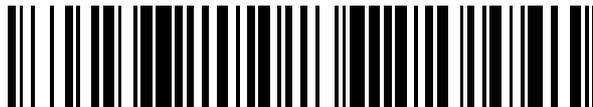


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 625 615**

51 Int. Cl.:

**A61L 31/04** (2006.01)

**A61L 31/14** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.10.2005 PCT/US2005/038331**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.05.2006 WO06047496**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.10.2005 E 05818054 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.02.2017 EP 1802253**

54 Título: **Membranas biopoliméricas**

30 Prioridad:

**22.10.2004 US 971435**

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

**20.07.2017**

73 Titular/es:

**COLLAGEN MATRIX, INC. (100.0%)  
15 Thornton Road  
Oakland, NJ 07436, US**

72 Inventor/es:

**LI, SHU-TUNG;  
YUEN, DEBBIE y  
HANSEN, PEGGY**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**Observaciones :**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 625 615 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

Membranas biopoliméricas

**Antecedentes de la invención**

5 Las membranas biopoliméricas pueden utilizarse en la reparación de tejidos blandos. Véase, por ejemplo, Shu-Tung Li, *Biologic Biomaterials: Tissue-Derived Biomaterials (Collagen)*. En: *Biomedical Engineering Handbook*, Ed. J. D. Bronzino, de 42-1 a 42-23, CRC Press, Inc. Boca Raton, Fla., 2000. El documento US2004/001877 describe una membrana laminar adaptada para la reparación de un tejido meníngeo dañado que comprende una capa de fibras biopoliméricas orientadas y reticuladas. La resistencia mecánica es una consideración importante en el diseño de tales membranas ya que existe la necesidad de fijarlas firmemente a los sitios objetivo.

10 **Sumario**

Esta invención se basa en un descubrimiento inesperado de que las membranas biopoliméricas que contienen fibras largas no orientadas tienen una alta resistencia a la tracción y una alta resistencia a la retención de la sutura en todas las direcciones.

15 En un aspecto, esta invención presenta una membrana laminar para reparar un tejido dañado. La membrana laminar incluye una capa isotrópica de fibras biopoliméricas reticuladas basadas en colágeno en las que las fibras tienen una longitud de 10 a 1.000 cm (por ejemplo, de 30 a 800 cm o de 50 a 500 cm). La longitud se refiere al promedio de las longitudes de fibra medidas antes de que las fibras estén reticuladas y tenga una desviación estándar de  $\pm 20\%$ .

20 Se describen otras fibras biopoliméricas basadas en una diversidad de biopolímeros, tales como polipéptidos (por ejemplo, colágeno de tipo I a tipo XXV, elastina y fibrina), polisacáridos (por ejemplo, quitosano, ácido algínico, celulosa y glicosaminoglicano) y una combinación de dos o más biopolímeros diferentes. Los biopolímeros se pueden obtener a partir de fuentes naturales o se preparan mediante técnicas de ingeniería genética. La expresión "capa isotrópica" se refiere a una capa que presenta propiedades con propiedades mecánicas similares cuando se mide a lo largo de ejes de todas las direcciones. La capa isotrópica puede tener un espesor de 0,05 a 1,5 mm (por ejemplo, de 0,2 a 0,8 mm), una densidad de 0,1 a 1,2 g/cm<sup>3</sup> (por ejemplo, de 0,2 a 1,0 g/cm<sup>3</sup>), una temperatura de transición hidrotérmica de 45 a 80°C (por ejemplo, de 50 a 70°C), una resistencia a la retención de la sutura de 0,1 a 5 kg (por ejemplo, de 0,2 a 2 kg) y una resistencia a la tracción de 20 a 250 kg/cm<sup>2</sup> (por ejemplo, de 40 a 100 kg/cm<sup>2</sup>). Preferiblemente, es permeable a moléculas que tienen pesos moleculares de 50 a 100.000 daltons (por ejemplo, de 100 a 70.000 daltons). Los parámetros anteriores pueden medirse fácilmente por métodos bien conocidos en la técnica, algunos de los cuales se describen con mayor detalle a continuación. Si se desea, se puede 30 incluir en la capa isotrópica un agente bioactivo, tal como factores de crecimiento, agentes antimicrobianos, agentes anticoagulantes y agentes antiadhesivos.

