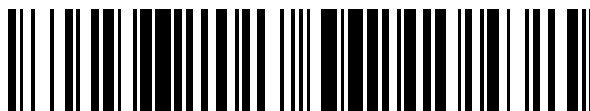


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 575 933**

51 Int. Cl.:

A61L 31/04

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.05.2007** **E 07725680 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.03.2016** **EP 2021045**

54 Título: **Colágeno para su uso en la prevención de la formación de fibrosis epidural después de cirugía espinal**

30 Prioridad:

31.05.2006 US 809591 P

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

04.07.2016

73 Titular/es:

BAXTER INTERNATIONAL INC. (50.0%)

One Baxter Parkway

Deerfield, IL 60015, US y

BAXTER HEALTHCARE S.A. (50.0%)

72 Inventor/es:

ODAR, JOHANN y

NISTOR-GALLO, RAYMOND

74 Agente/Representante:

AZNÁREZ URBIETA, Pablo

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 575 933 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

Colágeno para su uso en la prevención de la formación de fibrosis epidural después de cirugía espinal.

CAMPO DE LA INVENCION

- 5 La presente invención se refiere a la prevención de la adhesión celular posoperatoria o postraumática en la superficie de un tejido seleccionado entre tejido de la columna vertebral, duramadre y nervios raquídeos, que incluye el paso de cubrir y separar el tejido con una lámina multicapa de biomatriz de colágeno bioactiva y biofuncional, y a dirigir el crecimiento celular y la reparación tisular para tratar un trastorno en un mamífero, incluyendo el paso de cubrir y separar dicho tejido con una biomatriz de lámina de colágeno multicapa. La presente invención previene la adhesión epidural y perineural y la formación de tejido cicatricial proporcionando una matriz biofuncional para el crecimiento de células dirigido hacia adentro y la regeneración tisular controlada.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- 15 La formación de cicatrices interiores, la fibrosis epidural y perineural y las adhesiones después de cirugía espinal son efectos secundarios bien conocidos y no deseados de dicha cirugía. Estas condiciones conducen a un alto porcentaje de dolor, a dificultades de movimiento y, con frecuencia, a la necesidad de una cirugía adicional. El uso de un gel que comprende carboximetilcelulosa y óxido de polietileno para reducir adhesiones epidurales después de cirugía espinal se describe en Kim y col.: "Reduction in leg pain and lower- extremity weakness with Oxiplex/SP Gel for 1 year after laminectomy, laminotomy, and discectomy. Neurosurg Focus" 17(1): Clinical Pearl 1: 1-6, 2004); Porchet y col.: "Inhibition of epidural fibrosis with ADCON-L: effect on clinical outcome one year following re-operation for recurrent lumbar radiculopathy." Neurol Res 21 (Suppl 1): 51-S60, (1999); y Ross y col.: "Association between peridural scar and recurrent radicular pain after lumbar discectomy: magnetic resonance evaluation. ADCON-L European Study Group." Neurosurgery 38:855-863, (1996). En estos ejemplos se distribuye un gel de forma no controlada en la zona de aplicación y, una vez aplicado, la distribución del gel no se puede manipular o corregir fácilmente. Además, estos geles antiadherentes tienen un éxito limitado como barrera y tienen un espesor de capa indefinido. Estos geles antiadherentes tienen escasas propiedades hemostáticas, si es que las tienen, y no proporcionan funciones de apoyo a la cicatrización de heridas ni dirigen el crecimiento celular y la regeneración tisular. Incluso existen informes de elevadas tasas de fuga de LCR (líquido cefalorraquídeo) acumuladas en relación con el uso de ADCON-L (Hieb, L. D. & Stevens, D. L. (2001), Spontaneous postoperative cerebrospinal fluid leaks following application of anti-adhesion barrier gel: case report and review of the literature. Spine, 26(7), 748-751.; Kuhn, J., Hofmann, B., Knitelius, H. O., Coenen, H. H., & Bewermeyer, H. (2005); Bilateral subdural haematoma and lumbar pseudomeningocele due to a chronic leakage of liquor cerebrospinalis after a lumbar discectomy with the application of ADCON-L gel. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 76(7), 1031-1033; Le, A. X., Rogers, D. E., Dawson, E. G., Kropf, M. A., De Grange, D. A., & Delamarter, R. B. (2001), Unrecognized durotomy after lumbar discectomy: a report of four cases associated with the use of ADCON-L. Spine. 26(1), 115-7; discusión 118).

- 40 Un producto antiadherente comercial es DURAGEN PLUS. La barrera DURAGEN PLUS, que es de origen bovino, no tiene mucha estabilidad de forma, lo que significa que su forma y posición son difíciles de corregir después de la aplicación. Además, la barrera DURAGEN PLUS no tiene una alta resistencia a la tracción y elasticidad. Dado que la barrera DURAGEN PLUS es porosa, no es hermética a los fluidos (impermeable a los fluidos) y, en consecuencia, tiene un éxito limitado como barrera. Además, DURAGEN PLUS absorbe sangre, lo que puede conducir a bandas de fibrina que desempeñan un papel clave en la patogénesis de las formaciones adhesivas, promoviendo su estructura porosa un crecimiento celular hacia adentro no dirigido, lo que también puede contribuir a una formación no controlada de tejido fibrótico y a adhesiones.

- 45 Por consiguiente, existe una gran necesidad de un nuevo sistema para una regeneración tisular dirigida y controlada con el fin de prevenir la formación de adhesiones epidurales y perineurales posoperatorias o postraumáticas en el proceso de cicatrización y regenerar el tejido después de lesiones quirúrgicas y traumáticas, que no absorba sangre, que apoye el proceso de remodelado, regeneración y cicatrización de heridas, que dirija el crecimiento y el crecimiento celular hacia adentro y que actúe de forma eficaz como capa de separación biofuncional. El documento EP 1 283 063 A1 describe una matriz de colágeno para regeneración tisular que contiene material genético terapéutico; el documento EP 1 484 070 A1 describe una composición para reparar y regenerar duramadre humana; Collins y col. (J. Biomed. Mat. Res. 25(1991), 267-276) se refieren al uso de una película de colágeno como sustituto dural.

- 55 Así, un objeto de la presente invención es proporcionar un nuevo método para prevenir la adhesión y fibrosis epidural o perineural posoperatoria o postraumática, y dirigir el crecimiento celular hacia adentro y controlar la

regeneración tisular mediante el uso de una matriz de lámina de colágeno biofuncional para cubrir y separar tejidos de la columna vertebral.

SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención está definida por el objeto de las reivindicaciones 1 a 9, en concreto colágeno para su uso en la prevención de la formación de fibrosis epidural después de cirugía espinal en un mamífero, estando presente el colágeno en forma de una biomatriz de lámina de colágeno multicapa a escala microscópica, hermética a los fluidos y no porosa, dirigiendo la biomatriz el crecimiento celular en los intersticios entre las capas de colágeno y seleccionándose el colágeno de entre el grupo consistente en colágeno bovino, porcino, equino o humano y sus mezclas. La presente invención se refiere a colágeno para su uso en la prevención de la adhesión y formación de fibrosis epidural o perineural posoperatoria o postraumática, dirigiendo el crecimiento celular y el crecimiento celular hacia adentro y controlando la regeneración tisular después de una cirugía o un traumatismo mediante el uso de una biomatriz de lámina de colágeno multicapa para cubrir y separar tejidos tales como tejidos de la columna vertebral. Los tejidos de la columna vertebral incluyen tejidos como tejidos del canal espinal, duramadre y nervios raquídeos. El colágeno utilizado de acuerdo con la presente invención se puede emplear, por ejemplo, durante una cirugía de columna en un mamífero, por ejemplo un ser humano, incluyendo el paso de cubrir y separar el tejido con una biomatriz de lámina de colágeno multicapa a escala microscópica. En un ejemplo de la presente invención, la biomatriz de lámina de colágeno multicapa atrae células del grupo consistente en células reparativas y regenerativas. En otro ejemplo de la presente invención, la estructura multicapa de la biomatriz de lámina de colágeno biofuncional dirige el crecimiento celular hacia la superficie y el crecimiento hacia adentro de células tales como células reparativas y células regenerativas y se remodela en tejido natural después de reabsorber dicho crecimiento hacia adentro. Además, la presente invención se refiere a colágeno para su uso en el tratamiento de un trastorno en un mamífero caracterizado por un defecto del tejido de la columna vertebral, que incluye el paso de cubrir y separar dicho tejido y/o un tejido circundante con una biomatriz de lámina de colágeno multicapa con el fin de inhibir una formación no controlada de tejido.

Cuando se utilizan terapéuticamente composiciones basadas en colágeno, el huésped normalmente percibe estas composiciones como un cuerpo extraño y con frecuencia las encapsula. Por tanto, la recelularización y el remodelado al tejido anatómico respectivo no se produce o es imposible, no se produce ningún crecimiento celular dirigido hacia adentro y no hay ningún control del proceso de regeneración, por lo que dichas composiciones son meramente toleradas como un implante "biocompatible". En cambio, el colágeno utilizado en la presente invención actúa como una membrana (por ejemplo una membrana espinal) que actúa como una capa de separación temporal bioactiva que dirige el crecimiento celular dentro de la biomatriz de lámina de colágeno multicapa y sobre la superficie de la biomatriz de lámina de colágeno. En lugar de actuar únicamente como una barrera contra el cultivo celular, como la mayor parte de las composiciones antiadhesivas, el colágeno utilizado en la presente invención es sumamente bioactivo y apoya el remodelado de los tejidos. Por ejemplo, dos semanas después del implante, el colágeno utilizado en la presente invención ya está bien integrado en la estructura anatómica restaurada de tejidos epidurales. Además, durante la cirugía y después de la misma, la estructura multicapa hermética a los fluidos (por ejemplo sangre) y no porosa de la membrana de colágeno es capaz de prevenir la distribución incontrolada de material sanguíneo (por ejemplo fibrinógeno/fibrina) y necrótico desde áreas de lesiones epidurales, que favorecen las condiciones de formación de adhesiones en el período de tiempo inicial después de la operación (a diferencia de las composiciones porosas). El colágeno utilizado en la presente invención también impide el contacto directo entre la duramadre y la zona de lesión epidural, el área principal de formación de cicatrices y fibrosis. Esto también contribuye al remodelado controlado de estructuras anatómicas con prevención y minimización de la adhesión incontrolada y de la formación de cicatrices y fibrosis epidural.

BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

- Fig. 1: fotografía SEM (Scanning Electron Microscope - Microscopio Electrónico de Barrido) que ilustra la superficie de una biomatriz de lámina de colágeno biofuncional. La figura muestra claramente fibrillas de colágeno. En la fotografía es evidente que la superficie no es porosa.
- Fig. 2A y 2B: fotografías tomadas bajo condiciones ESEM (Environmental Scanning Electron Microscope - Microscopía Electrónica de Barrido Ambiental), lo que significa condiciones parecidas a las naturales en una atmósfera ligeramente húmeda, que ilustran la superficie superior, vista desde el lado de una biomatriz de lámina de colágeno biofuncional. En las fotografías es evidente que la superficie no es porosa.
- Fig. 3A y 3B: fotografías tomadas bajo condiciones ESEM que ilustran la superficie inferior de una biomatriz de lámina de colágeno biofuncional. La Figura 3 muestra fibrillas de colágeno. En las fotografías es evidente que la superficie no es porosa.

Fig. 4: fotografía SEM que ilustra la superficie de una biomatriz de lámina de colágeno biofuncional hidratada. La Figura 4 muestra claramente fibrillas de colágeno. En la fotografía es evidente que la superficie no es porosa.

- 5 Fig. 5A, 5B y 5C: fotografías tomadas bajo condiciones ESEM (atmósfera húmeda) que ilustran la sección transversal de una biomatriz de lámina de colágeno biofuncional. El material presenta una estructura en pila de láminas empaquetadas muy estrechamente entre sí. La fotografía muestra intersticios entre las capas de colágeno.

Fig. 6A y 6B: fotografías SEM que ilustran la sección transversal de una biomatriz de lámina de colágeno biofuncional seca. Las fotografías muestran múltiples capas de colágeno e intersticios entre las mismas.

- 10 Fig. 7: ilustra una realización de la invención donde la biomatriz de lámina de colágeno biofuncional se coloca sobre los bordes de un defecto en la vértebra producido quirúrgicamente y encima de la duramadre, con el fin de dirigir el crecimiento celular hacia adentro y controlar la regeneración tisular, evitando así la adhesión del tejido de la lesión en regeneración con la duramadre espinal y los nervios raquídeos. En esta realización, los bordes de la biomatriz de lámina de colágeno biofuncional se fijan en la superficie exterior lateral de la lesión vertebral.

- 15 Fig. 8: ilustra otra realización de la invención donde la biomatriz de lámina de colágeno biofuncional está situada debajo de un defecto en la vértebra producido quirúrgicamente y encima de la duramadre, con el fin de prevenir la adhesión del tejido de la lesión en regeneración con la duramadre espinal y los nervios raquídeos. En esta realización, los bordes de la biomatriz de lámina de colágeno biofuncional se fijan en la superficie interior de la vértebra, en el canal espinal.

Fig. 9: vista en sección de la biomatriz de lámina de colágeno una semana después de la operación. La estructura de la superficie no es porosa y forma una barrera temporal. La sangre (eritrocitos) está separada y no penetra en la biomatriz de lámina de colágeno multicapa.

- 25 Fig. 10: muestra la biomatriz de lámina de colágeno una semana después del implante. La paciente humana (edad: 18, sexo: mujer) fue operada en un intervalo de 7 días en el marco de un tratamiento quirúrgico rutinario (epilepsia). La biomatriz de lámina de colágeno se implantó en posición epidural durante la primera cirugía (prevención de fugas de LCR). Durante la segunda cirugía, el implante de biomatriz de lámina de colágeno se retiró rutinariamente antes de reabrir la duramadre. Una semana después del implante epidural, la biomatriz de lámina de colágeno sigue siendo mecánicamente estable y amovible.

- 30 Fig. 11: vista en sección del borde de la biomatriz de lámina de colágeno una semana después del implante. Los fibroblastos han invadido la biomatriz hasta aproximadamente 25 μm desde el lado inferior, extendiéndose en un crecimiento longitudinal dirigido hacia adentro a lo largo de las estructuras multicapa paralelas y creciendo en la biomatriz de lámina de colágeno dirigidos por la estructura multicapa. La penetración en dirección longitudinal es de aproximadamente 220 a 320 μm . La velocidad del crecimiento dirigido hacia adentro de células reparativas a lo largo de la estructura multicapa es aproximadamente de 10 a 15 veces mayor en la dirección longitudinal que en la dirección transversal ("Fig. 10"). Infiltración inflamatoria mínima, que expresa el proceso regenerativo en curso.

- 40 Fig. 12: diapositivas posoperatorias de un conejo blanco de Nueva Zelanda ("NZW") con un aumento x20 con tinción HE tal como se describe en el Ejemplo I. La biomatriz de lámina de colágeno multicapa es una capa de separación entre la duramadre y el área dorsal de la lesión y proporciona una estructura multicapa bioactiva que no es porosa y que es hermética a fluidos tales como sangre.

