

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 644 553**

51 Int. Cl.:

**A61L 27/18** (2006.01)

**A61L 27/24** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.05.2011 PCT/FR2011/051234**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.12.2011 WO11151587**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.05.2011 E 11728327 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.07.2017 EP 2575910**

54 Título: **Matrices densas de colágeno para la reparación tisular y su procedimiento de preparación**

30 Prioridad:

**31.05.2010 FR 1054194**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**29.11.2017**

73 Titular/es:

**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE (C.N.R.S.) (33.3%)**

**3, rue Michel-Ange**

**75016 Paris , FR;**

**UNIVERSITÉ DE VERSAILLES SAINT-QUENTIN-  
EN-YVELINES (33.3%) y**

**UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE (PARIS 6)  
(33.3%)**

72 Inventor/es:

**GIRAUD-GUILLE, MARIE-MADELEINE;**

**NASSIF, NADINE;**

**WANG, YAN;**

**HELARY, CHRISTOPHE y**

**PELLE, ANNE**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 644 553 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

Matrices densas de colágeno para la reparación tisular y su procedimiento de preparación

La presente invención tiene por objeto un procedimiento de preparación de matrices fibrilares densas de colágeno, las matrices obtenidas de este modo y sus utilidades para la reparación tisular.

## 5 I- SITUACIÓN ACTUAL Y EXPECTATIVAS:

Los desafíos económicos y sociales de los biomateriales son considerables debido a la significativa prolongación de la esperanza de vida en los países occidentales y a las patologías que le están asociadas.

10 En la bibliografía se proponen numerosos materiales de sustitución, de naturaleza sintética (metales, cerámicas, polímeros) o natural (quitosana, dextrano, pululano), glucoaminoglucanos (GAG) o colágeno. Los criterios de calidad de los biomateriales se determinan por su facilidad de utilización, sus propiedades mecánicas y su devenir en el organismo (rechazo o degradación, adhesión y colonización celular, remodelación).

De este modo, en el contexto actual, ya se han propuesto diferentes tipos de sustitutos a base de colágeno a nivel de aplicaciones industriales, sin embargo, siguen siendo imperfectos para responder plenamente a las expectativas de los cirujanos y de los pacientes.

15 Los primeros biomateriales a base de colágeno que dieron lugar a aplicaciones industriales, fueron los sustitutos de piel. Los productos comercializados se propusieron como implantes en grandes quemaduras o apósitos a nivel de quemaduras crónicas y de úlceras. El primer sustituto dérmico, comercializado con el nombre de Integra® es una esponja acelular de colágeno y proteoglicanos con puentes de glutaraldehído. Asociado a una lámina de queratinocitos, comercializado con el nombre de Epicel®, el equivalente dérmico se convierte en un sustituto de piel.

20 En otras aplicaciones los sustitutos incluyen polímeros de origen sintético o integran células y su éxito dependerá de las interrelaciones células/matrices. La adhesión de las células en los poros grandes, dentro de esponjas liofilizadas de colágeno (Orcel® o Integra®) los colocan en una situación en la que el soporte está en 2D, en cuyo caso el fenotipo difiere de la situación *in vivo* donde las células tienen contactos en 3D. Esto refuerza la ventaja de las moléculas de origen natural, en particular el colágeno para promover la adhesión y la colonización celular. Los  
25 únicos sistemas en los que los fibroblastos se encuentran con contactos en 3D hidrogeles de colágeno desarrollados en los Estados Unidos. Estos hidrogeles asociados con láminas de queratinocitos se convierten entonces en materiales de reparación cutánea (Apligraf®). El principal inconveniente de estos biomateriales radica en sus malas propiedades mecánicas.

30 Los materiales a base de colágeno implantables actualmente se derivan de dos procedimientos de fabricación, lo que conduce a esponjas o hidrogeles. Estas materias primas se someten, a continuación, a tratamientos que refuerzan la calidad de los productos comerciales por asociación con moléculas químicas (consolidación), células (fibroblastos) o películas protectoras (silicona). Las esponjas de colágeno, obtenidas por liofilización de soluciones de colágeno solubles en ácido son sistemas tridimensionales porosos. El tamaño de los poros, de 15 a 150 µm de  
35 diámetro, varía según los criterios de congelación que precede a la liofilización. La estructura en esponja permite a los fibroblastos sembrados proliferar colonizando completamente el sustrato y a continuación secretar colágeno fibrilar. Las aplicaciones en terapia celular o génica, de estos sistemas están relacionadas con sus propiedades de soporte biocompatible y biodegradable. Sin embargo, la fragilidad de las esponjas y su corta vida útil en el cuerpo requiere una reticulación con agentes químicos (aldehídos, carbodiimidias) cuya toxicidad plantea problemas. Los  
40 hidrogeles de colágeno se obtienen por precipitación de los monómeros de colágeno en fibrillas en una solución soluble en ácido. Cuando los fibroblastos se asocian con la solución de partida y con el medio de cultivo, el gel fibrilar poco concentrado (~1 mg/ml) y de estructura al azar, aprisiona las células. Se observa entonces una contracción importante del gel en los días siguientes (~3 % de la superficie inicial después de 14 días de cultivo) y da como resultado lo que se llama un equivalente dérmico. Este tejido reconstituido se convierte en un equivalente de la  
45 piel cuando se siembra de forma secundaria con células de la epidermis, queratinocitos, que proliferan y recubren la estructura. Aunque los ensayos de injertos en seres humanos han demostrado las cualidades biológicas de estos sustitutos, los fenómenos de contracción de red fibrilar suelta plantean, sin embargo, problemas obvios de fragilidad, durante la manipulación de los materiales o después de su implantación. Estos hidrogeles han sido objeto de numerosos estudios en términos de remodelación (síntesis de colágeno y metaloproteínasa) y de proliferación celular. Aunque los hidrogeles son interesantes modelos de cultivo celular, han demostrado ser insuficientes como  
50 sustratos para la reparación tisular. Las propiedades mecánicas de los hidrogeles se han mejorado mediante el aumento de su concentración por compresión (véase §II.4), dando como resultado entonces películas fácilmente deshidratadas y quebradizas, y su espesor de aproximadamente 40 µm es demasiado fino para muchas aplicaciones.

55 En paralelo, tejidos biológicos descelularizados de origen animal (válvulas cardíacas, vasos, dermis, tejidos de sostén de origen bovino o porcino), asociados a otros componentes, se colocaron en el mercado. En este tipo de enfoque, complicaciones, relacionadas con los modos de preparación (restos celulares residuales o citotoxicidad relacionada con agentes de reticulación) exponen importantes reacciones inflamatorias y tienen graves consecuencias en términos de morbilidad y mortalidad.