35 En otro aspecto, esta invención presenta un método para fabricar una capa isotrópica de fibras biopoliméricas reticuladas. El método incluye 4 etapas: (1) coacervar fibras biopoliméricas (por ejemplo, fibras basadas en colágeno) que tienen longitudes de menos de 1 cm dispersadas en una solución acuosa para obtener fibras biopoliméricas coacervadas que tienen longitudes de 10 a 1.000 cm, (2) aplanar las fibras biopoliméricas coacervadas en una capa, (3) secar la capa, y (4) reticular las fibras biopoliméricas. La coacervación puede conseguirse ajustando el pH de la dispersión al punto isoeléctrico del biopolímero. Como resultado, el biopolímero se precipita de la dispersión y forma fibras largas (por ejemplo, que tienen longitudes de 10 a 1.000 cm). Preferentemente, las fibras coacervadas se deshidratan parcialmente para alcanzar un contenido en sólidos del 5 al 25% en peso antes del paso (2). 40

También dentro del alcance de esta invención está una capa isotrópica de fibras biopolímeras reticuladas preparadas por el método mencionado anteriormente.

Los detalles de una o más realizaciones de la invención se exponen en la siguiente descripción adjunta. Otras características, objetos y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la descripción y de las reivindicaciones.

45 **Descripción detallada**

Esta invención se refiere a una membrana laminar que contiene una capa isotrópica de fibras biopoliméricas reticuladas largas basadas en colágeno. A continuación se muestra un ejemplo de preparación de una membrana laminar de este tipo del colágeno tipo I:

50 En primer lugar, las fibras de colágeno tipo I se purifican a partir de una fuente natural (por ejemplo, piel, hueso, tendón o ligamento de un mamífero) por métodos bien conocidos en la técnica (por ejemplo, los descritos en la Patente de Estados Unidos N° 5.206.028 y en Oneson, et al., *J. Am. Leather Chemists Assoc.* 65: 440 - 450, 1970).

A continuación, se prepara una dispersión de colágeno mezclando fibras de colágeno de tipo I purificadas en una solución acuosa ácida o básica en la que las fibras no se reticularan entre sí. Por ejemplo, se pueden dispersar fibras de colágeno en una solución acuosa ácida que contiene un ácido orgánico (por ejemplo, ácido acético o ácido

láctico) o un ácido inorgánico (por ejemplo, ácido clorhídrico o ácido sulfúrico). El contenido en sólidos de las fibras de colágeno en la dispersión está comprendido preferiblemente entre 0,5% en peso y 15% en peso. Alternativamente, se pueden dispersar fibras de colágeno en una solución acuosa básica que contiene una base tal como hidróxido de sodio, hidróxido de potasio o hidróxido de calcio. Los métodos para preparar una dispersión de colágeno son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N° 5.206.028. Típicamente, el colágeno se homogeneiza primero en una solución ácida o básica por un medio adecuado, tal como el uso de un mezclador. La dispersión de colágeno así obtenida se filtra a continuación para eliminar cualquier material residual no colagenoso, tal como haciendo pasar la dispersión a través de un filtro de malla de acero inoxidable de un tamaño de malla adecuado. Las fibras en la dispersión filtrada tienen generalmente menos de 1 cm de longitud.

Las fibras de colágeno en la dispersión filtrada se coacervan entonces para obtener fibras largas de ciertas longitudes (por ejemplo, de 10 a 1.000 cm). Esto se puede conseguir ajustando el pH de la dispersión al punto isoeléctrico del colágeno (por ejemplo, pH de aproximadamente 5). Se puede usar tanto una base como un ácido como agente coacervante, dependiendo de si las fibras de colágeno están dispersadas en una solución ácida o alcalina. También pueden usarse otros agentes coacervantes (por ejemplo, sales neutras o disolventes no acuosos). Las longitudes de las fibras coacervadas en su conformación extendida se miden para asegurar que se obtienen fibras de longitudes deseadas. Típicamente, las fibras coacervadas se colocan sobre una superficie con un fondo oscuro y sus longitudes se miden con una regla. Si no se obtienen las longitudes deseadas, se puede aplicar vacío a las fibras coacervadas para eliminar las burbujas de aire atrapadas que interfieren con la alineación de las fibras. La eliminación de las burbujas de aire atrapadas alarga las fibras mejorando la adhesión entre las fibras adyacentes. Este proceso puede repetirse hasta que las longitudes de las fibras estén dentro del intervalo de 10-1.000 cm. Las longitudes deseadas también se pueden obtener ajustando la cantidad total de la dispersión usada en el proceso de coacervación.