Fig. 13A: muestra un conejo NZW 1 semana después de la operación; aumento: x2,5; tinción HE. La biomatriz de lámina de colágeno multicapa está cerrando el defecto de laminectomía y separando el espacio epidural de la formación incipiente de una cicatriz dorsal rica en células.

- 45 Fig. 13B: muestra un conejo NZW 1 semana después de la operación; aumento: x20; tinción HE. La figura muestra el área de contacto entre la biomatriz de lámina de colágeno multicapa y el hueso en el borde del defecto (a).

- 50 Fig. 13C: muestra un conejo 1 semana después de la operación; aumento: x20; tinción HE. La biomatriz de lámina de colágeno multicapa está en el centro del defecto de laminectomía. La biomatriz de lámina de colágeno multicapa está integrada y separa el espacio epidural ventral de la formación de cicatriz dorsal.

Fig. 13D: muestra un conejo NZW 1 semana después de la operación; aumento: x2,5; tinción HE. La biomatriz de lámina de colágeno multicapa está cerrando el defecto de laminectomía y separando la

duramadre de la formación incipiente de una cicatriz dorsal rica en células. Las células no han penetrado en la superficie de la biomatriz de colágeno. En el borde de la biomatriz de colágeno está comenzando una infiltración dirigida de células reparativas en la estructura multicapa (a).

5 Fig. 13E: muestra un conejo NZW 1 semana después de la operación; aumento: x2,5; tinción HE. Para cubrir el defecto de laminectomía se ha utilizado una esponja de colágeno (DURAGEN). No hay ninguna capa de separación no porosa clara entre el espacio epidural y el área de lesión dorsal. La esponja está empapada de sangre.

10 Fig. 14A: muestra un conejo dos semanas después de la operación; aumento: x2,5; tinción HE. La biomatriz de lámina de colágeno multicapa está totalmente integrada. Las células reparativas tisulares se han infiltrado en la biomatriz de colágeno y la duramadre está separada por tejido suelto con adipocitos procedentes de la formación de cicatriz y la biomatriz de colágeno remodelada.

15 Fig. 14B: muestra un conejo dos semanas después de la operación; aumento: x4; tinción HE. La biomatriz de lámina de colágeno multicapa está totalmente integrada. Las células reparativas tisulares se han infiltrado en la estructura multicapa de la biomatriz de colágeno. La duramadre está separada por tejido suelto con adipocitos procedentes de la formación de cicatriz y la biomatriz de colágeno remodelada.

Fig. 14C: muestra un conejo dos semanas después de la operación; aumento: x10; tinción HE. La biomatriz de lámina de colágeno multicapa está totalmente integrada. Las células reparativas tisulares se han infiltrado en la estructura multicapa de la biomatriz de colágeno (a). La duramadre está separada por tejido suelto con adipocitos procedentes de la formación de cicatriz y la biomatriz de colágeno remodelada.

20 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

25 La presente invención se refiere a colágeno para su uso para prevenir la adhesión y formación de fibrosis epidural o perineural posoperatoria o postraumática sobre la superficie de tejido de la columna vertebral, incluyendo tejidos seleccionados entre el grupo consistente en tejidos del canal espinal, duramadre y nervios raquídeos, en un mamífero, y comprende el paso de cubrir el tejido y separarlo de otros tejidos circundantes con una biomatriz de lámina de colágeno multicapa a escala microscópica.

30 Esta biomatriz de lámina de colágeno multicapa es una biomatriz multicapa a escala microscópica reticulada nativa colagenosa, consistente en múltiples capas de una lámina esencialmente no porosa formada por fibrillas de colágeno en una biomatriz no natural, por ejemplo tal como se describe en la solicitud de patente internacional WO 04/108179. El colágeno utilizado de acuerdo con la presente invención es biofuncional, bioactivo, mecánicamente estable, elástico, no poroso y hermético a los fluidos, en especial a la sangre, y hermético a las células, y constituye una barrera temporal contra la distribución incontrolada de sangre, fibrinógeno, material necrótico y tejidos dañados. Por consiguiente, una capa de separación bioactiva definida entre los tejidos de la columna vertebral protege inicialmente el tejido de la columna vertebral y tejidos circundantes, pudiendo tanto el uno como los otros estar erosionados o dañados de otro modo. La biomatriz de 35 lámina de colágeno multicapa actúa como un agente hemostático e inhibe la formación y distribución incontrolada de bandas de fibrina y hematomas, que son una de las principales causas de formación de fibrosis y adhesiones, en áreas anatómicas situadas al lado o cerca de la duramadre o de nervios raquídeos.

40 En un ejemplo de la presente invención, las células cuya adhesión con los nervios raquídeos y/o la duramadre se evita mediante el colágeno utilizado en la presente invención se seleccionan de entre células de tejido conjuntivo. El mamífero puede ser cualquier mamífero, como humanos, ratones, ratas, gatos, perros, etc.

45 El paso de cubrir y separar el tejido con una biomatriz de lámina de colágeno biofuncional multicapa se puede llevar a cabo durante el tratamiento de cualquier lesión o defecto de la duramadre espinal o de la columna vertebral. En un ejemplo de la presente invención, el paso de cubrir y separar el tejido con una biomatriz de lámina de colágeno multicapa se puede llevar a cabo durante una cirugía de la columna. En otro ejemplo, la biomatriz de lámina de colágeno multicapa atrae células tales como células reparativas y células regenerativas y dirige su crecimiento hacia adentro a través de la biomatriz de lámina y sobre la misma. La biomatriz de lámina de colágeno multicapa es reabsorbida y remodelada a tejido natural por el crecimiento de células hacia adentro. La biomatriz de lámina de colágeno actúa como un soporte bioactivo y biofuncional 50 para el crecimiento celular hacia adentro *in vivo* y es sustituida por tejido de mamífero durante la regeneración y restauración. La biomatriz de lámina de colágeno es reabsorbible por el mamífero en el que está implantada. Esta propiedad se puede reforzar mediante la biofuncionalidad de las fibras de colágeno reticulado nativo y la estructura multicapa de la biomatriz de lámina de colágeno, como muestran las Fig. 5 - 6.

El proceso empleado para producir la biomatriz de lámina de colágeno a utilizar en la invención forma capas apiladas de fibrillas de colágeno. Entre cada capa hay intersticios dentro de los cuales pueden migrar células y vasculatura del paciente y formar nuevas estructuras de colágeno y tejido de conformación nativa. Una propiedad beneficiosa de la presente invención es que las fibras de colágeno nativo biofuncional y la estructura no porosa de capas de la biomatriz de lámina de colágeno promueven el crecimiento hacia adentro de células y vasculatura y la formación de nuevas estructuras de colágeno a través de la biomatriz de lámina de colágeno y en los intersticios existentes entre sus múltiples capas. En comparación con el crecimiento celular hacia adentro aleatorio, no guiado e incontrolado en la lesión o el defecto, el crecimiento dirigido hacia adentro y la regeneración de acuerdo con la invención previenen la formación de adhesiones y fibrosis, manteniendo la separación de los tejidos en la estructura anatómica de la columna vertebral. Por tanto, se evitan los dolores y complicaciones asociadas a las adhesiones y fibrosis epidurales o perineurales.

La expresión "cubrir el tejido con una biomatriz de lámina de colágeno multicapa" significa en general poner el tejido en contacto físico con una biomatriz de lámina de colágeno multicapa. En un ejemplo de la presente invención, el contacto del tejido con una biomatriz de lámina de colágeno multicapa resulta en una implantación de dicha lámina. En las Fig. 7 - 8 se ilustran ejemplos del posicionamiento de la biomatriz de lámina de colágeno multicapa.

Tal como se utiliza aquí, la expresión "biomatriz de lámina de colágeno multicapa" o "biomatriz de colágeno" o "lámina de colágeno" significa una biomatriz (es decir, una matriz de material biocompatible y biofuncional) de fibrillas de colágeno nativo tratada para eliminar componentes no colágenos y para formar una lámina de fibrillas de colágeno con una estructura laminar multicapa a escala microscópica. La lámina de colágeno multicapa puede proceder de cualquier fuente, por ejemplo de origen bovino, ovino, porcino, equino o humano tratado para eliminar componentes no colágenos y para formar una lámina de fibrillas de colágeno con las mismas características físicas. Esta biomatriz de lámina de colágeno es esencialmente no porosa, tal como se puede determinar mediante microscopía electrónica de barrido.

El término "biofuncional" tal como se utiliza aquí en el contexto de una biomatriz de lámina multicapa biofuncional significa que la biomatriz consiste en fibrillas de colágeno nativo que son reconocidas y utilizadas por las células de un animal de modo similar a las fibrillas de colágeno nativo del animal. Por ejemplo, estas funciones pueden incluir, de forma no exclusiva, la migración de células reparativas y regenerativas a lo largo de las fibrillas de colágeno biofuncional y la estructura multicapa, y la deposición de una nueva matriz extracelular por las células incluyendo, o sustituyendo, las fibrillas de colágeno biofuncional.

Tal como se utiliza aquí, la expresión "biomatriz no natural" significa una matriz o armazón fabricado que comprende fibrillas de colágeno nativo formadas a partir de (i) un material existente en la naturaleza (es decir, material natural) que ha sido tratado o procesado de modo que las fibrillas de colágeno contenidas en el material natural han sido movidas o reposicionadas desde su disposición natural dentro de la estructura de colágeno del material natural; o (ii) un material no existente en la naturaleza (es decir, un material artificial, no natural, tal como un material recombinante), tratado o procesado para manipular la disposición de las fibrillas de colágeno. Por ejemplo, una biomatriz no natural se puede formar a partir de un material inicial que incluye colágeno que ha sido procesado mecánica o químicamente (por ejemplo molido, triturado, etc.). Una biomatriz de colágeno formada a partir del tratamiento o procesamiento de material inicial de un modo que preserva la estructura del armazón de colágeno natural es una biomatriz no natural (por ejemplo, tejido epidérmico tratado para eliminar componentes celulares y al mismo tiempo preservar la estructura de colágeno natural).

En una realización del colágeno para su uso de acuerdo con la presente invención, la biomatriz de lámina de colágeno está formada por proteínas de tejido conjuntivo consistentes en fibrillas de colágeno. Por ejemplo, la biomatriz de lámina de colágeno puede estar formada por proteínas de tejido conjuntivo consistentes en fibrillas de colágeno de Tipo I. Además de estar formado por fibrillas de colágeno, la biomatriz de lámina de colágeno también puede incluir un excipiente, un conservante, un factor de crecimiento o un aditivo que contribuya a la flexibilidad y elasticidad del producto final.

Cada capa de fibrillas de colágeno es esencialmente no porosa. La expresión "esencialmente no porosa", tal como se utiliza aquí, significa que los poros presentes en una biomatriz de lámina de colágeno como resultado de la precipitación de fibrillas de colágeno para formar una lámina de colágeno están fundamentalmente aislados entre sí. Los poros no están interconectados de modo que atraviesen el espesor de la lámina de colágeno. Las perforaciones mecánicas que crean orificios en la biomatriz de lámina de colágeno no son poros. En un ejemplo de la presente invención, el material está esencialmente libre de poros que serían visibles utilizando un microscopio electrónico de barrido con un aumento 1500x. Las fotografías de microscopía electrónica de barrido ilustran la naturaleza no porosa de la biomatriz de lámina de colágeno, como muestran las Fig. 1 - 4.

En una realización del colágeno a utilizar de acuerdo con la presente invención, la biomatriz de lámina de colágeno multicapa utilizada en la presente invención es una membrana de colágeno multicapa no natural consistente en capas de numerosas fibrillas de colágeno entrelazadas en múltiples direcciones. Por consiguiente, las fibrillas de colágeno están dispuestas de modo multidireccional en un plano, formando estos
 5 planos láminas que generan una estructura multicapa. En una microfotografía (SEM)¹ que ilustra la superficie de la biomatriz de lámina de colágeno en la que están integradas las fibrillas de colágeno (Fig. 1) se puede ver una ilustración de una biomatriz de lámina de colágeno seca. Las fibrillas de colágeno son visibles sobre la superficie en fotografías de la superficie superior de la biomatriz de lámina de colágeno bajo condiciones ESEM (microscopía electrónica de barrido ambiental), en las que una atmósfera ligeramente húmeda
 10 proporciona unas condiciones similares a las naturales. La superficie parece lisa y esencialmente no porosa (Fig. 2). Fotografías (ESEM) de la superficie inferior de la biomatriz de lámina de colágeno ilustran la no porosidad esencial de la biomatriz de lámina de colágeno en la Fig. 3.

La orientación única de las fibras de colágeno en direcciones bidimensionales en las múltiples capas es la causa principal de la hermeticidad a los líquidos, incluso bajo una alta presión hidrostática, y proporciona una
 15 gran resistencia y una alta elasticidad. Debido a las numerosas capas de fibrillas de colágeno delgadas orientadas de forma paralela de la biomatriz de lámina de colágeno, este material es adecuado para la sustitución temporal del tejido propio del cuerpo al cerrar y separar el defecto después de cubrirlo y proporciona un soporte de biomatriz biofuncional para el crecimiento de células hacia adentro con el fin de formar nuevo tejido. Esta estructura multicapa incrementa la característica de hermeticidad a los líquidos de
 20 la biomatriz de lámina de colágeno.

Aunque la biomatriz de lámina de colágeno es esencialmente no porosa, entre las capas de fibrillas de colágeno existen intersticios. La biomatriz de lámina de colágeno es análoga a una pila de hojas donde cada hoja es esencialmente lisa y no porosa, con un espacio entre cada hoja. Cuando la biomatriz está en forma
 25 seca, los intersticios son más pronunciados. Los intersticios se reducen cuando la biomatriz de lámina de colágeno se observa bajo condiciones parecidas a las naturales en una atmósfera ligeramente húmeda. La reducción de los intersticios de la biomatriz de lámina de colágeno se ilustra en fotografías de secciones transversales de biomatriz de lámina de colágeno en una atmósfera húmeda en la Fig. 5. Además de promover la propiedad de hermeticidad a los líquidos, las numerosas capas de fibrillas de colágeno delgadas orientadas de forma paralela de la biomatriz de lámina de colágeno sirven al mismo tiempo como soporte
 30 biofuncional bioequivalente para el crecimiento de células hacia adentro para la construcción de novo del tejido propio del cuerpo.

El cambio de volumen de la biomatriz de lámina de colágeno a utilizar de acuerdo con la presente invención es pequeño o insignificante cuando se hidrata. A diferencia de los productos de sustitución porosos, la biomatriz de lámina de colágeno mantiene esencialmente su tamaño y forma al ser hidratada, presentando
 35 una excelente estabilidad de forma incluso después de la hidratación y sin producir ningún problema de hinchamiento o encogimiento después del contacto con el tejido. Una vez hidratada e implantada, la biomatriz de lámina de colágeno no se expande o contrae significativamente en su área o espesor en una medida en que podría romper suturas quirúrgicas o romper obturaciones de fibrina u otro adhesivo biocompatible que sujetan la biomatriz de lámina de colágeno al tejido del paciente.

