción ( $T_s$ ) por encima de 70 °C.

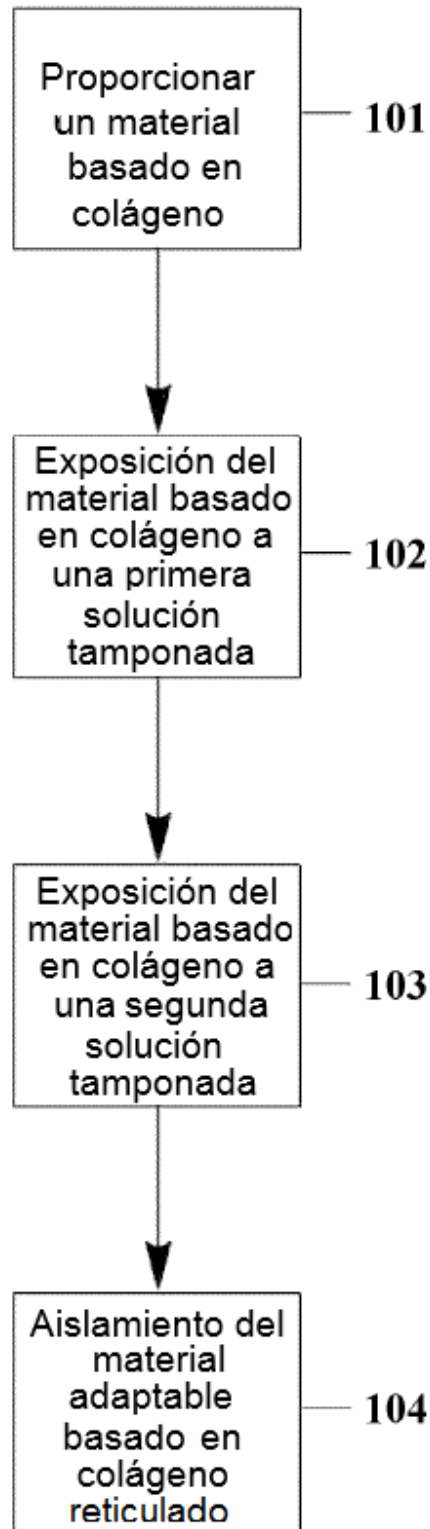
7. La bioprótesis degradable de la reivindicación 6, en la que la temperatura de contracción es proporcional a la cantidad de aminas libres en las hebras de colágeno.

8. La bioprótesis degradable de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la velocidad de degradación es proporcional a la cantidad de aminas libres en las hebras de colágeno.

9. La bioprótesis degradable de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la bioprótesis degradable comprende una lámina flexible.

10. La bioprótesis degradable de la reivindicación 9, en la que la lámina flexible está entre 1 cm<sup>2</sup> y 500 cm<sup>2</sup>.
11. La bioprótesis degradable de una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 10, en la que la lámina flexible se trata con un agente antimicrobiano.
- 5 12. La bioprótesis degradable de la reivindicación 2, en la que R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup> son -CH<sub>2</sub>(O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>)<sub>m</sub>-OCH<sub>2</sub>-, m es 1 y n es 4.
13. La bioprótesis degradable de cualquiera de las reivindicaciones anteriores para uso en el tratamiento de un defecto tisular.
- 10 14. La bioprótesis degradable de la reivindicación 13, en la que el defecto tisular es una herida.
15. Un método para producir la bioprótesis degradable de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, que comprende:  
15 proporcionar un material basado en colágeno;  
exponer el material basado en colágeno a una primera solución tamponada con un pH entre aproximadamente 8,0 y aproximadamente 10,5 durante un primer periodo de tiempo para proporcionar un material basado en colágeno tratado, en donde la primera solución tamponada comprende una concentración de un primer agente de reticulación;  
20 exponer el material basado en colágeno tratado a una segunda solución tamponada con un pH entre aproximadamente 3,0 y aproximadamente 5,5 durante un segundo periodo de tiempo para proporcionar un material basado en colágeno reticulado y adaptable, en donde la segunda solución tamponada comprende una concentración de un segundo agente de reticulación; y  
25 aislar el material basado en colágeno reticulado y adaptable para proporcionar una bioprótesis degradable.