Las fibras de colágeno coacervadas se recogen sustancialmente de la solución, por ejemplo, usando un tamiz de malla. Preferentemente, las fibras se deshidratan parcialmente por goteo o por compresión en un soporte de malla de acero inoxidable para alcanzar un contenido de colágeno sólido en el intervalo de 5% a 25% en peso. Las fibras así obtenidas están orientadas al azar y poseen propiedades parecidas a la masa. Se pueden aplanar convenientemente con un rodillo en una membrana laminar que contiene una capa isotrópica de fibras de colágeno. Mientras que algunas fibras de colágeno en la membrana laminar están en una conformación más extendida, la mayoría están en una conformación enrollada o doblada.

La membrana laminar así obtenida se seca entonces. El secado puede llevarse a cabo mediante secado al aire o liofilización, dependiendo de la permeabilidad deseada de la membrana. En general, el secado al aire produce una membrana que permite la permeación de moléculas que tienen pesos moleculares que varían de 50 a 30.000 (por ejemplo, iones y péptidos pequeños) y la liofilización produce una membrana que permite la permeación de moléculas que tienen pesos moleculares que varían de 1.000 a 100.000 (por ejemplo, diversos factores de crecimiento y macromoléculas bioactivas). La permeabilidad de una membrana laminar se puede ajustar adicionalmente controlando el grado de deshidratación parcial mencionado anteriormente. Los métodos para determinar la permeabilidad de una membrana laminar son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Li, y col., *Clinical Materials*, 9: 195 - 200, 1992.

Obsérvese que la permeabilidad de una membrana laminar es mucho menor que la permeabilidad de una estructura porosa de tipo esponja. Generalmente, para una esponja de colágeno que tiene una densidad en el intervalo de 0,005 a 0,02 g/cm<sup>3</sup> (tal como DuraGen y Helistat comercializados por Integra LifeSciences, Plainsboro, NJ), la mayoría de los poros en la esponja tienen diámetros que van desde 50 a 250 μm. Como resultado, una esponja de colágeno permite la permeación de las células. Véase Doillon, et al. *J. Biomed. Materials Res.* 20: 1219 - 1228, 1986. Debido a su estructura porosa, una esponja de colágeno facilita el crecimiento celular. Una esponja de colágeno contiene típicamente poros esféricos, y su tamaño de poro (que corresponde a la permeabilidad) se puede determinar por microscopía electrónica de barrido (SEM).

Una membrana de lámina de colágeno de esta invención no tiene estructuras porosas esféricas. Típicamente, tiene una estructura estratificada y multicapa de alta densidad (por ejemplo, de 0,1 a 1,2 g/cm<sup>3</sup>), y puede producirse por compresión mecánica (por ejemplo, aplanamiento) como se ha descrito anteriormente. A medida que los espacios entre las fibras de colágeno se derrumban durante la compresión, una membrana laminar de colágeno puede contener morfología superficial de defectos tipo poro (por ejemplo, una profundidad poco profunda), huecos entre capas o hendiduras, no estructuras porosas contenidas en una esponja de colágeno. Dada su estructura laminada, se puede usar una membrana laminar como tamiz molecular o como una barrera celular (por ejemplo, las descritas en las patentes de EE.UU. N° 5.206.028 y 6.391.333). Como ejemplo, la patente 4.963.146 describe una membrana tubular multicapa laminada preparada por compresión mecánica de fibras de colágeno orientadas hidratadas y coacervadas. La membrana es sólo permeable a macromoléculas del tamaño de la albúmina de suero bovino (que tiene un peso molecular de aproximadamente 67.000 daltons), pero no es permeable a macromoléculas del tamaño de β-galactosidasa (que tiene un peso molecular de aproximadamente 5,4 x 10<sup>5</sup> daltons). También describe que la permeabilidad de la membrana se correlaciona con el radio de Stokes de la macromolécula en un medio acuoso (por ejemplo, 0,007 μm para la albúmina de suero bovino y 0,02 μm para la β-galactosidasa). Por lo tanto, la permeabilidad de una membrana laminar (por ejemplo, permeable a biomoléculas mayores de 0,02 μm) puede ser mucho menor que la de una esponja (por ejemplo, permeable a células de aproximadamente 50 μm). Dada su baja