En un ejemplo de la presente invención, el encogimiento o hinchamiento del área de la biomatriz de lámina de colágeno seca puede variar entre aproximadamente un -5% y aproximadamente un 20% cuando se hidrata por completo. En otro ejemplo, el área de la biomatriz de lámina de colágeno seca puede variar entre
 40 aproximadamente un -5% y aproximadamente un 10% cuando se hidrata por completo. En un ejemplo más, el área de la biomatriz de lámina de colágeno seca puede variar entre aproximadamente un -5% y aproximadamente un 5% cuando se hidrata por completo. Por ejemplo, el área de la biomatriz de lámina de colágeno seca aumenta a lo sumo aproximadamente un 4 por ciento cuando se hidrata por completo.
 45

En un ejemplo de la presente invención, la biomatriz de lámina de colágeno aumenta hasta aproximadamente 6 veces su espesor en seco cuando se hidrata por completo. En otro ejemplo, la biomatriz de lámina de colágeno aumenta hasta aproximadamente 3 veces su espesor en seco cuando se hidrata por completo. En
 50 otro ejemplo, la biomatriz de lámina de colágeno aumenta hasta aproximadamente dos veces su espesor en seco cuando se hidrata por completo.

El espesor de la biomatriz de lámina de colágeno utilizada en la presente invención puede variar en función de las necesidades de una aplicación particular. Mediante la variación de la cantidad de material inicial utilizado para producir un tamaño particular de biomatriz de lámina de colágeno se puede controlar el espesor
 55 de la biomatriz de lámina de colágeno. En un ejemplo de la presente invención, la biomatriz de lámina de colágeno utilizada de acuerdo con la presente invención, cuando está en forma seca, tiene un espesor entre aproximadamente 0,01 mm y aproximadamente 3,0 mm. En otro ejemplo, la biomatriz de lámina de colágeno tiene un espesor entre aproximadamente 0,02 mm y aproximadamente 2,0 mm. En otro ejemplo, la biomatriz

de lámina de colágeno tiene un espesor entre aproximadamente 0,03 mm y aproximadamente 1,5 mm. En otro ejemplo, la biomatriz de lámina de colágeno tiene un espesor entre aproximadamente 0,05 mm y aproximadamente 1 mm. En un ejemplo más, la biomatriz de lámina de colágeno tiene un espesor de aproximadamente 1,0 mm o inferior.

- 5 El peso seco de la biomatriz de lámina de colágeno depende del espesor deseado. En un ejemplo, el peso seco de la biomatriz de lámina de colágeno oscila entre aproximadamente 1 mg/cm² y aproximadamente 50 mg/cm². En otro ejemplo, el peso seco de la biomatriz de lámina de colágeno oscila entre aproximadamente 1,5 mg/cm² y aproximadamente 30 mg/cm². En otro ejemplo más, el peso seco de la biomatriz de lámina de colágeno oscila entre aproximadamente 2 mg/cm² y aproximadamente 20 mg/cm². En otro ejemplo, el peso
10 seco de la biomatriz de lámina de colágeno oscila entre aproximadamente 2,5 mg/cm² y aproximadamente 15 mg/cm². Por ejemplo, el peso seco de la biomatriz de lámina de colágeno oscila entre aproximadamente 3 mg/cm² y aproximadamente 10 mg/cm².

- 15 En un ejemplo de la presente invención, el peso de la biomatriz de lámina de colágeno aumenta hasta aproximadamente 15 veces su peso seco cuando se hidrata. En otro ejemplo, el peso de la biomatriz de lámina de colágeno aumenta hasta aproximadamente 10 veces su peso seco cuando se hidrata. En otro ejemplo el peso de la biomatriz de lámina de colágeno aumenta hasta aproximadamente 7 veces su peso seco cuando se hidrata. En un ejemplo más, el peso de la biomatriz de lámina de colágeno aumenta hasta aproximadamente 5 veces su peso seco cuando se hidrata desde su estado seco.

- 20 La biomatriz de lámina de colágeno utilizada de acuerdo con la presente invención tiene una resistencia a la tracción que mejora y favorece su manejo, por ejemplo durante la aplicación quirúrgica, y proporciona una mayor estabilidad mecánica, por ejemplo después del implante. Además, el aumento del espesor de la biomatriz de lámina de colágeno puede aumentar significativamente la resistencia a la tracción.

- 25 La tendencia del material de la biomatriz de lámina de colágeno a romperse bajo una presión ejercida se puede medir como su "carga de rotura por tracción" o "fuerza de rotura por tracción", designada en adelante como "fuerza de rotura por tracción". La fuerza de rotura por tracción de una biomatriz de lámina de colágeno se puede determinar sometiendo a presión una tira de biomatriz de lámina de colágeno con una anchura especificada y determinando la cantidad de presión aplicada que conduce a un fallo, (por ejemplo desgarro o rotura) de la biomatriz de lámina de colágeno. La fuerza de rotura por tracción se puede cuantificar utilizando la siguiente ecuación: "fuerza de rotura por tracción" = fuerza aplicada/anchura de la tira de biomatriz de
30 lámina de colágeno = newtons/cm-tira.

- En un ejemplo del colágeno utilizado de acuerdo con la presente invención, la biomatriz de lámina de colágeno tiene una fuerza de rotura por tracción entre aproximadamente 1 y aproximadamente 30 newtons/cm-tira, por ejemplo entre aproximadamente 1,5 y aproximadamente 15 newtons/cm-tira, por ejemplo entre aproximadamente 2 y aproximadamente 10 newtons/cm-tira, por ejemplo entre
35 aproximadamente 3 y aproximadamente 6 newtons/cm-tira.

Aunque la biomatriz de lámina de colágeno de acuerdo con la presente invención tiene una alta resistencia a la tracción, sigue siendo elástica y flexible cuando está hidratada. Esta característica permite adaptar la biomatriz de lámina de colágeno óptimamente a las condiciones anatómicas (por ejemplo curvas) presentes en el sitio de contacto.

- 40 Cuando está hidratada, la biomatriz de lámina de colágeno se puede mover fácilmente, por ejemplo en el sitio quirúrgico, y modelar y adaptar óptimamente a la forma y posición del defecto, por ejemplo donde está siendo implantada. Una vez implantado, el injerto de biomatriz de lámina de colágeno sigue siendo liso y se puede cambiar de posición en caso necesario. Con el paso del tiempo, las células y la vasculatura migran de forma dirigida a través de las múltiples capas de la biomatriz de lámina de colágeno multicapa, sustituyendo
45 finalmente la biomatriz de lámina de colágeno multicapa por tejido nuevo. Con la migración de las células y la formación de vasculatura dentro de las capas de la biomatriz de lámina de colágeno, el tejido adopta la forma de la biomatriz de lámina de colágeno de modo dirigido. Después de la organización celular de la biomatriz de lámina de colágeno con el tejido conjuntivo recién formado, la formación de adhesiones con tejidos de la duramadre espinal y los nervios raquídeos se reduce al mínimo.

- 50 El colágeno utilizado para la producción de la biomatriz de lámina de colágeno se puede obtener de cualquier fuente adecuada. Por ejemplo, de forma no exclusiva, el colágeno puede ser de origen bovino, ovino, porcino, equino o humano. El colágeno se puede tomar de un tejido natural, como tendón, corion u otro tejido rico en colágeno, o se puede producir por medios genéticos recombinantes. Tal como se describe más abajo, en un ejemplo de realización de la invención se utiliza colágeno equino derivado del tendón de Aquiles.

Durante el proceso de producción, por ejemplo tal como se describe en el documento WO 04/108179, las fibrillas de colágeno se reticulan de forma natural cuando precipitan de la solución formando una lámina de colágeno. A diferencia de la reticulación de las fibrillas de colágeno con sustancias químicas o radiación (por ejemplo radiación ionizante o ultravioleta), al permitir la reticulación natural de las fibrillas de colágeno se asegura su biofuncionalidad, se promueve una regeneración acelerada y se reducen los tiempos de reabsorción una vez que la biomatriz de lámina de colágeno entra en contacto con el tejido. La reticulación de las fibrillas de colágeno con sustancias químicas o radiación puede conducir a un aumento de los tiempos de reabsorción o incluso a una ausencia de reabsorción, y también a una encapsulación y formación de cicatriz. La reticulación natural de las fibrillas en la biomatriz de lámina de colágeno utilizada en la invención se produce por medios naturales, de tipo fisiológico. Principalmente, esta reticulación natural se produce por interacciones no covalentes (por ejemplo interacciones van der Waals o dipolo-dipolo) o por la formación de enlaces de base de Schiff fácilmente disociables entre las cadenas laterales de aminoácidos de la molécula de colágeno. La reticulación intermolecular de colágeno determina la estabilidad física y química. El paso clave en la formación de enlaces reticulados de colágeno depende de la conversión enzimática de residuos de lisina o hidrolisina y da lugar a aldehídos, alisina e hidroxialisina. Estos grupos aldehído reaccionan espontáneamente con grupos amino reactivos, dando lugar a la formación de componentes de base de Schiff que contienen productos de condensación aldólica lábiles con enlaces de aldimina lábiles (por ejemplo -CH=N-). Por consiguiente, las fibrillas del producto de la presente invención se pueden disociar mediante tratamiento con un ácido débil, por ejemplo. La reticulación resultante del uso de agentes reticulantes químicos se puede detectar a partir de la presencia de fracciones reticulantes reticuladas de forma covalente estable. Normalmente, esto se lleva a cabo utilizando un reactivo de base de Schiff (por ejemplo glutaraldehído) para formar productos de reacción de base de Schiff, y estabilizando después los enlaces mediante una reestructuración de Amadori o bajo condiciones de reducción. Además, el colágeno se puede reticular con diversos reactivos de carbodiimida bifuncionales. La reticulación resultante del uso de radiación se puede detectar por la presencia de enlaces covalentes estables entre las fibrillas de colágeno, producidos por la reacción de fracciones de radicales libres generados durante la irradiación. Por otro lado, las fibrillas del producto de la presente invención esencialmente no están reticuladas con enlaces covalentes estables y no han sido sometidas a ningún tratamiento químico o por irradiación. Por consiguiente, las asociaciones entre las fibrillas del producto de la invención son esencialmente no covalentes o fácilmente reversibles, y no están reticuladas de forma estable. En el pasado se han utilizado cianimida, glutaraldehído, formaldehído, acrilamida, carbodiimidodionas, diimidatos, bisacrilamidas y similares para reticular químicamente fibrillas de colágeno. Sin embargo, el uso de estas sustancias químicas puede implicar riesgos de toxicidad asociados a un contacto involuntario de tejido neural con sustancias químicas residuales en la biomatriz de lámina de colágeno. De este modo, el proceso de precipitación evita los riesgos de toxicidad de las sustancias químicas reticulantes y los mayores tiempos de reabsorción asociados con la reticulación de las fibrillas de colágeno con sustancias químicas o radiación.

La composición de colágeno precipitada seca resultante forma una biomatriz de lámina de colágeno que consta de una membrana de colágeno multicapa de alto peso molecular que consiste en numerosas capas de fibrillas de colágeno entrelazadas naturalmente en múltiples direcciones de forma bidimensional. La biomatriz de lámina de colágeno contiene principalmente colágeno de Tipo I intersticial. La biomatriz de lámina de colágeno no tiene esencialmente ningún poro y es fundamentalmente hermética a los líquidos. El producto se puede someter a pruebas de difusión inmunitaria para garantizar la ausencia de proteínas extrañas. La biomatriz de lámina de colágeno se puede esterilizar por gas con óxido de etileno (OET) o un gas de esterilización similar, o por irradiación.

Una importante ventaja del uso de una biomatriz de lámina de colágeno equino como colágeno en la presente invención estriba en el riesgo considerablemente bajo de transmisión de una enfermedad a un paciente que entre en contacto con dicha lámina. El proceso de producción en el que las fibrillas de colágeno se tratan con ácidos (por ejemplo ácido clorhídrico, ácido acético y similares) y bases, como hidróxido de sodio, para producir la lámina de colágeno equino actúa beneficiosamente inactivando o reduciendo los niveles infecciosos de bacterias, virus y priones eventualmente presentes. Los tratamientos de biomateriales con ácido clorhídrico, hidróxido de sodio, óxido de etileno (OET) y similares han sido reconocidos en el estado anterior de la técnica como métodos aprobados de acuerdo con las regulaciones de fármacos y biomateriales para inactivar priones y virus. Bajo determinadas regulaciones, dichos tratamientos pueden reducir los requisitos reglamentarios para el ensayo de la lámina de colágeno equino por lotes. Por tanto, el tratamiento de las fibrillas de colágeno durante el proceso de producción aumenta la seguridad del producto y reduce el riesgo de transmisión de enfermedades a los pacientes.

No se conoce ningún caso en el que un material equino sometido al proceso de producción arriba descrito haya transmitido algún patógeno a un paciente. Por tanto, además del proceso de producción, la utilización de colágeno de origen equino también evita los riesgos de transmisión de la encefalopatía espongiiforme previamente asociada a materiales cadavéricos humanos. El uso de colágeno derivado de un origen equino, como colágeno derivado de tendones de Aquiles equinos, evita el riesgo de transmisión de la encefalopatía

espongiforme transmisible (EET), también conocida como encefalopatía espongiforme bovina (EEB) o *scrapie*. La transmisión de esta enfermedad se ha asociado con el uso de material biológico obtenido de rumiantes (por ejemplo material biológico de ganado bovino, cabras, ovejas y similares).

- 5 La biomatriz de lámina de colágeno utilizada de acuerdo con la presente invención, en la que el colágeno se deriva de un origen equino y se ha tratado adicionalmente (por ejemplo con enzimas), reduce el riesgo de provocar una respuesta inmunitaria.

- 10 La biomatriz de lámina de colágeno de origen equino también reduce la respuesta inflamatoria. En comparación con láminas que contienen colágeno derivado de fuentes tales como fascia lata humana, la cantidad de células inflamatorias resultantes del contacto con la biomatriz de lámina de colágeno equino es considerablemente más baja.