También existe una necesidad de nuevos biomateriales que respondan mejor a las expectativas del mundo médico y de los pacientes, concretamente biomateriales desprovistos de toxicidad, de formas variables o en recubrimiento de materiales, colonizables por las células e integrables por los tejidos del huésped. La patente WO2006/29571 divulga un procedimiento para formar una matriz de colágeno con propiedades mecánicas mejoradas. El pH de una solución de colágeno se incrementa para formar fibrillas. A continuación, el gel se pone en contacto con un agente de reticulación. La formación de enlaces covalentes en el gel de colágeno actuará sobre su estabilidad y sus propiedades mecánicas mejorarán. El documento EP 0457430 divulga la preparación de un gel de colágeno mediante diálisis contra una solución de polietilenglicol. Los inventores desarrollaron técnicas que permiten trabajar con colágeno a concentraciones elevadas, controlando la implementación de un orden supramolecular asociado a la concentración y estabilizando durante una transición sol/gel para dar como resultado matrices fibrilares densas. Los inventores también han mostrado que matrices con 40 mg/ml de colágeno presentan propiedades particularmente interesantes a nivel de sus respuestas celular y mecánica. Estas son colonizadas *in vitro* por fibroblastos sembrados en su superficie tras la hidrólisis del colágeno mediante metaloproteasas. Después de 28 días de cultivo, el número de células presentes en la matriz, que resultan de un equilibrio entre proliferación y apoptosis, está próximo al de un tejido vivo (Helary y col. Biomaterials, (2005), 26 págs. 1533-1543; Helary y col. Biomaterials (2006) 27: 4443-4454. Las respuestas mecánicas bajo compresión uniaxial dan resultados equivalentes a muestras de control de dermis de rata, lo que sugiere que estos materiales podrían utilizarse en reparación tisular (Ramtani y col. JMMB, 2010).

La solicitud WO 2010/004182 a nombre de los inventores se refiere a la mineralización de estas matrices fibrilares densas de colágeno en un intervalo de concentración más elevado (a partir de 80 mg/ml) para una aplicación en el campo de los substitutos óseos.

En los trabajos utilizados anteriormente, los inventores utilizaron diferentes procedimientos para concentrar el colágeno con, como objetivo, la obtención de una matriz fibrilar densa de colágeno.

## II- PROCEDIMIENTOS PRECEDENTES DE OBTENCIÓN DE MATRICES DENSAS:

### 1) Evaporación

*Procedimiento* - Las soluciones ácidas iniciales de colágeno, cuya concentración inicial es inferior a 5 mg/ml, se colocan en un cristizador (o cualquier otro recipiente de gran abertura) bajo una campana en medio estéril. Se deja evaporar la solución hasta la concentración deseada (Hélary y col. Biomaterials, 2005; figura 13).

*Límite* - Esta técnica no está adaptada para concentraciones muy grandes y de gran volumen. En efecto, si se parte de una solución inicial de 1 mg/ml para obtener una solución a 300 mg/ml, es preciso un recipiente muy grande y *a priori* demasiado amplio para no esperar un tiempo significativo para recuperar su muestra. Además, en la superficie se puede formar una película de colágeno seco. Además, después de la precipitación por ascenso del pH, las fibrillas de colágeno no son siempre de tamaño homogéneo. Esta técnica es poco adaptable/transferible a la industria, ya que sería necesaria una zona de esterilidad grande, debido a la utilización de una cubeta abierta. Además, a concentraciones muy elevadas o, con más razón, para volúmenes grandes, se forma un gradiente de concentración (zona más concentrada en la superficie es decir en la interfase aire/solución) y parece difícil alcanzar el equilibrio. La existencia de este gradiente explica en parte que las fibrillas de colágeno no sean siempre de tamaño homogéneo.

### 2) Diálisis

*Procedimiento* - Las soluciones ácidas de colágeno cuya concentración inicial es inferior a 5 mg/ml se colocan en un tubo de diálisis. La porosidad de la membrana está fijada para que el disolvente, las sales y las moléculas cuyo peso molecular es inferior al tamaño de los poros se difundan a través de la pared pero no el colágeno. El conjunto se sumerge en una solución de polímero (en general polietilenglicol o PEG) cuya concentración es igual/o un poco superior a la que se desea alcanzar (Gobeaux y col. J. Mol. Biol. 2008; figura 14).

*Límites* - Con esta técnica, si se parte de una solución inicial de 1 mg/ml para obtener una solución a 300 mg/ml, es preciso un volumen de membrana al menos igual a 300 ml para obtener un volumen final de 1 ml de solución concentrada, lo que experimentalmente no es evidente. También en general, se utilizan volúmenes de membranas de diálisis menores y se recarga con colágeno regularmente hasta obtener un volumen de solución bastante significativo para que se pueda extraer. Esta etapa también plantea un problema ya que es preciso entonces «rascar» el colágeno concentrado repartido un poco por todas partes en el interior de la membrana, lo que conlleva el riesgo, debido al cizallamiento, de modificar la organización del colágeno que, a esta concentración, posee propiedades de organización de tipo cristal-líquido. Debido a esto, la organización final es difícilmente controlable. A causa de esto, después de la precipitación por ascenso del pH, las fibrillas de colágeno no son de tamaño homogéneo. Además, la solución concentrada de colágeno recuperada no es homogénea macroscópicamente (véase la figura 1B) cuyas propiedades mecánicas del material final no son constantes para el conjunto del material.

### 3) Microcélulas

*Procedimiento* - Las soluciones ácidas iniciales de colágeno se inyectan y se concentran progresivamente en microcámaras de vidrio fabricadas en el laboratorio. El principio es que se inyecta entre lámina y laminilla colágeno

diluido que, difundiéndose hacia los bordes de la microcámara en la interfase con el aire, se concentra poco a poco por evaporación de la solución. Cuanto más se va hacia los bordes de la microcámara (hacia la interfase aire/solución) más concentrado está el colágeno. Un gradiente de concentración muy amplio del colágeno (~5 a 1000 mg/ml) se forma en la solución final concentrada (G. Mosser y col., Matrix Biol. 2006; figura 15).

- 5 *Límites* - En este caso no existe, por lo tanto, control de la concentración. Este procedimiento es interesante para estudiar diagramas de fases y está adaptado a pequeños volúmenes (inferiores a 0,5 ml). Sin embargo, la primera capa en la interfase aire/solución es en realidad una capa diluida, ya que el colágeno no tiene tiempo de concentrarse, por lo tanto de organizarse, al contrario que la capa siguiente. Después de la precipitación por ascenso del pH, las fibrillas de colágeno no son, por lo tanto, en este caso de tamaño homogéneo.

#### 10 4) **Compresión**

*Procedimiento* - Este procedimiento propone la compresión de geles fibrilares hidratados de colágeno para obtener matrices densas. Las redes fibrilares siguen siendo isótropas pero las propiedades mecánicas son muy superiores a las del gel inicial. Se verifica la viabilidad de las células insertadas dentro de dichas matrices, en forma de laminillas enrolladas (Brown y col. 2005; figura 16).