- 5 permeabilidad, se puede usar una membrana laminar para intercambiar nutrientes, al tiempo que se excluyen las células al mismo tiempo. La permeabilidad de una membrana laminar se puede determinar usando moléculas de sonda, es decir, macromoléculas que tienen diversos tamaños moleculares. Véase, por ejemplo, Li, y col., *Clinical Materials*, 9: 195 - 200, 1992. Como una membrana laminar no contiene poros esféricos, su permeabilidad no puede determinarse midiendo el tamaño de poro usando SEM.
- 10 La membrana laminar seca citada anteriormente se somete luego a reacción con un agente de reticulación adecuado (por ejemplo, un compuesto de aldehído). Puede reticularse en una solución que contiene un agente reticulante, controlándose la extensión de reticulación la concentración del agente reticulante, la temperatura y el pH de la solución, y el tiempo de reacción. Alternativamente, la membrana seca puede ser reticulada en un vapor generado a partir de una solución que contiene un agente de reticulación, controlándose la extensión de la reticulación por la presión de vapor, la temperatura de la solución y el tiempo de reacción. Los métodos para determinar el grado de reticulación son bien conocidos en la técnica, por ejemplo, monitorizando la temperatura de transición hidrotérmica o determinando el número de puntos de reticulación intermoleculares. Véase Yuen y col., *Trans. Soc. Biomaterials*, 1288, 2000 y Wiederhom, et al., *J. Polymer Sci.*, 9: 315, 1952.
- 15 El grado de reticulación determina la estabilidad in vivo de una membrana laminar. Por ejemplo, las fibras de colágeno con una temperatura de transición hidrotérmica de 50°C a 55°C y de 55°C a 60°C pueden tener un tiempo de resorción completo in vivo de 8 a 16 semanas y de 12 a 36 semanas, respectivamente. Véase Yuen y col., *Trans Soc. Biomaterials*, 1288, 2000. Para la estabilidad in vivo superior a 6 meses, la temperatura de transición hidrotérmica debe adaptarse al intervalo de 55°C a 75°C.
- 20 La membrana reticulada así obtenida puede lavarse extensivamente con agua destilada para eliminar cualquier aldehído residual, haciendo de este modo la membrana no citotóxica. La membrana enjuagada puede ser entonces liofilizada para producir una membrana de lámina blanca. Se prefiere el color blanco, ya que facilita la colocación precisa de una membrana laminar sobre un sitio de reparación. La liofilización se puede llevar a cabo a, o por debajo, de -40°C, si la membrana se seca al aire antes de la reticulación. Como la depresión del punto de congelación del agua ligada a proteínas es más pronunciada en una membrana reticulada secada al aire (es decir, un material de alta densidad), el agua absorbida en la membrana reticulada puede no congelarse completamente a una temperatura por encima de -40°C durante los ciclos de liofilización. Por lo tanto, la liofilización de una membrana secada al aire reticulada a una temperatura superior (por ejemplo, -10°C) puede producir membranas con parches transparentes similares a los producidos por secado al aire.
- 25 La estabilidad in vivo de una membrana laminar también depende de los tipos de agentes reticulantes. Generalmente, el glutaraldehído forma membranas más estables que el formaldehído o la carbodiimida. Por lo tanto, el glutaraldehído se ha utilizado para reticular las válvulas cardíacas del tejido que requieren alta estabilidad in vivo, mientras que el formaldehído se ha usado a menudo para reticular implantes reabsorbibles cuya estabilidad in vivo es menos crítica.
- 30 Si se desea, una membrana laminar puede incluir uno o más agentes bioactivos. Por ejemplo, un agente bioactivo puede disolverse o dispersarse en una dispersión de colágeno usada para preparar la membrana laminar. Como otro ejemplo, las moléculas bioactivas pueden estar unidas covalentemente a la superficie de fibras de colágeno en una membrana laminar. Específicamente, una molécula bioactiva que contiene un grupo reactivo puede enlazarse mediante un agente de acoplamiento a un grupo funcional en las cadenas laterales de colágeno. Ejemplos de tal agente de acoplamiento adecuado incluyen compuestos de aldehído o carbodiimida. Ejemplos de tal grupo funcional incluyen los grupos amino de cadena lateral en lisinas e hidroxilinas, los grupos carboxilo de cadena lateral en ácidos aspártico y glutámico, y los grupos hidroxilo de cadena lateral en hidroxiprolina, serinas y treoninas. Véase, por ejemplo, Lundblad R., *Techniques in protein modification*, CRC Press, Boca Raton, 1995. Además, se pueden usar moléculas separadoras para formar enlaces entre los grupos funcionales de las cadenas laterales de colágeno y los grupos reactivos sobre las moléculas bioactivas, de manera que confieren más flexibilidad en dichas moléculas bioactivas sobre la superficie de la membrana.
- 35 Una membrana laminar de esta invención contiene una capa isotrópica de fibras biopoliméricas reticuladas largas. Como resultado, proporciona mayor resistencia a la sutura y resistencia a la tracción en todas las direcciones. Por el contrario, una membrana laminar que contiene fibras orientadas proporciona una elevada resistencia a la tensión de sutura y resistencia a la tracción sólo en ciertas direcciones. Véase el Ejemplo 5 a continuación. Específicamente, una membrana laminar que contiene fibras orientadas tiene mayor resistencia a la retención de la sutura en la dirección perpendicular a la orientación de las fibras que en la dirección paralela a la orientación de las fibras. Por otra parte, tiene mayor resistencia a la tracción en la dirección paralela a la orientación de las fibras que en la dirección perpendicular a la orientación de las fibras. Puesto que es difícil discernir la orientación de la fibra en una membrana laminar que contiene fibras orientadas, puede producirse un fallo si la membrana laminar no se coloca adecuadamente en un sitio diana.
- 40 Una membrana laminar de esta invención se puede usar en la reparación de tejidos blandos. Por ejemplo, cuando se utiliza en la reparación de un tejido de pericardio después de una cirugía de corazón abierto, la membrana proporciona una resistencia uniforme en todas las direcciones de modo que puede suturarse con el pericardio del huésped para prevenir el desgarro y proteger el tejido. Como otro ejemplo, cuando se usa para reparar la hernia de
- 45
- 50
- 55
- 60