- 15 Antes de su uso, la biomatriz de lámina de colágeno seca se puede hidratar, por ejemplo en solución salina fisiológica. En un ejemplo, la solución salina fisiológica es una solución de cloruro de sodio al 0,9%. En otro ejemplo, la biomatriz de lámina de colágeno se hidrata en soluciones que contienen excipientes o fármacos. El tiempo necesario para hidratar la biomatriz de lámina de colágeno depende del espesor de la lámina. La biomatriz de lámina de colágeno se hidrata hasta que presenta un espesor uniforme en toda su área. En un ejemplo, la biomatriz de lámina de colágeno se hidrata entre aproximadamente 0,5 segundos y aproximadamente 1 hora en solución salina fisiológica. En otro ejemplo, la biomatriz de lámina de colágeno se hidrata entre aproximadamente 0,5 segundos y aproximadamente 30 minutos en solución salina fisiológica. En otro ejemplo, la biomatriz de lámina de colágeno se hidrata entre aproximadamente 0,5 segundos y aproximadamente 20 minutos en solución salina fisiológica. En otro ejemplo, la biomatriz de lámina de colágeno se hidrata entre aproximadamente 0,5 segundos y aproximadamente 10 minutos en solución salina fisiológica. En un ejemplo más, la biomatriz de lámina de colágeno se hidrata entre aproximadamente 0,5 segundos y aproximadamente 2 minutos en solución salina fisiológica. En otro ejemplo, la biomatriz de lámina de colágeno se hidrata entre aproximadamente 0,5 segundos y aproximadamente 10 segundos en solución salina fisiológica, por ejemplo sumergiendo la biomatriz de lámina de colágeno en solución salina fisiológica. En otro ejemplo, la biomatriz de lámina de colágeno no se hidrata antes de ponerla en contacto con el tejido.

- 30 La biomatriz de lámina de colágeno se puede fijar al tejido del paciente mediante técnicas quirúrgicas establecidas, por ejemplo con sellante de fibrina, adhesivo tisular, suturas quirúrgicas o mediante técnicas quirúrgicas de ajuste a presión. Alternativamente, puede emplearse la atracción natural entre la biomatriz de lámina de colágeno y el tejido, o la sangre sobre la superficie del tejido, para fijar la biomatriz de lámina de colágeno al tejido sin emplear ningún sellante, adhesivo, sutura o técnica de ajuste a presión. Una vez hidratada, la biomatriz de lámina de colágeno se puede cortar a un tamaño ligeramente mayor que, por ejemplo, la abertura quirúrgica en el tejido del paciente. Así, la biomatriz de lámina de colágeno solapa ligeramente el tejido del paciente al que está unida. En un ejemplo, la biomatriz de lámina de colágeno hidratada se dimensiona de modo que conforme un solapamiento de aproximadamente 0,5 cm a aproximadamente 1 cm con el tejido. La magnitud del solapamiento puede variar en función de las preferencias y la habilidad del cirujano.

- 40 En un ejemplo, de acuerdo con la muy conocida interacción del colágeno con fibrinógeno o fibronectina, la biomatriz de lámina de colágeno se puede fijar en su sitio con un sellante de fibrina. Ejemplos de sellantes de fibrina aprobados para uso quirúrgico incluyen los sellantes de fibrina TISSUCOL y TISSEEL (Baxter AG, Viena, Austria). Alternativamente también se puede utilizar un adhesivo tisular que no induzca una reacción inflamatoria extensa y que esté aprobado para el uso en cirugía espinal. El sellante de fibrina o el adhesivo tisular se pueden aplicar en una línea continua alrededor de la parte de la biomatriz de lámina de colágeno que solapa el tejido para formar un sellado hermético a los líquidos. Una fijación con sellado hermético a los líquidos resulta ventajosa, ya que evita las complicaciones asociadas al contacto de los tejidos adyacentes con hemorragias, por ejemplo la inducción de formación de adhesiones por fibrina. En otro ejemplo, la biomatriz de lámina de colágeno produce un sellado hermético a los líquidos cuando se fija al tejido con una línea continua de sellante de fibrina o adhesivo tisular. En otro ejemplo, la biomatriz de lámina de colágeno que solapa el tejido se puede dotar de sellante de fibrina o adhesivo tisular para fijarla al tejido. En otro ejemplo más, la biomatriz de lámina de colágeno se fija suturándola quirúrgicamente en el tejido una vez colocada en el sitio de contacto deseado. Si la biomatriz de lámina de colágeno se sutura, se deben utilizar técnicas de sutura sin tensión para no romper la lámina. Es recomendable sellar las líneas de sutura, por ejemplo con un sellante de fibrina. En otro ejemplo, la biomatriz de lámina de colágeno se posiciona e implanta de acuerdo con técnicas de ajuste a presión conocidas. En esta técnica, la biomatriz de lámina de colágeno se coloca en el sitio de implantación deseado y se mantiene en su lugar gracias a los tejidos circundantes. Por tanto, el injerto permanece en su lugar sin utilizar suturas quirúrgicas, sellante de fibrina o adhesivo tisular. En otro ejemplo, la biomatriz de lámina de colágeno se coloca e implanta sin utilizar ningún sellante, adhesivo, sutura o técnica de ajuste a presión. En esta técnica, la biomatriz de lámina de colágeno

se coloca en el sitio de implantación deseado y se mantiene en su lugar mediante la atracción natural o la adhesión que se produce entre la biomatriz de lámina de colágeno y el tejido mamífero. En otro ejemplo, la biomatriz de lámina de colágeno se puede aplicar y fijar mediante cualquiera de los métodos arriba indicados, y después se puede aplicar y fijar otra biomatriz de lámina de colágeno a un tejido adyacente mediante cualquiera de los métodos arriba indicados, con lo que resultan láminas adyacentes de la biomatriz de lámina de colágeno.

Opcionalmente, la biomatriz de lámina de colágeno se puede utilizar junto con otros productos. Por ejemplo, después de aplicar la biomatriz de lámina de colágeno en el tejido y de fijarla por cualquiera de los medios arriba descritos, se puede aplicar un producto antiadherente sobre la superficie superior o inferior de la biomatriz de lámina de colágeno o sobre tejidos adyacentes. En una realización, sobre la superficie superior o inferior de la biomatriz de lámina de colágeno o sobre tejidos adyacentes se puede aplicar un producto basado en PEG, como CoSeal(R) (disponible en Baxter Healthcare corporation). Dado que esta biomatriz de lámina de colágeno previene la adhesión separando los tejidos y dirigiendo la regeneración tisular, más que creando una superficie "resbaladiza", su acción se puede complementar utilizando productos que creen temporalmente una superficie "resbaladiza" sobre la que no se adhieran las células. En otra realización se puede utilizar una biomatriz de lámina de colágeno lista para el uso que ya está revestida con un producto basado en PEG en una o en las dos superficies.

Adicionalmente, la presente invención se refiere al colágeno para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 9 en la producción de un medicamento, es decir, un material aplicable médicamente a un mamífero para tratar trastornos tales como, por ejemplo, lesiones, cirugías o enfermedades producidas por patógenos, caracterizados por una desconexión de un tejido seleccionado de entre el grupo consistente en la columna vertebral y la duramadre, y el tejido circundante.

Ejemplos: Formación de adhesiones y fibrosis, principios básicos y objetivo del estudio

La formación de un exceso de tejido cicatricial y adhesiones representa un grave problema en la cirugía de columna y frecuentemente provoca dolor radicular y deterioro físico, por ejemplo cirugía de disco lumbar fracasada o síndrome post-discectomía. La literatura señala una incidencia de lesión de duramadre entre un 5 y un 10% en caso de cirugía de revisión.

Los parámetros críticos más importantes para el desarrollo posoperatorio y la extensión de la formación de adhesiones son:

- la situación preoperatoria del área quirúrgica (adhesiones/fibrosis existentes, incluyendo una predisposición genética del paciente);
- la realización intraoperatoria de la cirugía (magnitud del área lesionada, evitar lesiones de tejidos y determinadas estructuras anatómicas (por ejemplo membranas), cuidar la hemostasia, evitar que se sequen tejidos, etc.); y
- medidas intraoperatorias para la prevención y minimización de adhesiones posoperatorias, por ejemplo implantación de implantes antiadherentes como esponjas, láminas o gel.

Debido a las múltiples causas de las adhesiones, las medidas quirúrgicas nunca pueden llegar a prevenir el 100% de las adhesiones en cada paciente, pero se puede influir en las condiciones previas de los parámetros arriba mencionados. El objetivo quirúrgico es optimizar la situación de la lesión quirúrgica durante la cirugía y en el período posoperatorio temprano. Es sabido que las condiciones de la lesión en este período son la causa principal de la formación de cualquier adhesión posoperatoria y la formación de fibrosis.

Teniendo en cuenta la patogénesis de las adhesiones/fibrosis epidurales, la investigación del efecto de medios y productos que potencialmente protegen la duramadre y previenen y minimizan la adhesión [continuar con la página 26 originalmente presentada] durante la formación de la cicatriz fisiológica en el área de la lesión dorsal epidural se centran en el primer período posoperatorio (aproximadamente de una a dos semanas después de la operación). Este es el período de tiempo más importante para determinar si una composición particular cumple la función de proteger y separar la duramadre de la formación de cicatriz en el área del defecto quirúrgico dorsal y evitar una distribución posoperatoria incontrolada de sangre, fibrinógeno, fibrina y material necrótico, que son los principales factores y la causa subyacente de cualquier formación de cicatriz/adhesión/fibrosis incontrolada. La situación a las dos semanas después de la operación permite evaluar la integración del implante y sacar conclusiones sobre el tipo y potencial de la bioactividad, biofuncionalidad y compatibilidad tisular de los implantes. Por ejemplo, ¿después de dos semanas el implante está bien aceptado y está celularizado e integrado en la anatomía dorsal o, por el contrario, actúa como un cuerpo extraño a largo plazo y provoca encapsulaciones y formación de cicatriz? El objetivo de los siguientes ejemplos es evaluar la biofuncionalidad como una capa de separación temporal y como biomatriz para el crecimiento celular y la regeneración tisular de una biomatriz de lámina de colágeno biológico en el período

posoperatorio y el valor para la prevención y minimización de una adhesión clínicamente relevante y una formación incontrolada de tejido cicatricial.

Ejemplo I: Materiales y métodos: Experimentos con animales que muestran una reducción de las adhesiones en la cirugía de la columna utilizando la biomatriz de lámina de colágeno biofuncional

- 5 A) Materiales y métodos tal como se muestra en las Fig. 7-9:

Animales: conejos blancos de Nueva Zelanda, de ambos sexos, 4 kg de peso. Origen: Charles River, Sulzfeld, Alemania, o Harlan Winkelmann, D-33178 Borcheln.

Modelos y grupos:

- 10 Uso de una biomatriz de lámina de colágeno biofuncional: laminectomía, exposición de la raíz de los nervios raquídeos y aplicación de la biomatriz de lámina de colágeno. Cada grupo incluye 20 animales.

Grupo 1: laminectomía, cierre de la piel (control).

Grupo 2: laminectomía, cubierta con biomatriz de lámina de colágeno.

Cirugía:

- 15 Los animales se colocaron en una posición en decúbito abdominal y se inmovilizaron con el área quirúrgica (columna lumbar) rasurada. Bajo condiciones estériles, después de una incisión mediana de la piel se desprendió la musculatura vertebral de las apófisis espinosas y se expusieron las láminas de la columna vertebral lumbar. Después se llevó a cabo una hemilaminectomía de la tercera y la cuarta vértebra lumbar. Luego se expusieron las dos raíces de los nervios espinales correspondientes y los canales de las raíces. También se describe la continuación de la cirugía de acuerdo con los diferentes grupos.

- 20 Anestesia general: Ketavet 60 mg/kg
Rompun 16 mg/kg s.c.
Tiopental i.v. a través de vena de la oreja, basado en el efecto.
Narcosis, intubación, ventilación mecánica.
25 Medicación analgésica: 2 x día. Temgesic 0,05 mg/kg s.c. durante 3-4 días después de la operación.
Eutanasia: Sobredosis i.v. de barbiturato en anestesia general.

Evaluación y examen patológico:

- 30 Cada grupo de animales fue sacrificado de la siguiente manera: 10 animales después de 10 días, 10 animales después de 4 semanas y 10 animales después de 3 meses. Parámetros de evaluación: extensión de adhesiones y fibrosis. A continuación, se llevó a cabo una histología extensa. Los experimentos mostraron una reducción de la formación de adhesiones en el grupo en el que se utilizó la biomatriz de lámina de colágeno biofuncional.

Ejemplo II: Biomatriz de lámina de colágeno una semana después de la implantación en un paciente humano

- 35 El paciente humano (edad: 18, sexo: mujer) fue operado en el intervalo de 7 días en el marco de un tratamiento quirúrgico rutinario (epilepsia). La biomatriz de lámina de colágeno se implantó en posición epidural durante la primera cirugía (prevención de fugas de LCR). Durante la segunda cirugía, el implante de biomatriz de lámina de colágeno se retiró rutinariamente antes de reabrir la duramadre. Una semana después de la implantación epidural, la biomatriz de lámina de colágeno sigue siendo mecánicamente estable y amovible, tal como muestra la Fig. 10.

- 40 La Fig. 11 es una vista en sección de la biomatriz de lámina de colágeno de la Fig. 10 una semana después de la implantación. Como se puede ver, en la biomatriz de lámina de colágeno están creciendo fibroblastos, dirigidos por la estructura multicapa. La penetración en dirección longitudinal es de aproximadamente 220 a 320 [µm].

- 45 La velocidad del crecimiento dirigido hacia adentro de células reparativas a lo largo de la estructura multicapa es de aproximadamente 10 a 15 veces mayor en dirección longitudinal en comparación con la dirección transversal ("Fig. 10"). Se puede ver una infiltración inflamatoria mínima, que expresa el proceso regenerativo en curso.

Ejemplo III: Crecimiento celular, regeneración tisular y prevención de adhesiones y fibrosis epidurales después de la implantación de una biomatriz de lámina de colágeno en cirugía espinal

Materiales:

- 5 Fibrillas de colágeno equino nativo (principalmente colágeno de tipo I) producidas a partir de tendón de Aquiles de caballo triturado y purificado y precipitado en fibrillas. La biomatriz flexible y elástica con estabilidad dimensional está especialmente diseñada y tiene una estructura multicapa no porosa y hermética a los fluidos. El espesor de la membrana de lámina de colágeno multicapa equino seco era de aproximadamente 0,1 mm. En el estado húmedo, el espesor de la membrana creció hasta 0,3 mm.

- 10 Anestesia general: Ketavet 60 mg/kg.
Rompun 16 mg/kg s.c.
Tiopental i.v. a través de vena de la oreja, basado en el efecto.
Narcosis, intubación, ventilación mecánica.
Medicación analgésica: 2 x día. Temgesic 0,05 mg/kg s.c. durante 3-4 días después de la operación.
Eutanasia: Sobredosis i.v. de barbiturato en anestesia general.

- 15 Modelo animal:

- 20 Este estudio se llevó a cabo en conejos blancos de Nueva Zelanda ("NZW") con un peso medio de 3 kg en el momento de la cirugía y con una edad media de 4 meses. Todos los conejos eran hembras y la aprobación para los estudios con animales se llevó a cabo después de la aprobación formal por las autoridades de la ciudad de Viena, Austria. El diseño de la cirugía en este modelo animal experimental en conejos era similar a la intervención quirúrgica más común en humanos. Se llevó a cabo una laminectomía y resección de la articulación facetaria en la columna lumbar 4 a 5 (L4/5). Para llevar a cabo una cirugía real en toda su extensión, como una cirugía de fusión intercorporal lumbar posterior (*Posterior Lumbar Interbody Fusion - PLIF*), se extirpó el ligamento flavum. La duramadre encima de la médula espinal permaneció intacta. El área de la laminectomía se cubrió con una biomatriz de lámina de colágeno biológico de la presente invención. El músculo paravertebral se llevó de vuelta a su sitio y la fascia se cerró con suturas absorbibles. La piel se cerró utilizando suturas Synthofil.