**FIG. 1**

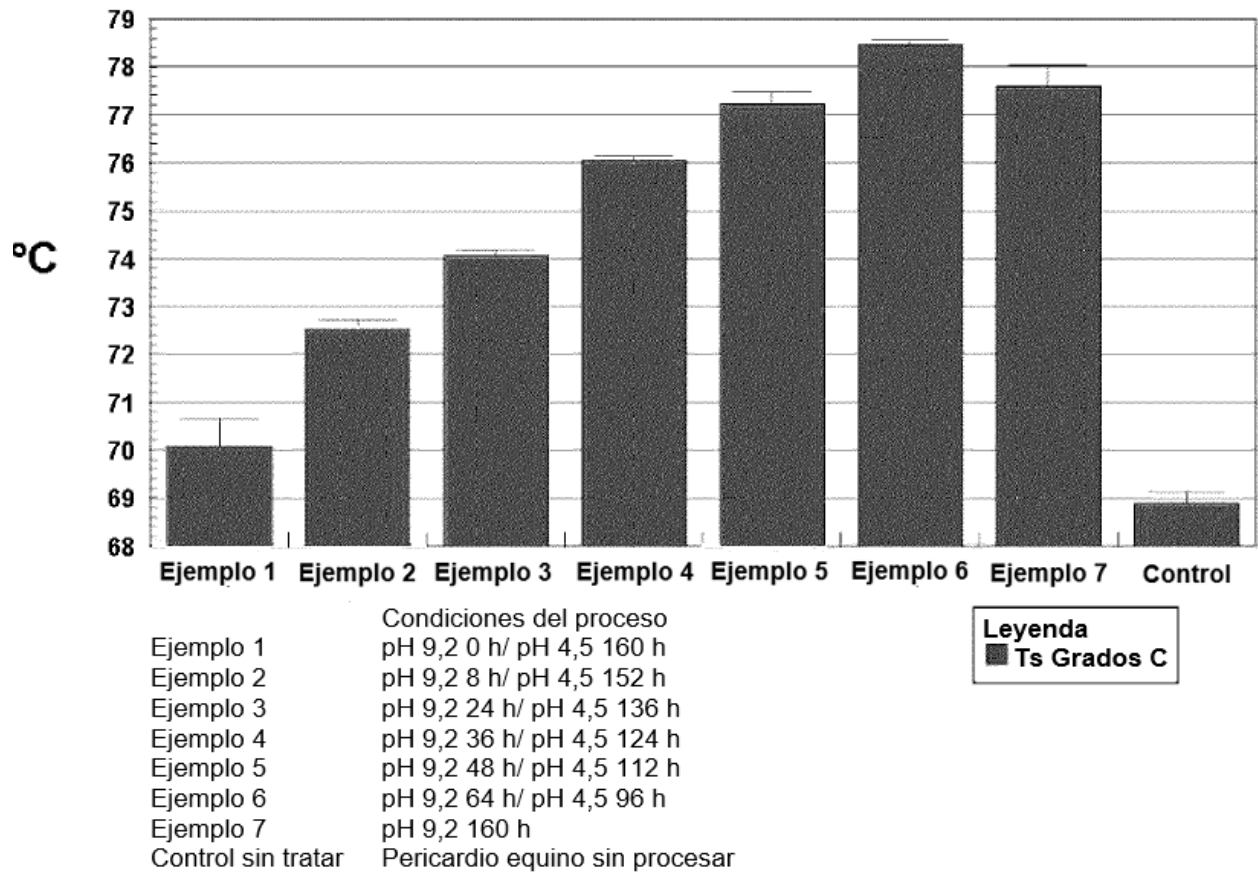


**FIG. 2**

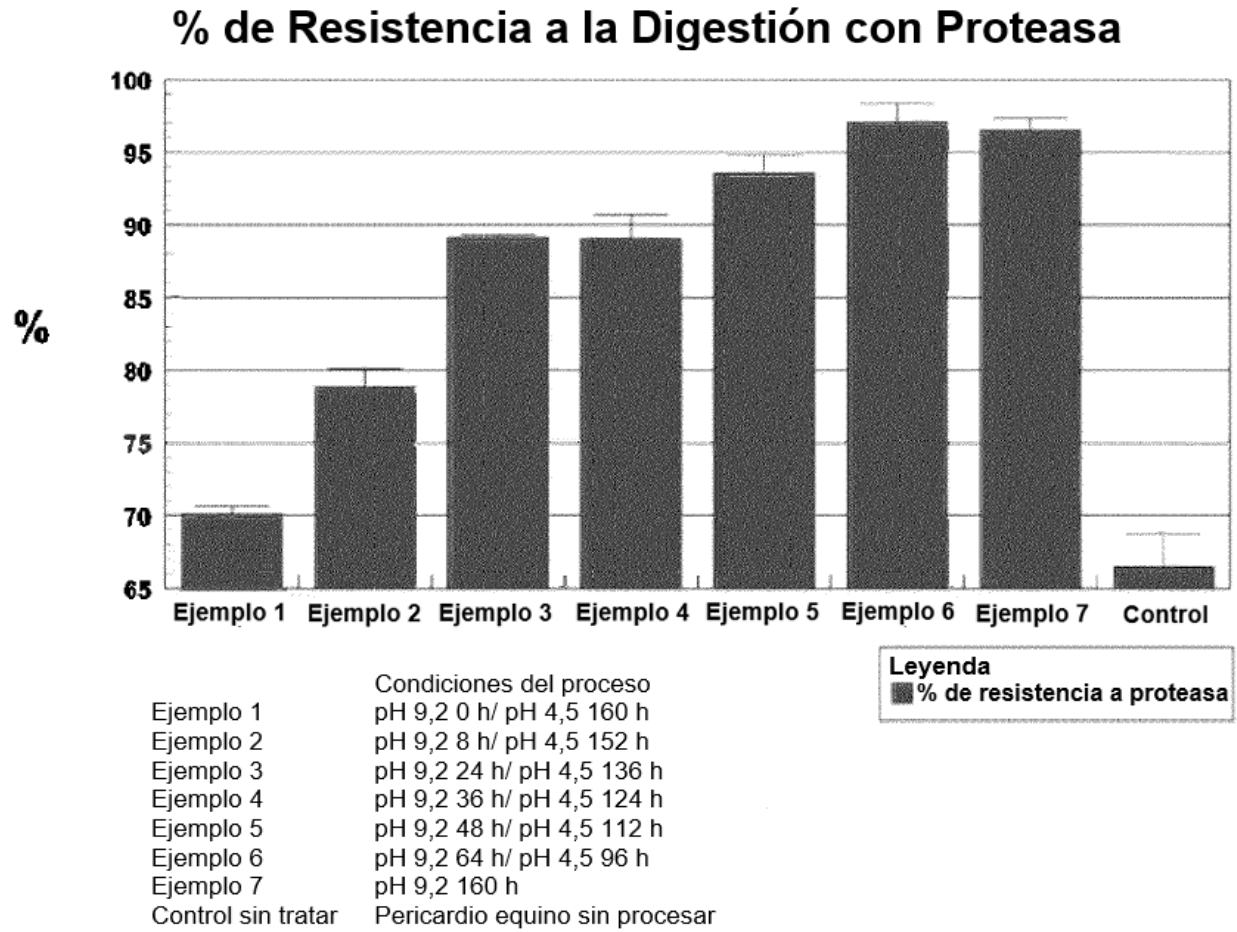


**FIG. 3**

**Ts (Temperatura de Contracción)**

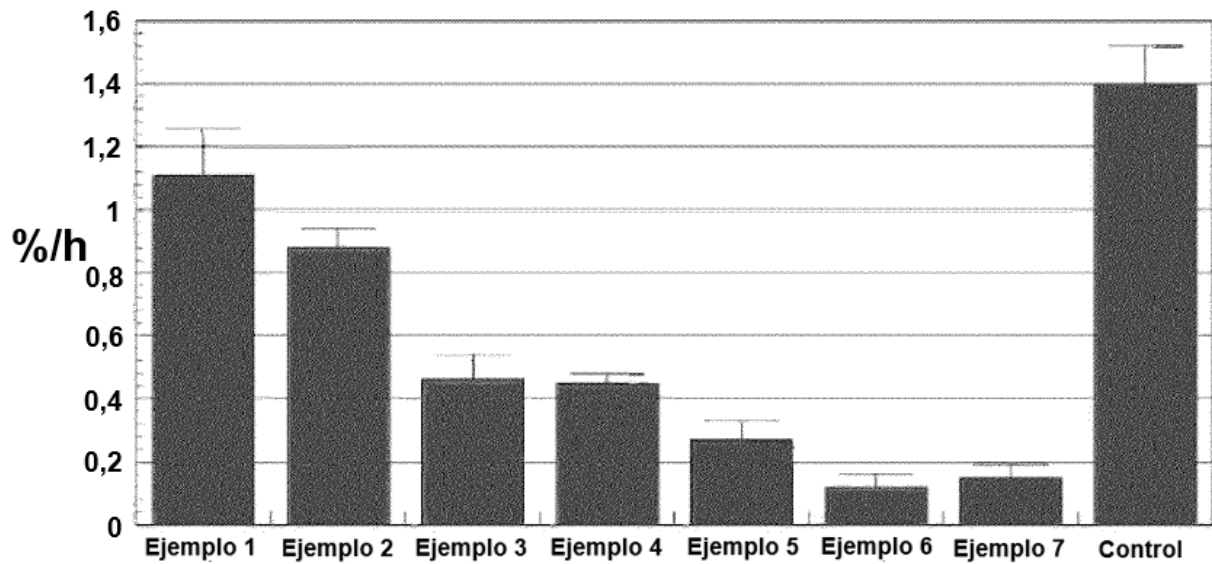


**FIG. 4**



**FIG. 5**

**Velocidad de degradación (%/h)**



|                    |                                |
|--------------------|--------------------------------|
| Ejemplo 1          | pH 9,2 0 h/ pH 4,5 160 h       |
| Ejemplo 2          | pH 9,2 8 h/ pH 4,5 152 h       |
| Ejemplo 3          | pH 9,2 24 h/ pH 4,5 136 h      |
| Ejemplo 4          | pH 9,2 36 h/ pH 4,5 124 h      |
| Ejemplo 5          | pH 9,2 48 h/ pH 4,5 112 h      |
| Ejemplo 6          | pH 9,2 64 h/ pH 4,5 96 h       |
| Ejemplo 7          | pH 9,2 160 h                   |
| Control sin tratar | Pericardio equino sin procesar |

**Leyenda**  
 Velocidad de degradación (%/h)