- 15 *Límites* - El procedimiento es ultrarrápido y las concentraciones de colágeno pueden alcanzar los 170 mg/ml. Sin embargo, el hidrogel experimenta fuertes cizallamientos y está, debido a su implementación, extremadamente deshidratado, lo que le hace frágil y sujeto a infecciones una vez implantado.

Los límites de estos procedimientos anteriores muestran el interés fundamental, para aplicaciones en ingeniería tisular, de disponer de una metodología que permita obtener matrices de colágeno homogéneas macroscópicamente así como en concentración, en diámetro de fibrillas y cuyo orden esté controlado.

20

### III- NUEVO PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCIÓN DE MATRICES DE COLÁGENO DENSAS Y HOMOGÉNEAS

Los inventores han desarrollado, de este modo, un procedimiento que permite obtener matrices fibrilares densas de colágeno obtenidas a concentraciones de 5 a 60 veces más elevadas que los hidrogeles convencionales, incluso más y que no contienen ningún aditivo que pretende reforzar las propiedades mecánicas sino solamente colágeno puro reconstituido en forma de fibrillas y de redes de fibrillas densas, lo que evita los fenómenos de inflamaciones, de toxicidad y de rechazos. Las matrices obtenidas son colonizables por células de tejido conjuntivo y sus propiedades mecánicas son próximas a las de los tejidos biológicos.

25

La presente invención también tiene por objeto un procedimiento de preparación de un material homogéneo a base de colágeno empezando por la concentración de una solución de colágeno soluble en ácido, comprendiendo dicho procedimiento:

30

a) la puesta en contacto, por inyección continua de una solución de colágeno soluble en ácido mediante medios de presión controlada, con un elemento permeable, estando dicho elemento permeable, a su vez, en contacto con un agente concentrador, más particularmente a saber una solución de polímero,

35 b) el mantenimiento en contacto de la solución de colágeno, del elemento permeable y de la solución de polímero, en condiciones que permiten la transferencia selectiva de masa del disolvente contenido en la solución acuosa de colágeno para obtener la formación de una solución más concentrada de colágeno homogéneo en el interior del elemento permeable o en la superficie del elemento permeable.

De acuerdo con la invención, el elemento permeable se selecciona con un tamaño de poros de peso molecular (PM) inferior al del colágeno, por un lado, y al del polímero externo, por otro lado. El mantenimiento en contacto de la solución de colágeno separada de la solución de polímero por el elemento permeable, permite al disolvente difundirse de la solución de colágeno interna hacia la solución de polímero externa. Esto permite obtener la formación de una solución más concentrada de colágeno homogéneo en el interior del elemento permeable o en la superficie del elemento permeable por esta transferencia selectiva de disolvente. En una realización ventajosa de la invención, para permitir la transferencia selectiva de masa del disolvente contenido en la solución acuosa de colágeno, la presión osmótica de la solución de polímero es superior a la de la solución de colágeno.

45

La inyección continua mediante medios controlados puede realizarse mediante cualquier sistema conocido por el experto en la materia susceptible de permitir este tipo de inyección, concretamente un empujador eléctrico o una bomba. La velocidad de inyección está adaptada para que la fuerza de presión de los dos lados de la membrana sea idéntica; de este modo el flujo está adaptado en función del polímero y de su viscosidad, de modo que el experto en la materia encuentre la velocidad que evita la retracción de la membrana o su hinchado hasta la perforación. La velocidad depende del tipo de polímero utilizado y de su peso molecular, el cual es superior a los poros de la membrana. La adaptación de la velocidad depende de los conocimientos generales del experto en la materia. A modo de ejemplo con PEG de un peso molecular de 35 KDa, se puede utilizar una velocidad comprendida entre 1 y 15  $\mu\text{l}/\text{min}$  lo que permite terminar la formación del material al cabo de 15 días para 28 ml inyectados de una solución a 1 mg/ml. La inyección se puede interrumpir para alcanzar el equilibrio (es decir cuando la concentración de

50

55

colágeno es entonces homogénea por todo el molde) más rápido y, por lo tanto, disminuir el gradiente de concentración más rápido y reanudarse para elaborar un sistema multicapa de concentración controlada y de organización modulable. También es posible interrumpir la inyección sin alcanzar el equilibrio, lo que permitirá tener un gradiente continuo de concentración.

5 Un ejemplo de dispositivo utilizable para implementar el procedimiento de la invención se ilustra en la figura 3.

En una realización ventajosa del procedimiento de la invención, el elemento permeable es una celda de diálisis y dicho procedimiento comprende las siguientes etapas:

a) preparación de una solución ácida de colágeno puro en un disolvente acuoso,

10 b) inyección continua de la solución de colágeno puro mediante medios de presión controlada, en celdas de diálisis de las que al menos uno de los extremos está cerrado por una membrana de diálisis cuya porosidad está fijada para que solamente el disolvente así como el ácido y eventuales aditivos (tales como colágenos de diferentes tipos, los iones, los precursores de una fase mineral (sales de calcio, fosfato, etc...), glucosaminoglucanos o moléculas orgánicas), si están presentes, se difundan a través de dicha membrana, estando dicha membrana en contacto con una solución de polímero, cuya concentración está adaptada a la  
15 concentración final de colágeno,

c) mantenimiento de la solución de colágeno, de la celda de diálisis y del polímero en condiciones que permiten la transferencia selectiva de masa del disolvente contenido en la solución acuosa de colágeno para obtener la formación de la solución concentrada de colágeno homogéneo puro en la celda de diálisis o en la superficie de la membrana de diálisis,

20 d) recuperación del molde en el que está contenido el material o de la membrana en la superficie de la cual está fijado el material de colágeno puro homogéneo.

En de la presente invención, se entiende por solución de colágeno puro una solución que no contiene ningún compuesto añadido únicamente con el fin de reforzar las propiedades mecánicas finales del material; está concretamente libre de agentes reticulantes como aldehídos y de polímeros de refuerzo sintéticos como poliésteres  
25 o naturales como quitosana. Por el contrario, aditivos como moléculas de interés tales como agentes que permiten modificar su porosidad o las cargas superficiales del colágeno pueden añadirse al material.

El colágeno utilizado en la presente invención puede ser de origen natural o recombinante. Puede provenir concretamente de la piel o de los tendones de donde se extrae por vía ácida o enzimática de acuerdo con técnicas conocidas por el experto en la materia.

30 En la invención, la celda de diálisis de la que al menos uno de los extremos está cerrado por una membrana de diálisis, también puede ser un molde constituido completamente por membrana de diálisis. En el caso en el que se inyecta una gran cantidad para llenar el molde, la matriz de colágeno se formará en toda la superficie del molde y no solamente sobre la membrana colocada en el extremo. De este modo, la forma del elemento de diálisis impondrá la forma final del material si se rellena completamente. El procedimiento puede formularse, por lo tanto, en función del  
35 espesor y de la concentración en forma de película, membrana flexible, tubo o moldearse a medida.