Los conejos recibieron medicación analgésica posoperatoria e infusión de fluido durante los tres primeros días y también recibieron alimentos mixtos. Los conejos fueron sacrificados por sobredosis de tiopental y las áreas operadas de la columna se retiraron y evaluaron para evaluación histológica.

- 30 Métodos histológicos:

La columna vertebral se extirpó en bloque y se sumergió en una solución de formalina al 10% para la fijación. Después de la descalcificación, cada vértebra lumbar se cortó en rodajas, se deshidrató y se embutió en parafina. De cada muestra se tomaron siete secciones de 3 [mu]m de espesor.

- 35 Las secciones se tiñeron con hematoxilina-eosina para una tinción histológica general de todas las células y componentes óseos. Las rodajas se examinaron mediante evaluación de las estructuras anatómicas, como la relación entre la duramadre y el área de la lesión quirúrgica dorsal epidural, el crecimiento celular hacia adentro de la biomatriz de lámina de colágeno y la ausencia/presencia y extensión de la formación de adhesiones y la formación de cicatrices fibrosas epidurales.

Resultados/conclusiones histológicas:

- 40 Las secciones se tiñeron con hematoxilina-eosina para una tinción histológica general de todas las células y componentes óseos. Las rodajas se examinaron mediante evaluación de las estructuras anatómicas, como la relación entre la duramadre y el área de la lesión quirúrgica dorsal epidural. También se analizó el crecimiento celular hacia adentro y sobre la biomatriz de lámina de colágeno y la cantidad y calidad de la reacción inflamatoria en la biomatriz y el tejido circundante. Además, se analizó el proceso de integración/incorporación y la ausencia/presencia y extensión de formación de adherencias y la organización de tejido conjuntivo epidural.

El estudio muestra los siguientes resultados histológicos:

- 50 Inmediatamente después de la operación: La biomatriz de lámina de colágeno está dispuesta entre la duramadre y el área del defecto dorsal y forma una capa de separación biológica entre la duramadre y el área de la lesión dorsal. No está fijada al tejido del defecto dorsal. La sangre (eritrocitos) se adhiere en una capa fina a la superficie de la biomatriz de lámina de colágeno y demuestra su función como hemostático. La

estructura multicapa microscópicamente paralela de la biomatriz de lámina de colágeno, que no es porosa y es hermética a la sangre, es claramente visible. El espesor de la biomatriz de lámina de colágeno es de aproximadamente 0,3 mm (Fig. 12).

- 5 Una semana después de la operación: La mayor parte de la membrana está integrada en los tejidos circundantes. Hay infiltración de células sanguíneas, en especial linfocitos (Fig. 13A). El espacio subdural está libre de infiltración celular o tejido de adhesión. Sobre la superficie dorsal, las células están dirigidas a lo largo de la superficie y apenas han penetrado en la superficie de la biomatriz de lámina de colágeno. En los bordes del defecto, la biomatriz de colágeno estaba aplicada sobre el hueso. El área de contacto (a) es un área de bioactividad preferente (interacción biomatriz/célula) y el comienzo de una infiltración celular dirigida a lo largo de la estructura multicapa. El área entre la biomatriz de lámina de colágeno multicapa y la duramadre consiste en tejido suelto que contiene adipocitos (b), comparable al tejido del espacio epidural en áreas en las que la anatomía no había sido afectada por la cirugía (c), tal como muestra la Fig. 13A.

- 15 La Fig. 13A muestra el área de contacto entre la biomatriz de lámina de colágeno multicapa y el hueso en el borde del defecto (a). Interacción intensa de las células y la biomatriz de lámina de colágeno multicapa. El remodelado de la biomatriz de lámina de colágeno multicapa comienza con la infiltración dirigida de células (fibroblastos, granulocitos) en la estructura multicapa paralela de la biomatriz de lámina de colágeno multicapa.

La Fig. 13B muestra el área de contacto entre la biomatriz de lámina de colágeno multicapa y el hueso en el borde del defecto (a).

- 20 La Fig. 13C muestra la biomatriz de lámina de colágeno multicapa en el centro del defecto de laminectomía. La biomatriz de colágeno está integrada y separa el espacio epidural ventral de la formación de cicatriz dorsal. Las células están dirigidas a lo largo de la superficie dorsal y no han penetrado en la superficie de la biomatriz de colágeno. El área entre la biomatriz de colágeno y la duramadre consiste en tejido suelto que contiene adipocitos (a).

- 25 La Fig. 13D muestra un conejo NZW 1 semana después de la operación. La biomatriz de lámina de colágeno multicapa está cerrando el defecto de laminectomía y separando la duramadre de la formación incipiente de una cicatriz dorsal rica en células. Las células no han penetrado en la superficie de la biomatriz de colágeno. En el borde de la biomatriz de colágeno se ve el comienzo de una infiltración dirigida de células reparativas en la estructura multicapa (a).

- 30 La Fig. 13E muestra un conejo NZW 1 semana después de la operación. Para cubrir el defecto de laminectomía se ha utilizado una esponja de colágeno (DURAGEN). A diferencia de la presente invención, no hay ninguna capa de separación no porosa clara entre el espacio epidural y el área de lesión dorsal. La esponja de colágeno está empapada de sangre.

- 35 Dos semanas después de la operación: La integración de la membrana en el tejido circundante ha mejorado debido al crecimiento hacia adentro de estructuras capilares. La cantidad de linfocitos y granulocitos segmentados ha aumentado. La estructura de la biomatriz de lámina de colágeno se puede distinguir el tejido circundante. Encima de la membrana hay una reacción inflamatoria con exudación de linfocitos y granulocitos. El espacio subdural está libre de infiltración celular o tejido de adhesión.

- 40 Las Fig. 14 A-C muestran un conejo dos semanas después de la operación. La biomatriz de lámina de colágeno multicapa está totalmente integrada. Las células reparativas tisulares se han infiltrado en la biomatriz de colágeno y están dirigidas a lo largo de la estructura multicapa. La duramadre está separada por tejido suelto con adipocitos procedentes de la formación de cicatriz y la biomatriz de colágeno remodelada.

Conclusiones:

- 45 El colágeno para su uso en la presente invención ha demostrado desarrollar una función de separación y protección inmediata y excelente entre la duramadre y el defecto quirúrgico dorsal, evitando la distribución incontrolada de sangre, fibrina y materiales necróticos en el área epidural y dirigiendo y separando el crecimiento celular de la cicatriz incipiente encima de la superficie dorsal. La lámina de colágeno biofuncional también dirige el crecimiento celular hacia adentro de su estructura multicapa. La velocidad del crecimiento hacia adentro a lo largo de la estructura multicapa es mayor que la del crecimiento de células hacia adentro de la biomatriz desde la superficie dorsal. Durante la primera semana no hay ningún crecimiento de células hacia adentro de la superficie ventral de la biomatriz de lámina de colágeno. Las diferentes velocidades de crecimiento celular hacia adentro a lo largo y a través de la estructura multicapa se corresponde con una observación clínica después de la implantación epidural de la biomatriz de lámina de colágeno multicapa una semana después de la operación (Ejemplo II).

Después de dos semanas, la biomatriz multicapa está infiltrada por células reparativas. Existe una integración completa de la biomatriz en la formación de cicatriz fisiológica del área de la lesión quirúrgica dorsal. La duramadre está separada por un tejido graso suelto que parece similar al tejido graso que separa fisiológicamente la duramadre del canal espinal. Existe una alta bioactividad de células reparativas dirigidas a lo largo de la estructura multicapa, que va desapareciendo gradualmente, de la biomatriz rica en células. La biomatriz está remodelada e integrada en la estructura anatómica normal.

El colágeno para su uso en la presente invención ha demostrado ser una capa de protección y separación inmediata, biocompatible y biofuncional eficaz entre la duramadre y el área de defecto dorsal, que dirige el crecimiento celular hacia adentro de la estructura multicapa y el crecimiento celular encima de su superficie dorsal. Mediante la dirección del crecimiento celular, la biomatriz de lámina de colágeno controla eficazmente el proceso de remodelado y regeneración tisular y proporciona unas condiciones óptimas para la prevención y minimización de adhesiones clínicamente relevantes.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Colágeno para su uso para la prevención de la formación de fibrosis epidural después de cirugía espinal en un mamífero, estando presente el colágeno en forma de una biomatriz de lámina de colágeno multicapa a escala microscópica, hermética a los fluidos y no porosa, dirigiendo la biomatriz el crecimiento de células en los intersticios entre las capas de colágeno, y seleccionándose el colágeno entre el grupo consistente en colágeno bovino, porcino, equino o humano y mezclas de los mismos.
- 10 2. Colágeno para su uso según la reivindicación 1, caracterizado porque la biomatriz de lámina de colágeno multicapa dirige el crecimiento celular entre los intersticios de las capas y sobre la superficie de la biomatriz de lámina de colágeno multicapa.
3. Colágeno para su uso según la reivindicación 1, caracterizado porque la biomatriz de lámina de colágeno multicapa crea una capa primaria de sellado y separación hermética a los líquidos.
4. Colágeno para su uso según la reivindicación 3, caracterizado porque la biomatriz de lámina de colágeno multicapa es lisa y esencialmente no porosa.
- 15 5. Colágeno para su uso según la reivindicación 3, caracterizado porque la biomatriz de lámina de colágeno multicapa es lisa y no porosa.
6. Colágeno para su uso según la reivindicación 1, caracterizado porque la biomatriz de lámina de colágeno multicapa se reabsorbe y remodela en tejidos naturales.
- 20 7. Colágeno para su uso según la reivindicación 6, caracterizado porque la biomatriz de lámina de colágeno multicapa se reabsorbe y remodela en tejidos naturales en 14 días.
8. Colágeno para su uso según la reivindicación 1, caracterizado porque la lámina de colágeno se deriva de colágeno equino.
- 25 9. Colágeno para su uso según la reivindicación 1, caracterizado porque se evita la formación de fibrosis posoperatoria o postraumática sobre la superficie de un tejido seleccionado entre el grupo consistente en tejido de columna vertebral, duramadre y nervios raquídeos en un mamífero.