la pared abdominal, proporciona una fuerza uniforme para soportar el tejido herniado. Una membrana laminar de esta invención también puede usarse en cirugías gástricas y pulmonares.

5 El ejemplo específico siguiente debe ser interpretado como meramente ilustrativo y no limitativo del resto de la descripción de ninguna manera. Sin más elaboración, se cree que un experto en la técnica puede, basándose en la descripción en la presente memoria, utilizar la presente invención en toda su extensión.

#### Ejemplo 1: Preparación de fibras de colágeno purificadas

10 El tendón flexor profundo bovino se utilizó para preparar fibras de colágeno tipo I. Inicialmente, la grasa y la fascia del tendón se retiraron cuidadosamente y se lavó con agua. El tendón así obtenido contenía en su mayor parte fibras de colágeno de tipo I y posteriormente se congeló y se trituró en rodajas de 0,5 mm con una cortadora de carne. 1 kg de tendón húmedo en rodajas se extrajo primero en 5 litros de agua destilada a temperatura ambiente durante 24 horas. El extractor fue desechado. Se añadió una solución de 5 litros que contenía HCl 0,2 N y Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5 M y se extrajeron los cortes de tendón a temperatura ambiente durante 24 horas. Después de la decantación del agente de extracción ácido, el tendón se lavó con 5 litros de una solución de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5 M para eliminar el ácido residual. El tendón extraído con ácido se extrajo luego en una solución de 5 litros que contenía NaOH 0,8 M y Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 M a temperatura ambiente durante 24 horas. El extractor básico se desechó entonces. La base residual se neutralizó con una solución de HCl 0,5 N a pH 5, seguido de varios cambios de agua destilada para eliminar las sales residuales asociadas con el tendón. El tendón se desgrasó luego con isopropanol (tendón: isopropanol = 1: 5, v/v) durante 8 horas a 25°C. Después de la decantación del agente de extracción, se añadió un volumen igual de isopropanol y las rodajas de tendón se extrajeron durante la noche a 25°C. El tendón desgrasado se equilibró a continuación en una solución de tampón fosfato 0,05 M, pH 7,4 durante 24 horas. La solución tampón en exceso se decantó y las fibras de colágeno purificadas se almacenaron en húmedo en un congelador a una temperatura inferior a -20°C o se almacenaron en la forma secada al aire a temperatura ambiente.

#### Ejemplo 2: Preparación de dispersiones de fibras de colágeno

25 Se pesó una parte alícuota de fibras de colágeno purificadas y se dispersó en una solución de ácido láctico 0,07 M. La dispersión así obtenida se homogeneizó con un homogenizador Silverson (Silverson Machines, Inc., East Longmeadow, Mass.) La homogeneización se llevó a cabo durante aproximadamente 1 a 3 minutos. La dispersión homogeneizada se filtró después con un filtro de malla de acero inoxidable de malla 40. La dispersión filtrada, que tenía un contenido de colágeno de 0,62% (p/v), se desairó con vacío para eliminar el aire atrapado.