Las soluciones ácidas de colágeno utilizadas en la etapa a) se preparan mediante técnicas conocidas por el experto en la materia a partir de colágeno natural o recombinante. El disolvente acuoso, ventajosamente ácido acético a una concentración comprendida entre 17 y 500 mM puede contener diferentes aditivos como, por ejemplo, sales inorgánicas, otros tipos de colágeno o glucosaminoglucanos tales como heparina sulfatada.

40 En una realización ventajosa de la invención, la concentración de colágeno de la solución inicial utilizada en la etapa a) está comprendida entre 0,01 y 5 mg/ml, ventajosamente comprendida entre 0,5 y 3 mg/ml.

De acuerdo con la invención, el polímero utilizado puede ser cualquier polímero hidrosoluble en medio ácido cuyo peso molecular es superior al tamaño de los poros del elemento permeable. Se selecciona concretamente entre el grupo que comprende Dextran® y polietilenglicol (PEG). Ventajosamente, el polímero es polietilenglicol cuyo peso  
45 molecular es superior al del colágeno, por lo tanto, superior a 3000 Da.

La concentración de la solución de polímero puede variar según los casos y su ajuste está al alcance del experto en la materia. Si el volumen de solución de polímero es muy grande, entonces el volumen de disolvente que proviene de la solución de colágeno es despreciable y diluye de forma despreciable la solución de polímero. En este caso, la concentración de polímero inicial será igual a la concentración de colágeno final. Si el volumen de solución de polímero no es grande y la concentración de polímero inicial es igual a la concentración de colágeno final, para no  
50 ralentizar la difusión, la solución de polímero se cambiará regularmente. Si el volumen de solución de polímero no es grande y la concentración de polímero inicial es superior a la concentración de colágeno final, entonces la concentración de polímero inicial se calcula de manera que, después de la dilución por el volumen de disolvente proveniente de la solución de colágeno, sea igual a la concentración final deseada de colágeno.

IV- FIBRILOGÉNESIS DE LAS SOLUCIONES CONCENTRADAS

De acuerdo con la invención, el procedimiento puede comprender además, antes o después de la etapa d), una etapa de formación de fibrillas en el material de colágeno puro. La formación de estas fibrillas permite imitar la estructura fibrilar del colágeno de los tejidos biológicos.

5 La formación de las fibrillas se realiza mediante cualquier técnica conocida por el experto en la materia, concretamente mediante neutralización de la solución a base de colágeno puro homogéneo con una fase gaseosa (básica) o líquida (básica o neutra). Ésta puede realizarse bien in situ sustituyendo el polímero por la fase gaseosa o líquida, lo que permite una preparación «*one-pot*» (en un solo recipiente) del colágeno fibrilar, o bien por inmersión del material de colágeno en una fase gaseosa o líquida.

10 El procedimiento de la invención también puede implementarse para fabricar productos multicapa mediante interrupción de la inyección. La inyección puede interrumpirse para alcanzar el equilibrio más rápido y reanudarse para formar diferentes capas de concentración no continua. También es posible detener la inyección y no esperar al equilibrio para tener diferentes capas de concentración continua.

15 La invención también tiene por objeto un material homogéneo a base de colágeno puro susceptible de obtenerse mediante un procedimiento tal como se ha definido anteriormente.

El producto obtenido de acuerdo con la invención es fácilmente manipulable sin desgarrar y suturable sin reticulación suplementaria. Es homogéneo y no presenta variación de concentraciones.

No desencadenan ninguna reacción inflamatoria a nivel del sitio de implantación y se integran en los tejidos.

20 De acuerdo con la invención, se obtienen materiales cuya concentración es de aproximadamente 5 a aproximadamente 1000 mg/ml, en particular 5, 10, 20, 30, 40 y 250 mg/ml. Para una concentración de 5 mg/ml, el módulo elástico es de aproximadamente 974±239 Pa y el módulo viscoso de aproximadamente 145±40 Pa. Para una concentración de 10 mg/ml, el módulo elástico es de aproximadamente 1287±158 Pa y el módulo viscoso de aproximadamente 124±12 Pa. Para una concentración de 20 mg/ml, el módulo elástico es de aproximadamente 2809±336 Pa y el módulo viscoso de aproximadamente 263±48 Pa. Para una concentración de 40 mg/ml, el módulo elástico es de aproximadamente 9254±1032 Pa y el módulo viscoso de aproximadamente 786±46 Pa. Los valores de los módulos elásticos y viscosos se miden a 1 Hz y el 2 % de deformación.

25 De acuerdo con la concentración de colágeno y el espesor del material de acuerdo con la invención, éste puede utilizarse, por lo tanto, como sustituto tisular, concretamente como refuerzo de pared, para la fabricación de prótesis, como sustituto de tejido blando o como material de relleno.

30 La invención también tiene, por lo tanto, por objeto dispositivos médicos implantables caracterizados porque comprenden un material de acuerdo con la invención.

La invención se entenderá mejor a la luz de los ejemplos 1 a 3 y de las figuras 1 a 12 que ilustran.

35 La figura 1 representa A: una solución de colágeno soluble en ácido a una concentración inferior a 5 mg/ml; B: solución concentrada de colágeno después de la diálisis; C: solución concentrada de colágeno de acuerdo con el procedimiento de la invención.

La figura 2 representa un colágeno (soluble en ácido) (concentración final -200 mg/ml) obtenido por diálisis que es macroscópicamente inhomogéneo (figura 2A). Después de la neutralización, el tamaño de las fibras observadas en microscopía electrónica de barrido es inhomogéneo (figuras 2B a 2D). La concentración inicial de colágeno soluble en ácido es de aproximadamente 3 mg/ml.

40 La figura 3 muestra un ejemplo de dispositivo utilizado de acuerdo con la invención. En el caso 1, todo el volumen de la celda de diálisis está relleno y concentrado de forma homogénea, en el caso 2, la inyección se detiene durante un tiempo T para que el conjunto de la solución presente en la celda se concentre de forma homogénea.

45 La figura 4 representa un colágeno (soluble en ácido) (concentración final -250 mg/ml) obtenido de acuerdo con la técnica de la invención que es macroscópicamente homogéneo (figura 4A). Después de la neutralización, el tamaño de las fibras observado en microscopía electrónica de barrido es homogéneo (figuras 4B a 4D) y se organiza (geometría colestérica) con una homogeneidad de estructura a gran escala (figura B). La concentración inicial de colágeno soluble en ácido es de aproximadamente 1 mg/ml.

50 La figura 5 ilustra la implantación de las matrices densas a 300 mg/ml de forma intramuscular (A) y de forma subcutánea (B).

La figura 6 ilustra el aspecto macroscópico de matrices densas a 20 mg/ml (MD 20 figura 6A) y 40 mg/ml (MD 40 figura 6B) 15 días después de la implantación intramuscular.