FIG. 1

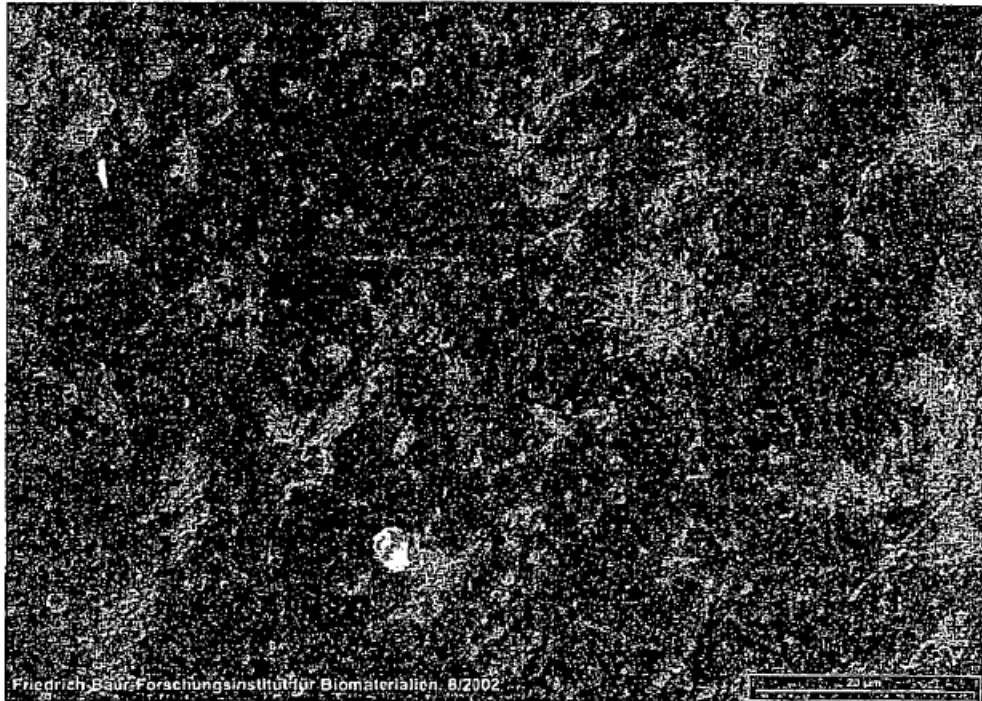


FIG. 2A

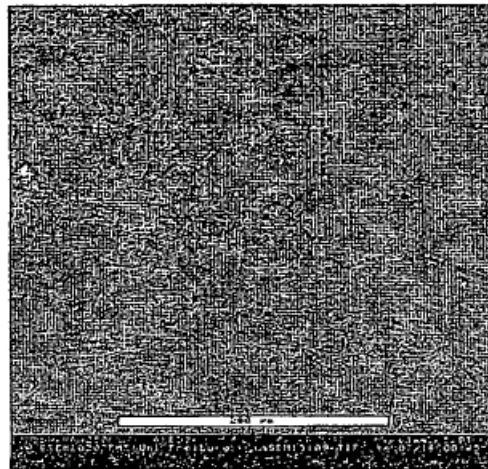


FIG. 2B

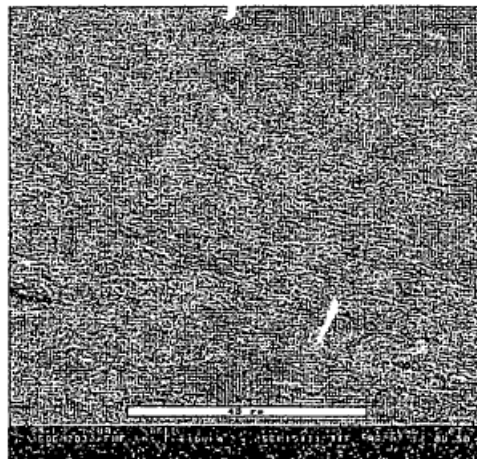


FIG. 3A

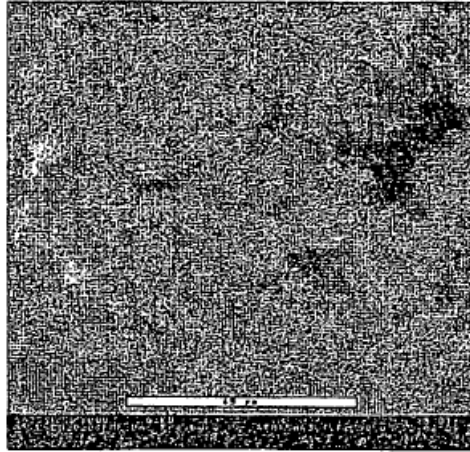


FIG. 3B

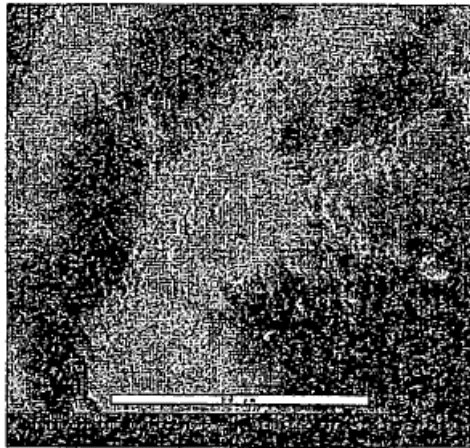


FIG. 4



FIG. 5A

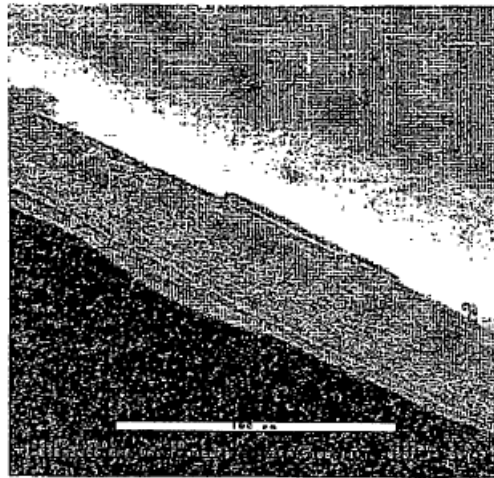


FIG. 5B

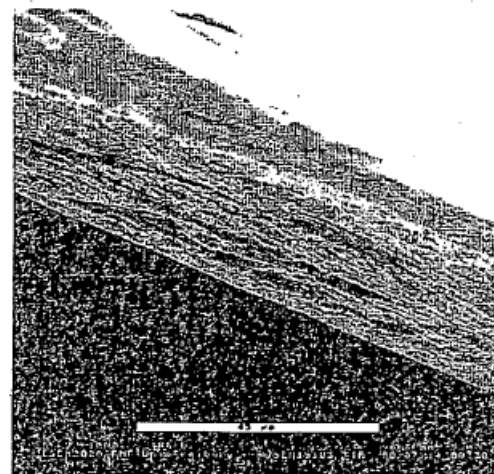


FIG. 5C

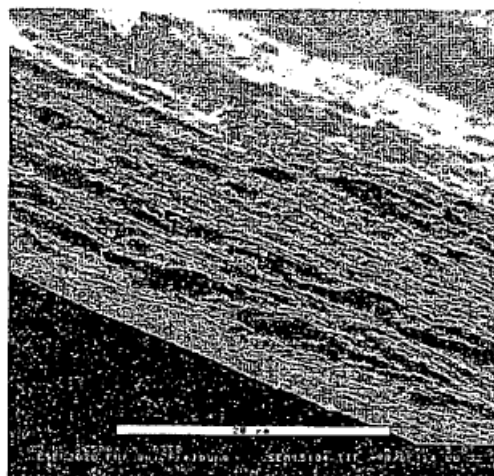


FIG. 6A

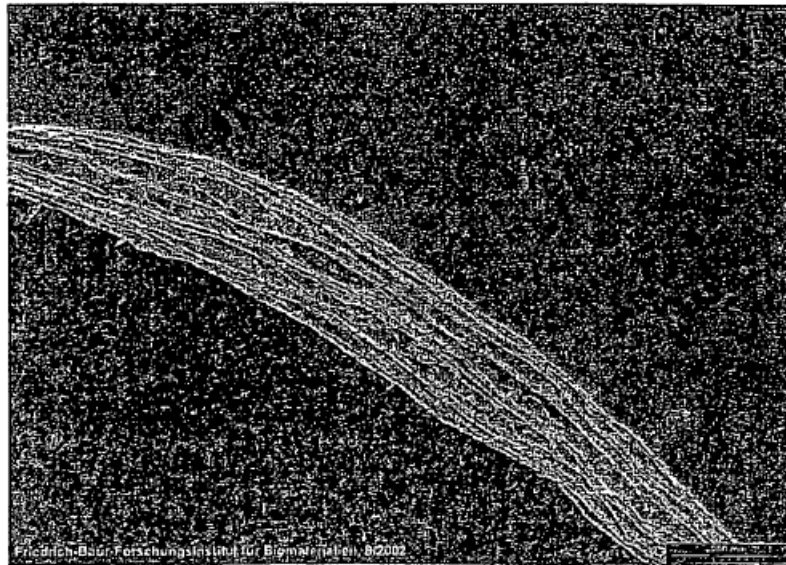
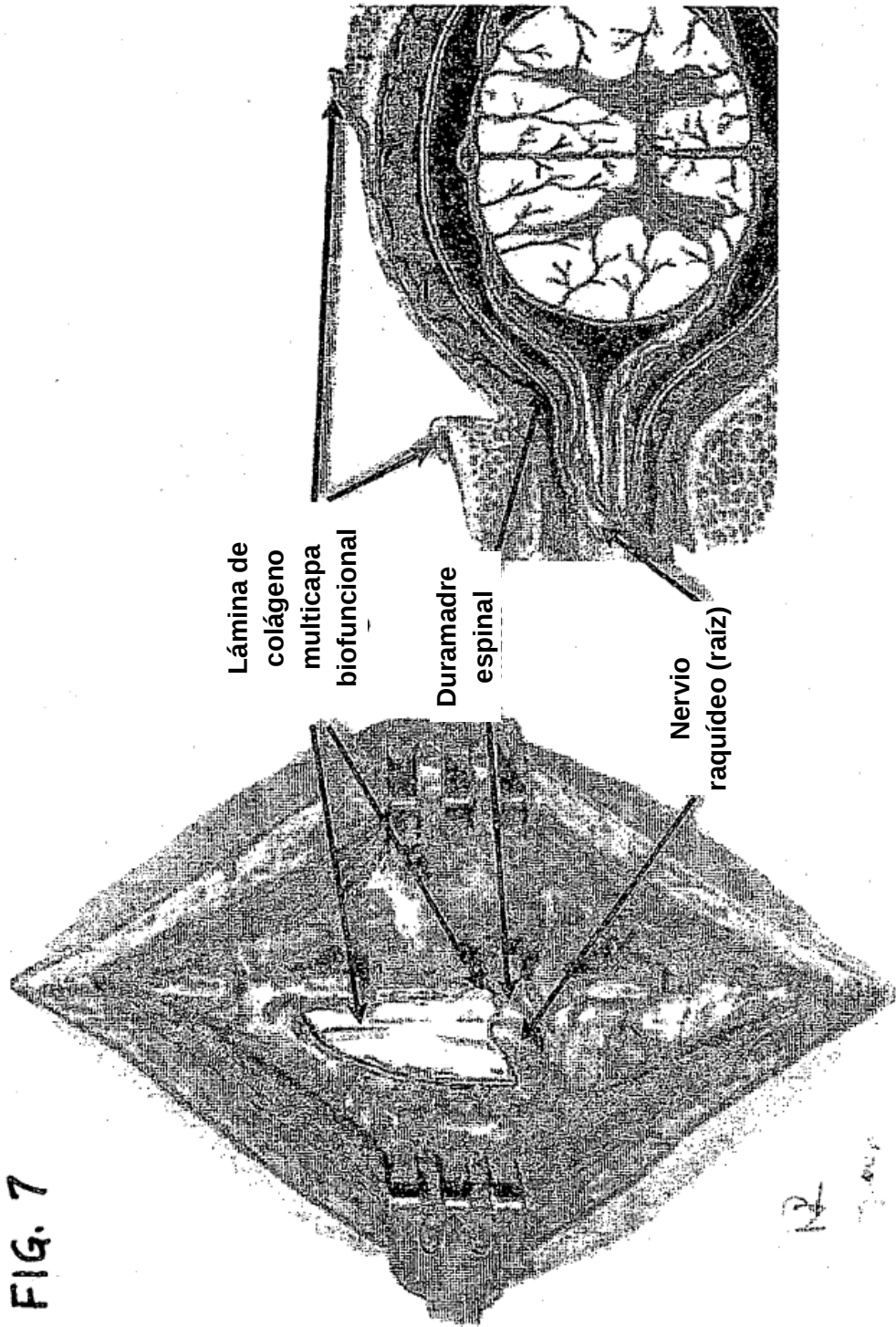


FIG. 6B



Hemilaminectomía lumbar izquierda (procedimiento espinal)

FIG. 7



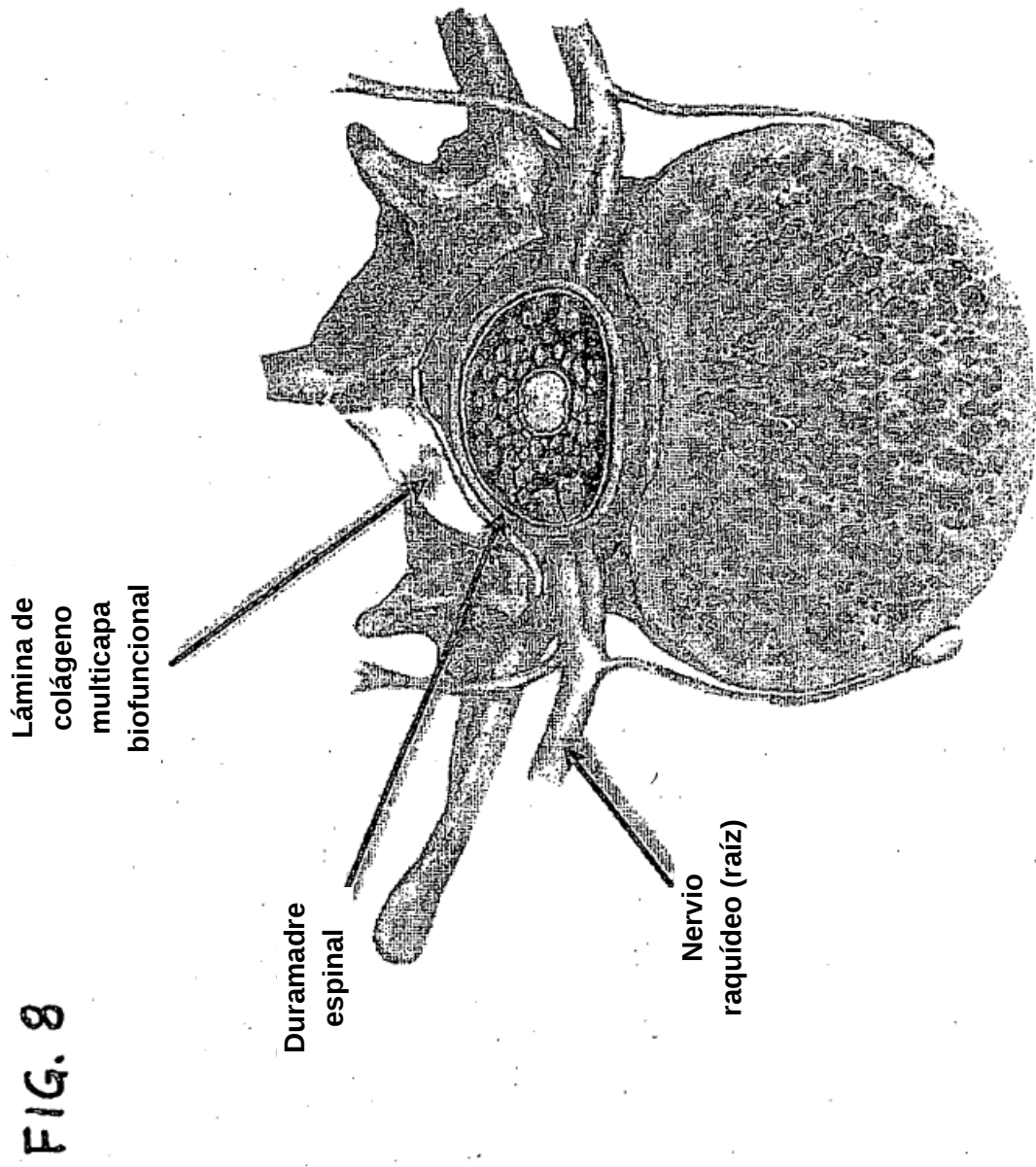
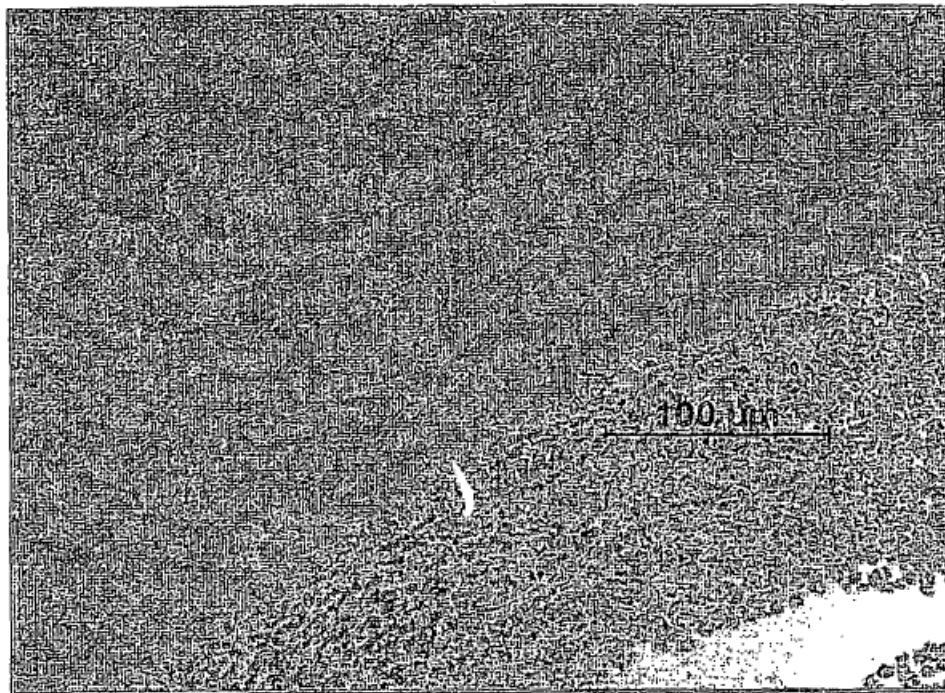
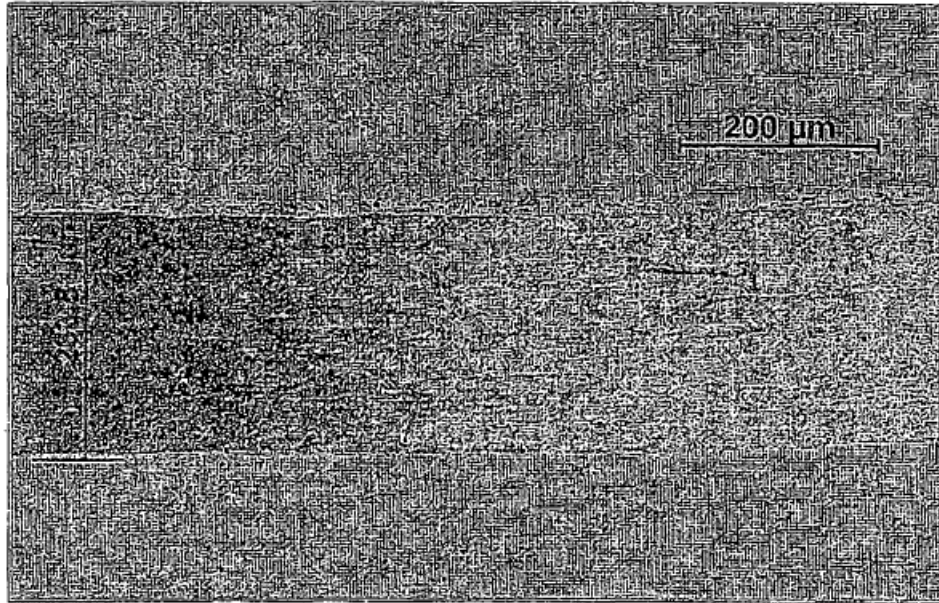