#### Ejemplo 3: Fabricación de una membrana laminar a partir de fibras de colágeno dispersadas mediante liofilización

30 Se añadieron 1,5 kg de la dispersión de fibras de colágeno preparada en el Ejemplo 2 (0,62%) en un matraz de 4 litros. Las fibras de colágeno se coacervaron añadiendo 200 ml de una solución de NH<sub>4</sub>OH al 0,3% para ajustar el pH de la dispersión al punto isoeléctrico del colágeno (pH de aproximadamente 5,0).

35 Las fibras de colágeno coacervadas se retiraron del vaso de precipitados y se colocaron en un tamiz de acero inoxidable de malla 20. Se eliminó la solución en exceso moviendo lentamente las fibras coacervadas hacia adelante y hacia atrás con una espátula de teflón hasta que el contenido de sólidos de las fibras hidratadas alcanzó entre 10% y 15% en peso. Las fibras coacervadas, parcialmente deshidratadas, es decir, la masa de colágeno, se distribuyeron entonces uniformemente sobre un plato plano y se aplastaron con un rodillo para formar una membrana laminar, que tenía generalmente forma rectangular. La membrana cubría un área de aproximadamente 150 cm<sup>2</sup>, y tenía un espesor de aproximadamente 0,3-0,4 mm (medido por un calibre de altura). La longitud media de las fibras era de aproximadamente 350 ± 70 cm. La membrana húmeda aplanada se liofilizó entonces a -10°C durante 24 horas y 20°C durante 10 horas bajo una presión menor de 26,66 Pa (200 millitorr) usando un secador de congelación de Virtis (Virtis, Gardiner, Nueva York).

45 La membrana liofilizada se reticuló con vapor de formaldehído generado a partir de una solución de formaldehído al 2% a 20°C durante 6 horas. La membrana reticulada se enjuagó extensivamente con agua destilada para eliminar cualquier residuo de formaldehído. A continuación se liofilizó de nuevo a -10°C durante 24 horas y 20°C durante 10 horas para obtener una membrana de lámina blanca. La membrana laminar así obtenida se cortó a continuación en diversos tamaños y formas (por ejemplo, cuadrados, rectángulos o círculos) dependiendo de las aplicaciones deseadas. Por ejemplo, se puede cortar en tamaños de 6,25 cm<sup>2</sup> a 125 cm<sup>2</sup> para la reparación de la duramadre.

50 Ejemplo 4. Fabricación de una membrana laminar a partir de fibras de colágeno dispersadas mediante secado al aire seguido de liofilización

55 Se añadieron 1,5 kg de la dispersión de fibras de colágeno preparada en el Ejemplo 2 (0,62%) en un matraz de 4 l. Las fibras de colágeno se coacervaron añadiendo 250 ml de una solución de NH<sub>4</sub>OH al 0,3% para ajustar el pH de la dispersión a aproximadamente 5,0. Las fibras de colágeno coacervadas se retiraron del matraz y se colocaron en un tamiz de acero inoxidable de malla 20. Se eliminó la solución en exceso moviendo lentamente las fibras coacervadas hacia adelante y hacia atrás con una espátula de teflón hasta que el contenido de sólidos de las fibras hidratadas alcanzó entre 10% y 15% en peso. Las fibras de colágeno coacervadas, parcialmente deshidratadas, se distribuyeron uniformemente sobre una placa plana y se aplanaron con un rodillo para formar una membrana

laminar. La membrana cubría un área de aproximadamente 150 cm<sup>2</sup> y tenía un espesor de 0,45-0,55 mm (medido por un calibre de altura). La longitud media de las fibras era de aproximadamente 350 ± 70 cm. La membrana húmeda aplastada se secó al aire en una campana limpia. La membrana laminar secada al aire se reticuló luego en una solución de formaldehído al 0,8% (que tenía un pH de 7) a temperatura ambiente durante 8 horas. La membrana laminar reticulada se enjuagó extensivamente con agua destilada para eliminar cualquier formaldehído residual. Después se liofilizó a -40°C durante 24 horas y 20°C durante 10 horas para obtener una lámina de membrana blanca.