La figura 7 representa el aspecto macroscópico después de 15 y 30 días de implantación de una matriz densa a 300 mg/ml (MD 300).

La figura 8 representa el aspecto microscópico de matrices densas a 20 mg/ml (MD 20 figura 8A) y 40 mg/ml (MD 40 figura 8B) 15 días después de la implantación de forma subcutánea.

5 La figura 9 representa el aspecto microscópico después de 15 días de implantación de una matriz densa a 300 mg/ml (MD300) de forma subcutánea a un aumento x 4. Las flechas representan las células que migran/colonizan al interior del gel

10 La figura 10 representa el aspecto microscópico después de 15 días de implantación de una matriz densa a 300 mg/ml (MD300) de forma subcutánea a un aumento x 10. Las flechas representan las células que migran al interior del gel

La figura 11 representa el aspecto microscópico después de 15 días de implantación de una matriz densa a 300 mg/ml (MD300) de forma intramuscular a un aumento x 4. Las flechas representan las células que migran al interior del gel

15 La figura 12 representa el aspecto microscópico después de 15 días de implantación de una matriz densa a 300 mg/ml (MD300) de forma intramuscular a un aumento x 10. Las flechas representan las células que migran al interior del gel.

La figura 13 representa esquemáticamente el principio de la obtención de matrices densas por evaporación.

La figura 14 representa esquemáticamente el principio de la obtención de matrices densas por diálisis.

La figura 15 representa esquemáticamente el principio de la obtención de matrices densas en microceldas.

20 La figura 16 representa esquemáticamente el principio de la obtención de matrices densas por compresión.

## **EJEMPLO 1: PREPARACIÓN DEL MATERIAL DE ACUERDO CON LA INVENCION Y CARACTERIZACIÓN**

### **1.1. Preparación de las soluciones de colágeno iniciales**

Un colágeno de tipo I se prepara a partir de colas de ratas Wistar jóvenes, de acuerdo con el siguiente modo operatorio. Los tendones de cola de rata se escinden en una campana de flujo laminar estéril, y a continuación se lavan en una solución tampón fosfato salina que contiene 137 mM de NaCl, 2,68 mM de KCl, 8,07 mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y 1,47 mM de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, para eliminar las células y los restos de sangre. Los tendones se sumergen a continuación en una solución de NaCl 4 M para eliminar las células intactas restantes y precipitar una parte de las proteínas con peso molecular elevado. Después de un nuevo lavado con la solución tampón salina, los tendones se disuelven en una solución acuosa a 500 mM de ácido acético. La solución obtenida de este modo se clarifica por centrifugado a 41000 g durante 2 h. Las proteínas diferentes del colágeno de tipo I precipitan de manera selectiva en una solución acuosa de NaCl 300 mM, y a continuación se eliminan mediante centrifugado a 41000 g durante 3 h. El colágeno se recupera a partir del sobrenadante por precipitación en una solución acuosa de NaCl 600 mM seguida de un centrifugado a 3000 g durante 45 min. Los sedimentos obtenidos de este modo se disuelven en una solución acuosa de ácido acético 500 mM, y a continuación se dializan cuidadosamente en el mismo disolvente para eliminar totalmente el NaCl. Las soluciones se mantienen a 4 °C y se centrifugan a 41000 g durante 4 h antes de utilizarlas.

### **1.2. Preparación del material homogéneo**

Se introducen 18 ml de una solución de colágeno a una concentración de 3,2 mg/ml en un elemento de diálisis dotado de un empujador eléctrico tal como se describe en la figura 1. La velocidad de inyección se fija a 2 µl/min. La diálisis se realiza a 19 °C en presencia de 150 ml de una solución a 500 mg/ml de polietilenglicol de peso molecular 35 kDa disuelto en una solución acuosa de ácido acético 500 mM. El tiempo de inyección es de 8 días seguidos de una parada de 4 días para alcanzar el equilibrio. La concentración de colágeno de la solución ácida tal como se determinó antes la fibrillogénesis mediante determinación de la cantidad de hidroxiprolina es de ~250 mg/ml.

La fibrillogénesis se realiza por inmersión del material de colágeno en vapor de amoníaco durante 24 horas.

### **1.3. Medida de la homogeneidad del material obtenido**

45 Se observan al microscopio electrónico de barrido muestras de material obtenido a partir de una solución que tiene una concentración inicial de colágeno soluble en ácidos ~1 mg/ml (figura 3), bien de acuerdo con la técnica de diálisis inversa convencional, o bien de acuerdo con el procedimiento de la invención que tiene una concentración inicial de colágeno soluble en ácidos ~3 mg/ml. (figura 2).

50 El colágeno (soluble en ácido) obtenido por diálisis es macroscópicamente inhomogéneo (figura 2A) y el tamaño de las fibras es inhomogéneo (figuras 2B a 2D). Por el contrario, el colágeno fibrilado obtenido mediante el procedimiento de acuerdo con la invención es macroscópicamente homogéneo (figura 4A) y el tamaño de las fibras

es también homogéneo (figuras 4B a 4D).

## EJEMPLO 2: ENSAYOS DE IMPLANTACIÓN

### 2.1. Modo operatorio

#### 2.1.1. Implantación de las matrices densas

- 5 Todos los procedimientos utilizados están de acuerdo con la normativa sobre experimentación animal y los comités éticos del INSERM (no. de autorización 006235, Ministerio de Agricultura, Francia).

10 Se anestesian ratas Wistars de 250g (Wi/Wi, Charles-Rivers Francia) con ayuda de una solución de pentobarbital sódico (30 mg/kg, Centravet, Francia). El abdomen se afeita y se desinfecta y se practica una laparotomía en la línea mediana. Se realizan dos bolsas a uno y otro lado de la línea mediana: una de forma subcutánea, y la otra de forma intramuscular. Las matrices densas de colágeno de concentraciones que varían entre 40 y 300 mg/ml se implantan a continuación. La bolsa muscular se cierra, y a continuación el plano cutáneo (Vicryl® 4/0), véase la figura 5. Quince, treinta o sesenta días después de la implantación, las ratas son sacrificadas con ayuda de un exceso de pentobarbital sódico y las MD se explantan y se fijan en paraformaldehído al 4 % (Merck Francia). Las muestras se incluyen a continuación en parafina.

- 15 Las matrices son fácilmente manipulables sin desgarros.

#### 2.1.2. Análisis histológico

Se realizan cortes seriados de 7  $\mu\text{m}$  y a continuación se tiñen con hematoxilina eosina o tricrómico de Masson. Después de la observación (microscopio Nikon E600 POL) y análisis de las secciones, se realizan fotografías (cámara CCD, Nikon).

- 20 Se realizaron estudios inmunohistológicos en estos cortes y los diferentes elementos de la remodelación tisular se pusieron de manifiesto (macrófagos, control de la inflamación, células endoteliales, neovascularización o vascularización).