FIG. 9



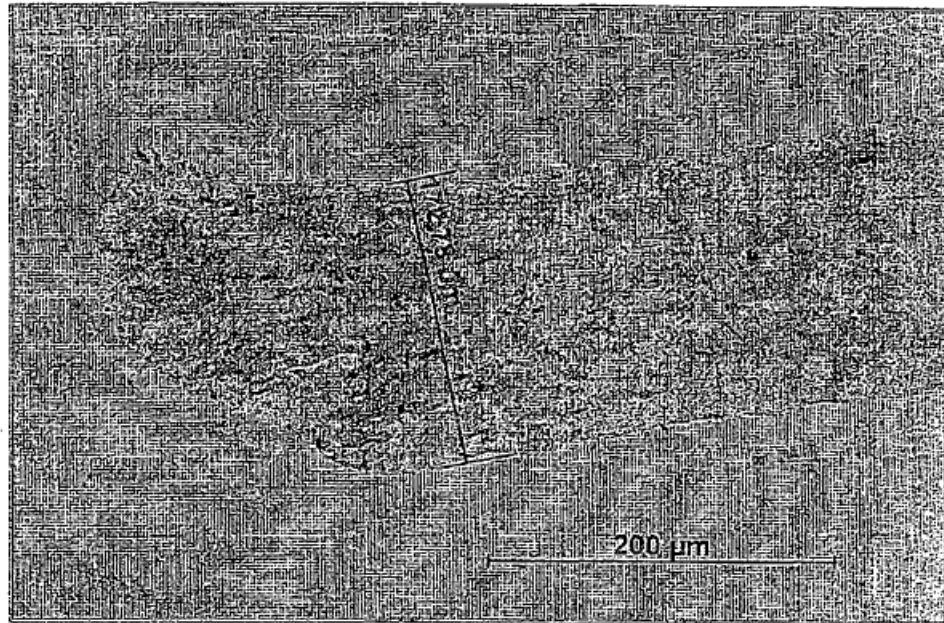
© Rainer Mittermayr, LBI Vienna (2006-05-23)

FIG. 10



© Rainer Mittermayr, LBI Vienna (2006-05-23)

FIG. 11



© Rainer Mittermayr, LBI Vienna (2006-05-23)