#### Ejemplo 5. Caracterización de membranas laminares

Se midieron seis propiedades (es decir, el espesor, la densidad, la temperatura de transición hidrotérmica, la resistencia a la tensión de sutura, la resistencia a la tracción y la permeabilidad) de cuatro membranas laminares. Específicamente, se estudiaron en este ejemplo una membrana laminar preparada a partir del Ejemplo 3, una membrana laminar preparada a partir del Ejemplo 4, una membrana laminar preparada de acuerdo con la patente de EE.UU. N° 6.391.333, y una membrana laminar preparada de acuerdo con la patente de EE.UU. N° 5.206.028.

#### A. Espesor

El espesor de una membrana laminar se determinó con un calibre.

#### B. Densidad

Cuando se determinó la densidad (g/cm<sup>3</sup>) de una membrana laminar, la membrana se secó primero bajo vacío durante 24 horas o sobre P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> durante 24 horas y se registró el peso en seco. Las dimensiones (es decir, la longitud, el ancho y el espesor) de la membrana se midieron después usando un calibre. La densidad se determinó por la cantidad de colágeno por unidad de volumen de la membrana.

#### C. Temperatura de transición hidrotérmica

Para cada membrana laminar, se perforó una porción que tenía un diámetro de 2,5 mm, se hidrató en solución salina tamponada con fosfato (PBS), se colocó en una celda de aluminio y se selló. La muestra se colocó entonces en un soporte de muestra de un calorímetro de exploración diferencial (Mettler/Toledo DSC882, Mettler-Toledo Inc., Columbus, Ohio) y se calentó a una velocidad de 5°C por minuto. La temperatura de transición hidrotérmica se tomó como la temperatura máxima de la transición desde la estructura natural de las fibras de colágeno extendidas a una estructura rebajada desnaturalizada de las fibras.

#### D. Fuerza mecánica

Resistencia a la retención de la sutura: Para cada membrana laminar, se determinó la resistencia a la retención de la sutura de una membrana húmeda utilizando un probador mecánico (Chatillon, Greensboro, N.C.). La membrana se cortó a un tamaño de 20 mm x 15 mm y se remojó en una solución de PBS, pH 7,4 a 25°C, durante aproximadamente 5 minutos. Se colocó una sutura (trenzado negro de seda 3-0, conicidad SH-1, Ethicon, Somerville, N.J.) a través del lado de 20 mm a aproximadamente 4 mm del borde. La sutura se ató en un nudo y se aseguró a un adaptador de gancho del probador mecánico. La membrana se aseguró entonces con una abrazadera en el lado opuesto de la sutura. La sutura se tiró a una velocidad de 1,0 pulgadas/min (0,0254 m/min) hasta que la membrana se separó.

Resistencia a la tracción: Para cada membrana laminar, se determinó la resistencia a la tracción de una membrana húmeda usando el probador mecánico mencionado anteriormente (Chatillon, Greensboro, N.C.). La membrana se cortó en forma de mancuerna con un punzón de troquel. Después, la membrana se remojó en una solución de PBS, pH 7,4, a 25°C durante aproximadamente 5 minutos. A continuación, se sujetó a una fijación de abrazadera en ambos extremos y se tiró a una velocidad de 1,0 pulgadas/minuto (0,0254 m/min) hasta que se separó la membrana.

#### E. Permeabilidad

Para cada membrana de lámina, se insertó un disco de 2 cm de diámetro cortado de una membrana laminar en un agujero entre dos compartimientos de una cámara especialmente diseñada, separando por ello completamente los dos compartimientos. Se añadió a un compartimiento un volumen fijo de PBS que contenía 50 µg/ml de diversos tamaños de moléculas de péptido y proteína. El otro compartimiento se llenó con un volumen fijo de PBS solamente. Las soluciones en ambos compartimientos se dejaron equilibrar durante 24 horas. A continuación, se realizó un ensayo para determinar los tamaños del péptido y las moléculas de proteína en el compartimiento que inicialmente sólo contenía PBS.

Los resultados experimentales se resumen en la Tabla 1 a continuación. Inesperadamente, estos resultados mostraron que las membranas laminares preparadas a partir de los Ejemplos 3 y 4 (es decir, que contenían fibras largas no orientadas) tenían una alta resistencia a la sutura y una alta resistencia a la tracción en dos direcciones perpendiculares. Una membrana preparada de acuerdo con la patente de EE.UU. 6.391.333 (es decir, que contenía fibras orientadas) tenía una alta resistencia a la sutura o una alta resistencia a la tracción solamente en una

## ES 2 625 615 T3

dirección (ya sea perpendicular a la orientación de las fibras o paralela a la orientación de las fibras). Además, una membrana preparada de acuerdo con la patente de EE.UU. N° 5.206.028 (es decir, que contenía fibras cortas no orientadas) tenía tanto una baja resistencia a la sutura como una baja resistencia a la tracción en dos direcciones perpendiculares.