### 2.2. Resultados

Se dan en las figuras 6 a 12

- 25 La implantación de las matrices densas no provoca ninguna reacción grave a cuerpos extraños después de 15 días de implantación de matrices a 20 y 40 mg/ml (figuras 6A y 6B).

30 Después de 15 y 30 días de implantación de una matriz densa a 300 mg/ml, de forma subcutánea el tamaño de la muestra no varía. De forma intramuscular, después de 30 días de implantación el volumen de la muestra es globalmente similar. Habrá que esperar 60 días de implantación para visualizar una diferencia (no mostrada). Se observa también la ausencia de reacción inflamatoria a nivel del sitio de implantación de una matriz a 300 mg/ml (figura 7).

La velocidad de colonización de los implantes por las células *in vivo* depende de la concentración de colágeno. Cuanto mayor es la concentración, más lenta es la velocidad. Cuanto más espesa es la matriz, más prolongada será la colonización en el núcleo del material.

- 35 Después de 15 días de implantación, la matriz densa a 20 mg/ml (MD20) es colonizada por las células fibroblásticas (figura 8A). Para la matriz densa a 40 mg/ml (MD40), a nivel del margen externo se observan varias células en frente de éste y comienzan a migrar al interior del gel (figura 8B).

40 De forma subcutánea y de manera general para las concentraciones de 300 mg/ml (MD 300), la colonización celular se realiza más hacia la cara cutánea que hacia la fascia muscular. La MD300 está rodeada por una fine cápsula. A nivel del margen externo se observan varias células en frente de éste y comienzan a migrar al interior del gel (figuras 9 y 10).

El desfase entre los resultados después de la implantación por vía subcutánea e intramuscular es normal. La cicatrización de forma intramuscular es más rápida debido a la vascularización local (figuras 11 y 12).

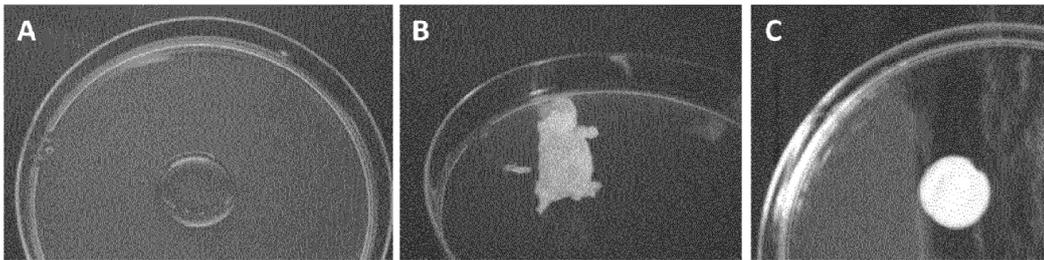
- 45 Las aplicaciones pueden ser, por lo tanto, extremadamente variables en función del tipo de matriz densa seleccionada y del sitio de implantación.

**REIVINDICACIONES**

1. Procedimiento de preparación de un material homogéneo a base de colágeno por concentración de una solución de colágeno, comprendiendo dicho procedimiento:
  - 5 a) la puesta en contacto, por inyección continua de una solución de colágeno mediante medios de presión controlada, con un elemento permeable, estando dicho elemento permeable, a su vez, en contacto con un agente concentrador, a saber, una solución de polímero, seleccionándose el elemento permeable con un tamaño de poros de peso molecular inferior al del colágeno por un lado y al del polímero externo por otro lado, y el polímero utilizado es un polímero hidrosoluble en medio ácido cuyo peso molecular es superior al tamaño de los poros del elemento permeable,
  - 10 b) el mantenimiento en contacto de la solución de colágeno, del elemento permeable y de la solución de polímero en condiciones que permiten la transferencia selectiva de masa del disolvente contenido en la solución acuosa de colágeno para obtener la formación del material de colágeno homogéneo en el interior del elemento permeable o en la superficie del elemento permeable.
2. Procedimiento de preparación de un material homogéneo a base de colágeno de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** el elemento permeable es una celda de diálisis, comprendiendo dicho procedimiento las siguientes etapas:
  - 15 a) preparación de una solución ácida de colágeno puro en un disolvente acuoso,
  - 20 b) inyección continua de la solución de colágeno puro mediante medios de presión controlada, en celdas de diálisis de las que al menos uno de los extremos está cerrado por una membrana de diálisis cuya porosidad está fijada para que solamente el disolvente así como el ácido y los iones, si están presentes, se difundan a través de dicha membrana, estando dicha membrana en contacto con una solución de polímero, cuya concentración está adaptada a la concentración final de colágeno,
  - 25 c) mantenimiento de la solución de colágeno, de la celda de diálisis y del polímero en condiciones que permiten la transferencia selectiva de masa del disolvente contenido en la solución acuosa de colágeno para obtener la formación de la solución concentrada de colágeno homogéneo puro en la celda de diálisis o en la superficie de la membrana de diálisis,
  - d) recuperación del molde en el que está contenido el material o de la membrana en la superficie de la cual está fijado el material de colágeno puro homogéneo.
3. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** comprende además, antes o después de la etapa d), una etapa de formación de fibrillas en el material de colágeno puro.
4. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 o 2, **caracterizado porque** la concentración de la solución utilizada en la etapa a) está comprendida entre 0,01 y 5 mg/ml, ventajosamente comprendida entre 0,5 y 3 mg/ml.
5. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 2 o 4, **caracterizado porque** los iones son precursores de una fase mineral seleccionados entre el grupo que comprende sales de calcio y fosfato.
6. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** el polímero se selecciona entre el grupo que comprende Dextran® y polietilenglicol.
7. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** el polímero es polietilenglicol cuyo peso molecular es superior a 3000 Da.
8. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3, 6 o 7, **caracterizado porque** las fibrillas se forman por tratamiento del material a base de colágeno puro homogéneo con una fase gaseosa básica, o líquida neutra o básica.
9. Material homogéneo, concretamente fibrilar, a base de colágeno puro susceptible de ser obtenido mediante un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
10. Material fibrilar homogéneo a base de colágeno puro de acuerdo con la reivindicación 9, **caracterizado porque** contiene una o varias moléculas de interés seleccionadas entre el grupo que comprende colágenos de diferentes tipos, iones, precursores de una fase mineral, concretamente sales de calcio o fosfato, glucosaminoglucanos y moléculas orgánicas.
11. Material de acuerdo con la reivindicación 9, **caracterizado porque** se presenta en forma de una película, de una membrana flexible, de un tubo o **porque** está moldeado para ese propósito.
12. Utilización del material de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9 y 10 como sustituto tisular.