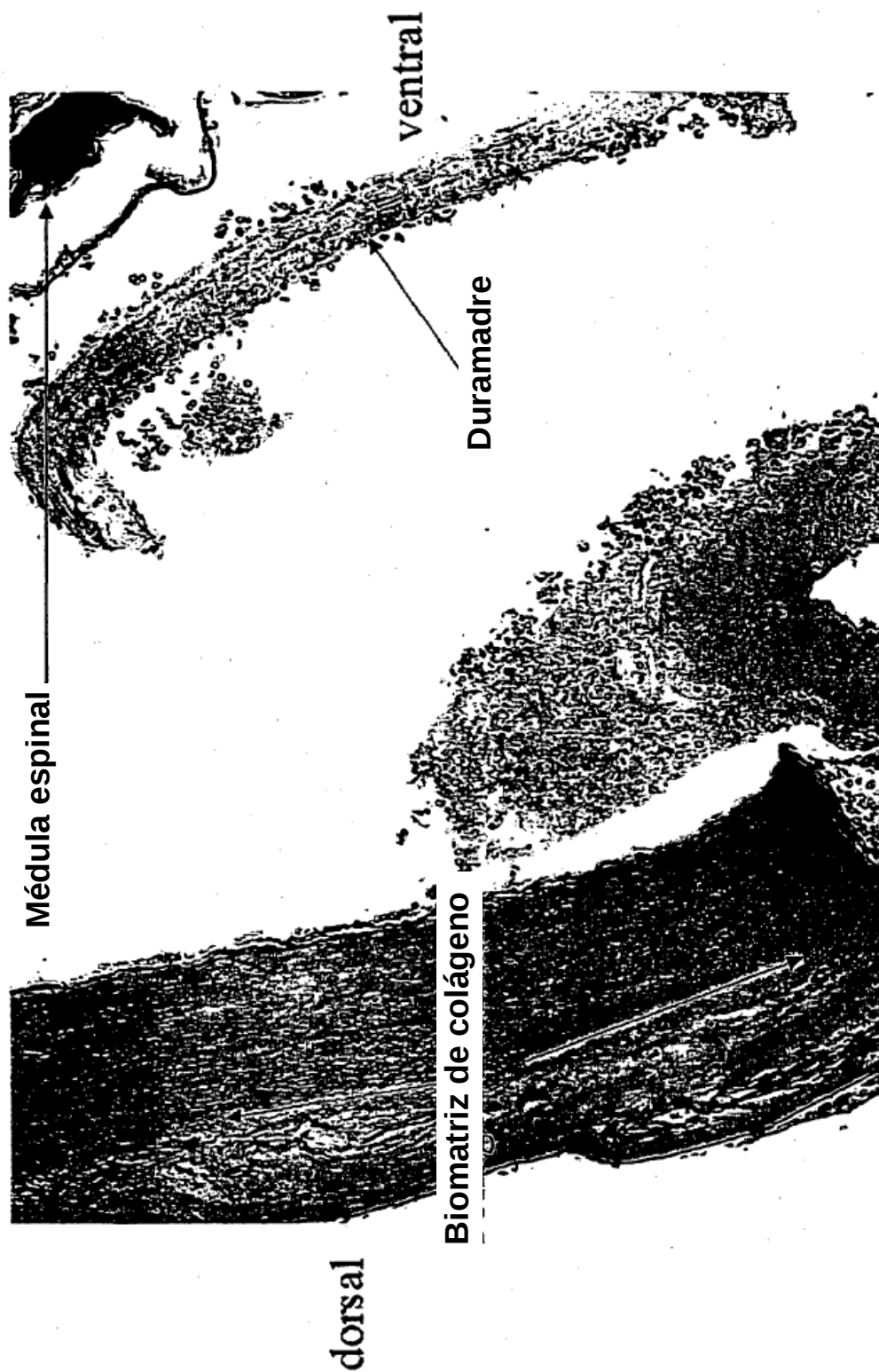


FIG. 12

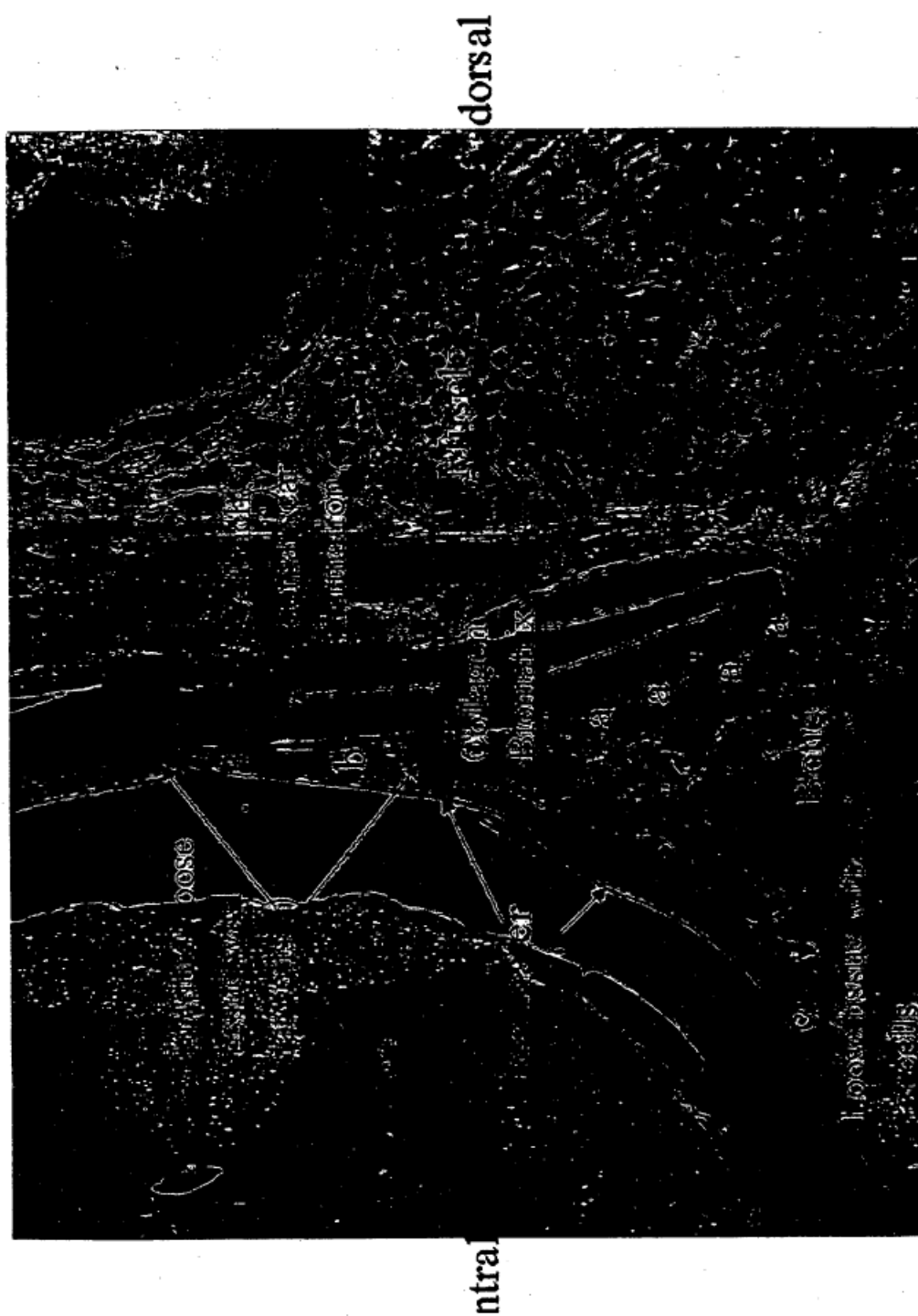


FIG. 13A

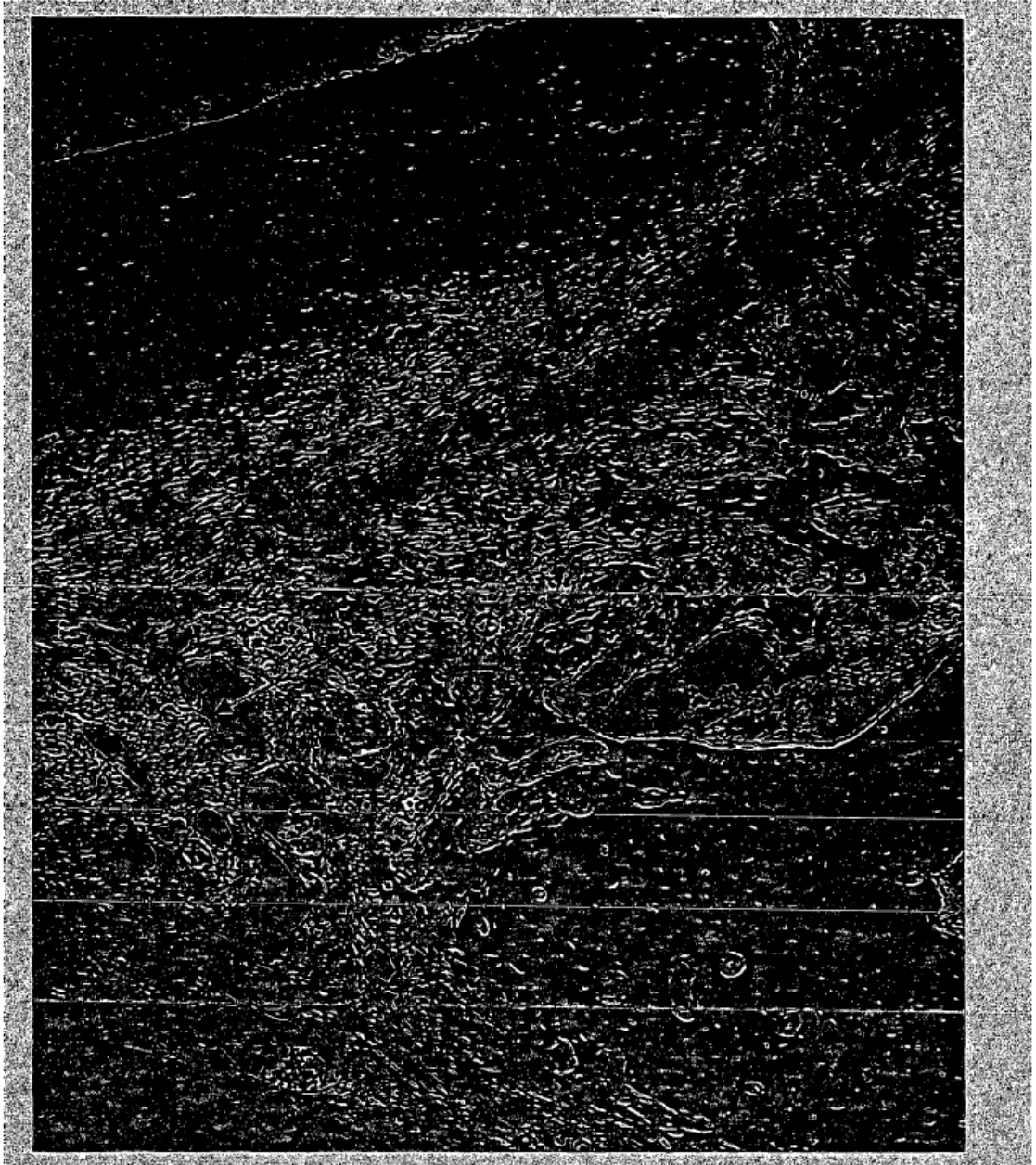


Fig. 13B

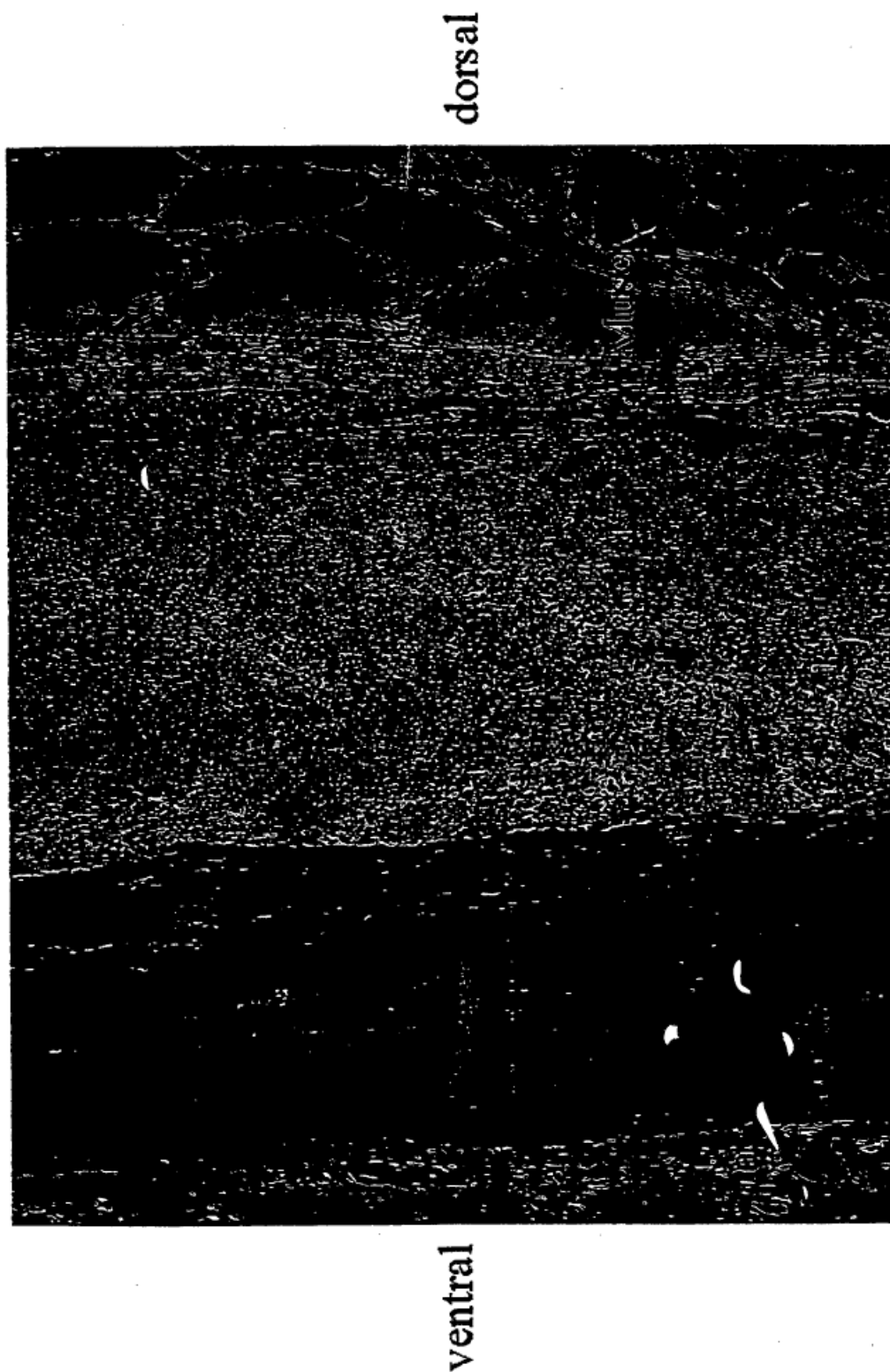


FIG. 13C

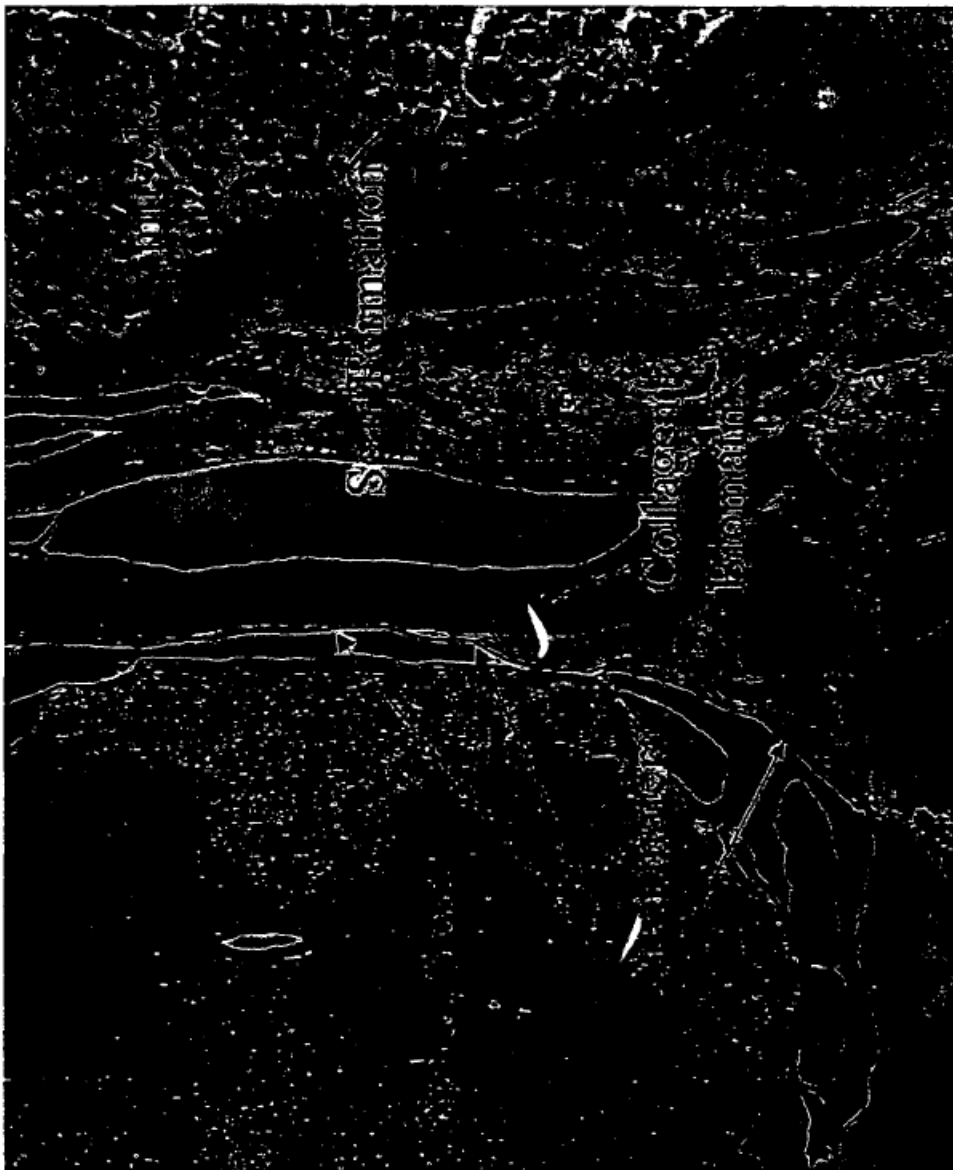


FIG. 13D



FIG. 13E

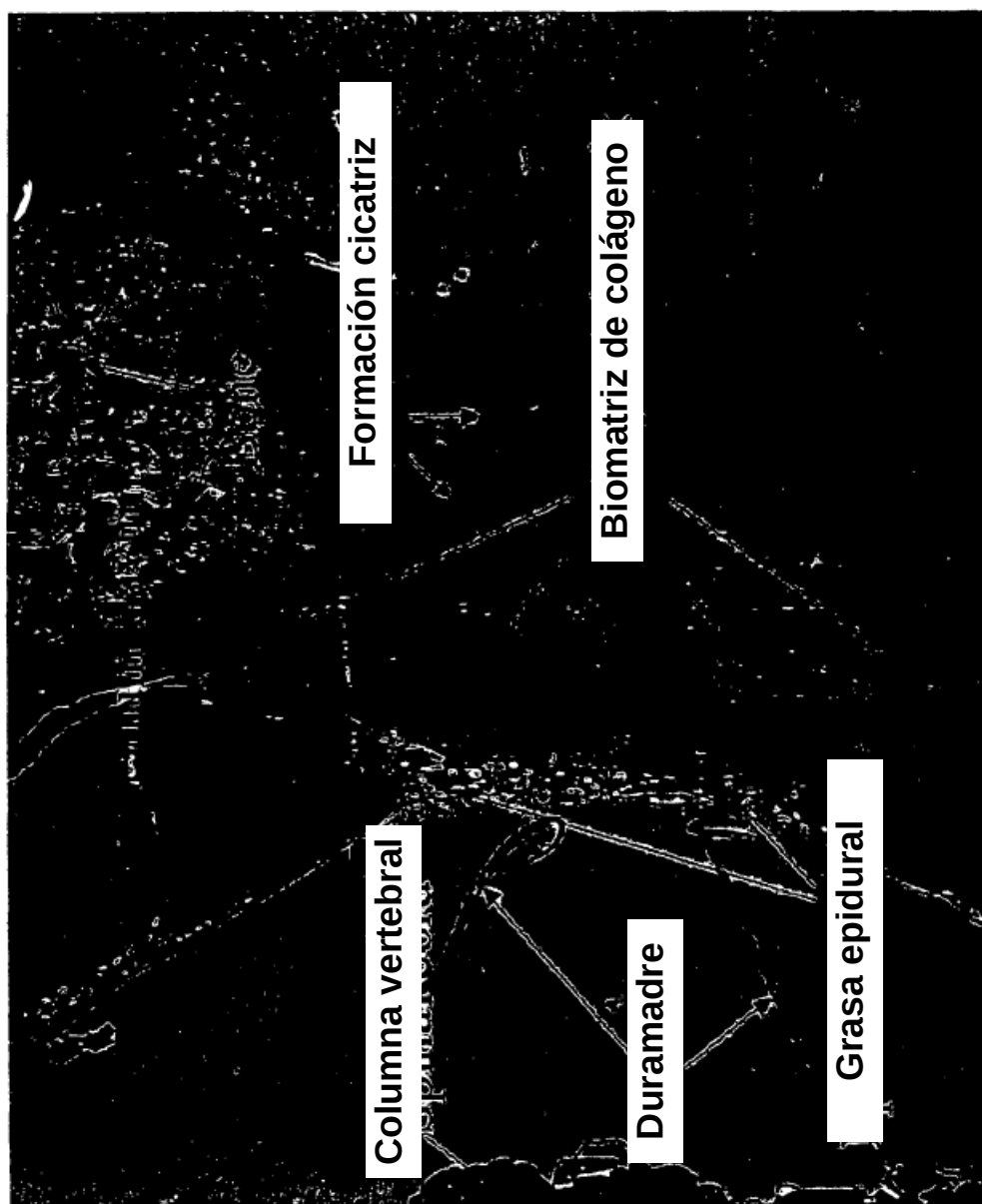


FIG. 14A

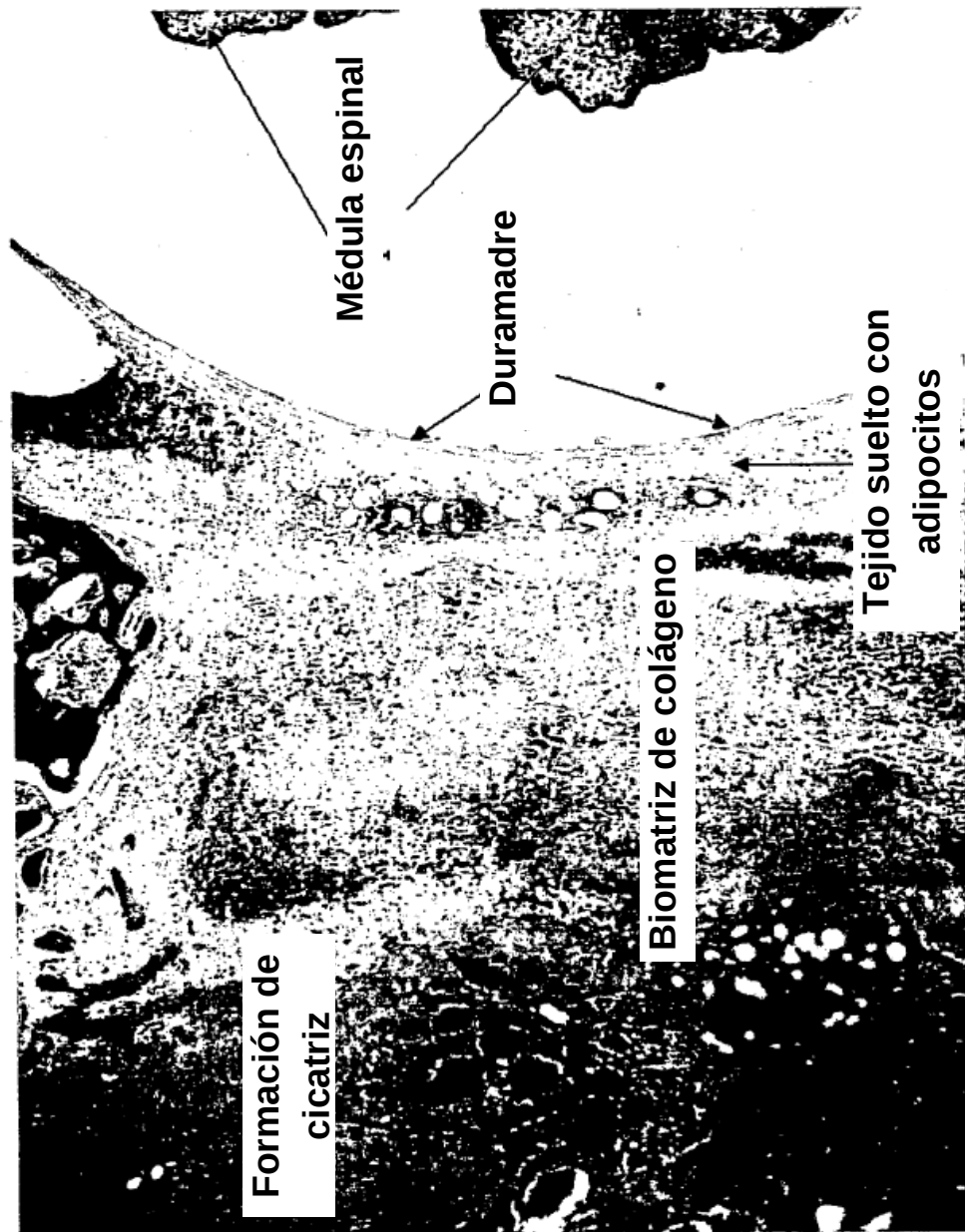


FIG. 14B



FIG. 14C