5 Tabla 1. Propiedades Físicas de Varias Membranas

Prueba	Membrana preparada a partir del Ejemplo 3 (fibras no orientadas y largas)	Membrana preparada a partir del Ejemplo 4 (fibras no orientadas y largas)	Membrana preparada de acuerdo con la patente de EE.UU. 6.391.333 (fibras orientadas)	Membrana preparada de acuerdo con la patente de EE.UU. 5.206.028 (fibras no orientadas y cortas)
Espesor (mm)	0,26 ± 0,01	0,14 ± 0,01	0,26 ± 0,01	0,19 ± 0,002
Densidad (g/cm <sup>3</sup> )	0,36 ± 0,02	0,63 ± 0,09	0,42 ± 0,03	0,67 ± 0,10
Temperatura de transición hidrotérmica (°C)	55 ± 0,4	59 ± 0,2	56 ± 0,6	54,8 ± 1,0
Resistencia de la sutura (kg)				
Eje X	0,25 ± 0,10	0,32 ± 0,05	N/A	0,13 ± 0,02
Eje Y	0,26 ± 0,11	0,32 ± 0,11		
Resistencia a la tracción (kg/cm <sup>2</sup> )				
Eje X	87 ± 20	79 ± 27	N/A	33,6 ± 6,10
Eje Y	71 ± 3	68 ± 25		
Resistencia de la sutura (kg)				
Paralelo a la orientación de las fibras	N/A	N/A	0,19 ± 0,03	N/A
Perpendicular a la orientación de las fibras			0,27 ± 0,03	
Resistencia a la tracción (kg/cm <sup>2</sup> )				
Paralelo a la orientación de las fibras	N/A	N/A	82,1 ± 12,7	N/A
Perpendicular a la orientación de las fibras			39,5 ± 6,4	
Permeabilidad a la anhidrasa carbónica (PM 29.000) (%)	11	2,5 ± 2,3	2,8 ± 0,8	No permeable

Los resultados se expresan como un promedio de 5 mediciones ± DP.

**Otras realizaciones**

Todas las características descritas en esta memoria descriptiva se pueden combinar en cualquier combinación.

**REIVINDICACIONES**

1. Una membrana laminar para reparar un tejido dañado, que comprende una capa isotrópica de fibras basadas en colágeno reticuladas que tienen una estructura laminada de múltiples capas con una densidad de 0,1 a 1,2 g/cm<sup>3</sup>, en la que las fibras tienen de 10 a 1.000 cm de largo.
- 5 2. La membrana laminar según la reivindicación 1, en la que la membrana tiene un espesor de 0,05 a 1,5 mm, una temperatura de transición hidrotérmica de 45 a 80°C, una resistencia de retención de sutura de 0,1 a 5 kg y una resistencia a la tracción de 20 a 250 kg/cm<sup>2</sup>, y es permeable a moléculas que tienen pesos moleculares de 50 a 100.000 daltons.
- 10 3. La membrana laminar de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en la que las fibras tienen una longitud de 30 a 800 cm.
4. La membrana laminar de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que las fibras tienen una longitud de 50 a 500 cm.
5. La membrana laminar de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende además un agente bioactivo.
- 15 6. Un método de fabricación de una capa isotrópica de fibras biopoliméricas reticuladas, en el que las fibras biopoliméricas son fibras basadas en colágeno, que comprende: coacervar fibras biopoliméricas que tienen longitudes de menos de 1 cm dispersadas en una solución acuosa para obtener fibras biopoliméricas coacervadas que tienen longitudes de 10 a 1.000 cm; aplanar las fibras biopoliméricas coacervadas en una capa; secar la capa; y reticular las fibras biopoliméricas.
- 20 7. El método de la reivindicación 6, que comprende además deshidratar las fibras biopoliméricas coacervadas para alcanzar un contenido sólido de 5-25% en peso antes de la etapa de aplanamiento.
8. El método de cualquiera de las reivindicaciones 6 a 7, en el que las fibras tienen una longitud de 30 a 800 cm.
9. El método de cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en el que las fibras tienen una longitud de 50 a 500 cm.
10. Una capa isotrópica de fibras a base de colágeno reticuladas preparada por el método de cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9.