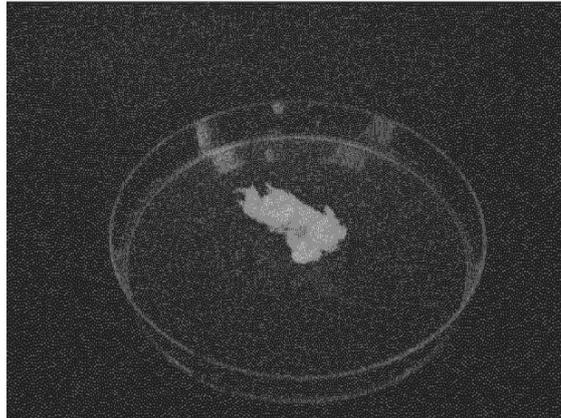
13. Dispositivos médicos implantables, **caracterizados porque** comprenden un material de acuerdo con la reivindicación 9.

FIGURA 1

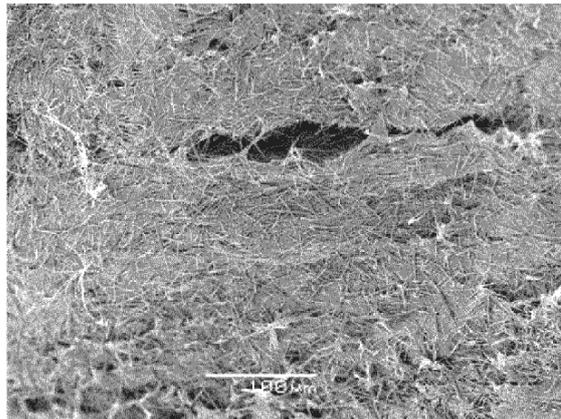


**FIGURA 2**

**A**

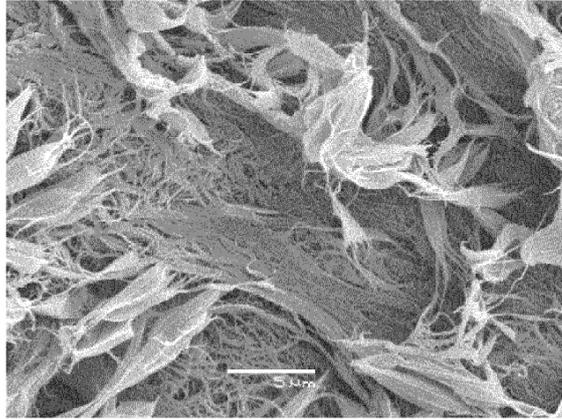


**B**



**FIGURA 2 (continuación)**

**C**



**D**

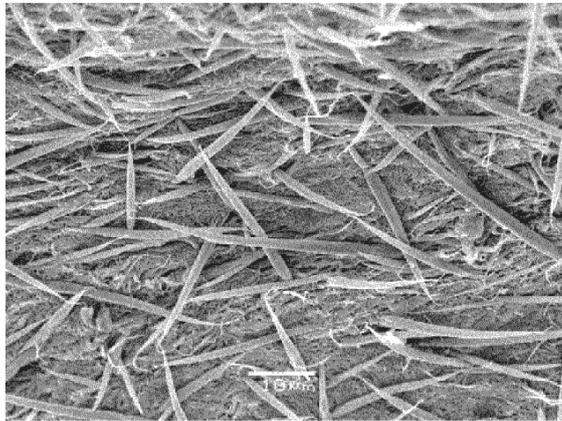


FIGURA 3

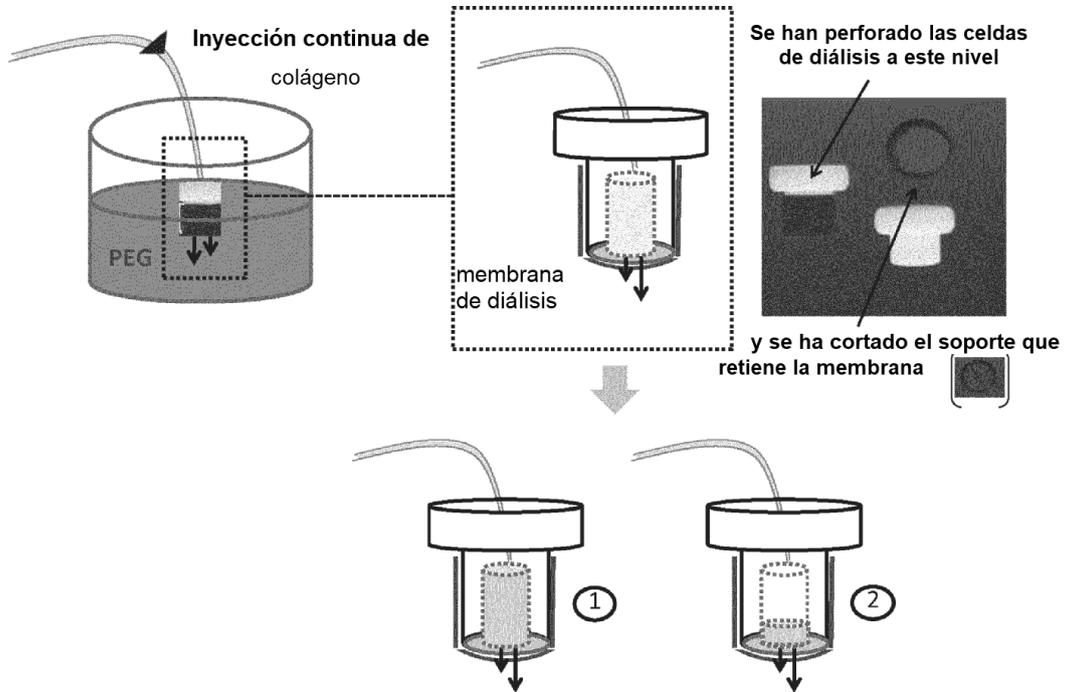
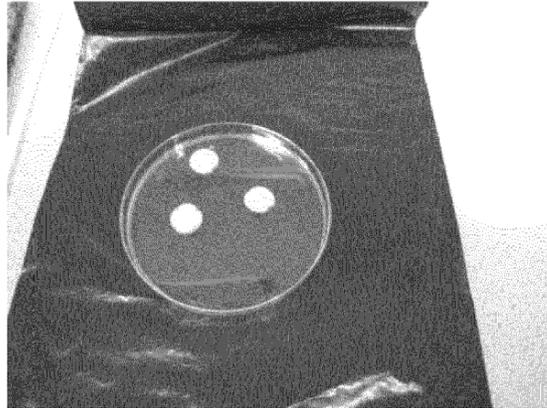


FIGURA 4

A



B

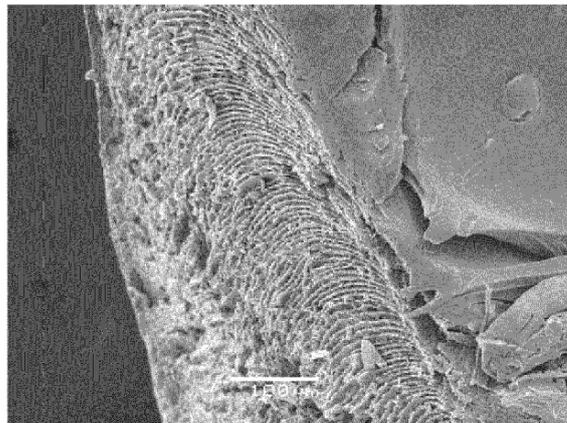
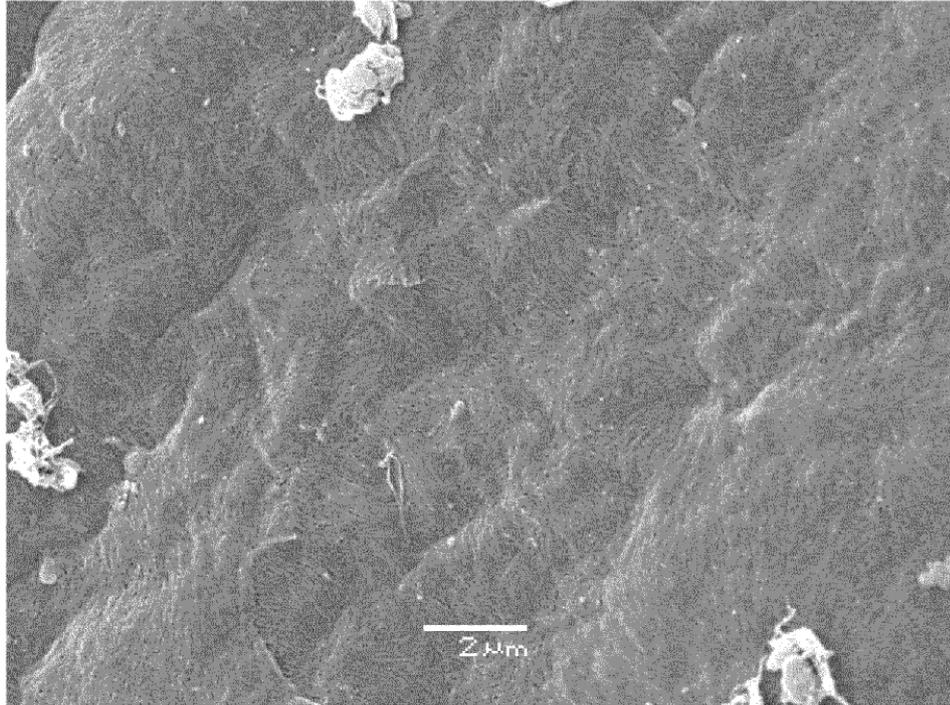


FIGURA 4 (continuación)

C



D

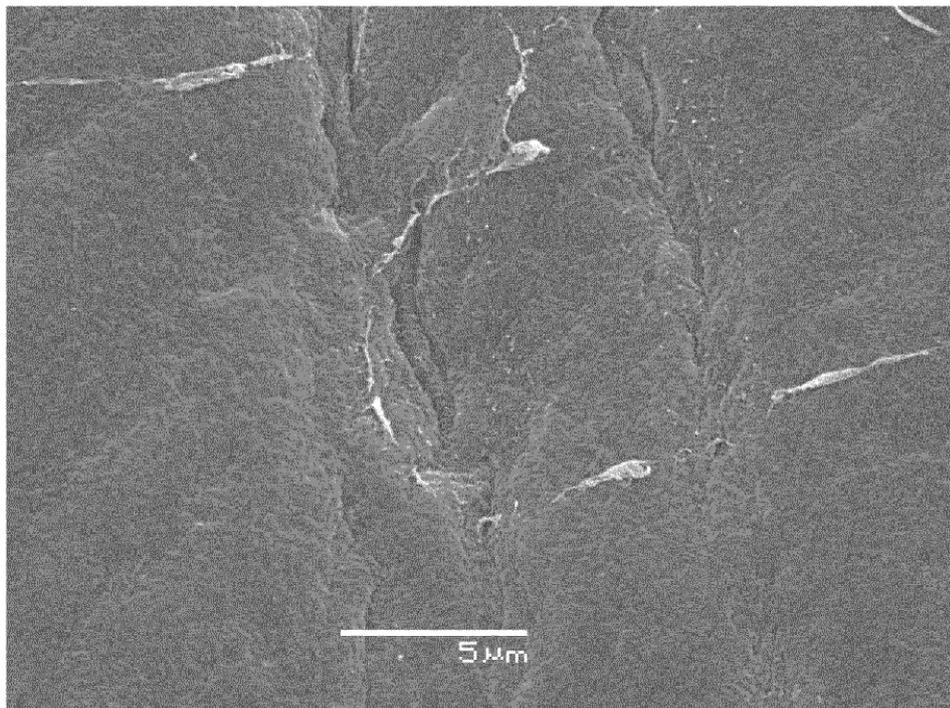
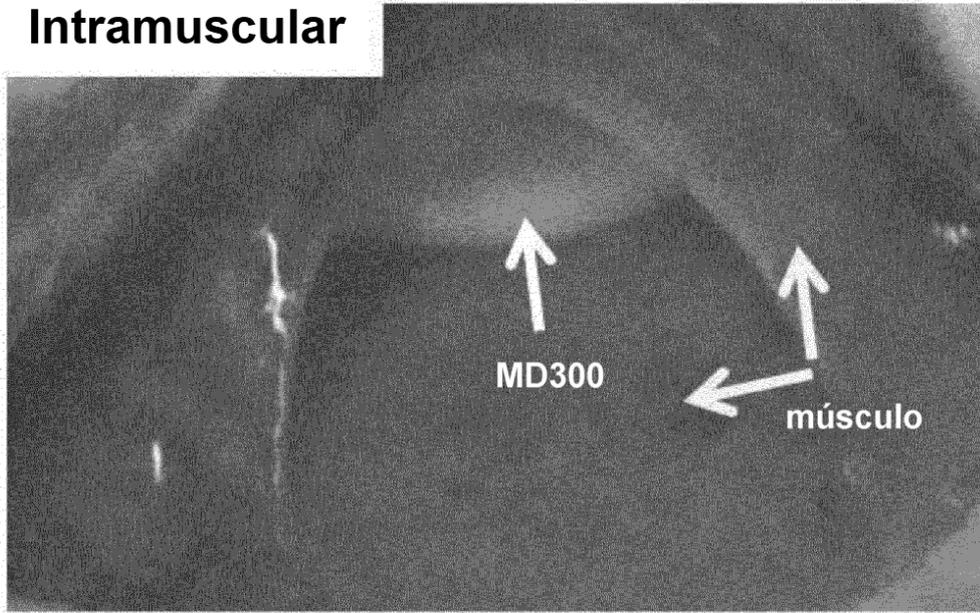


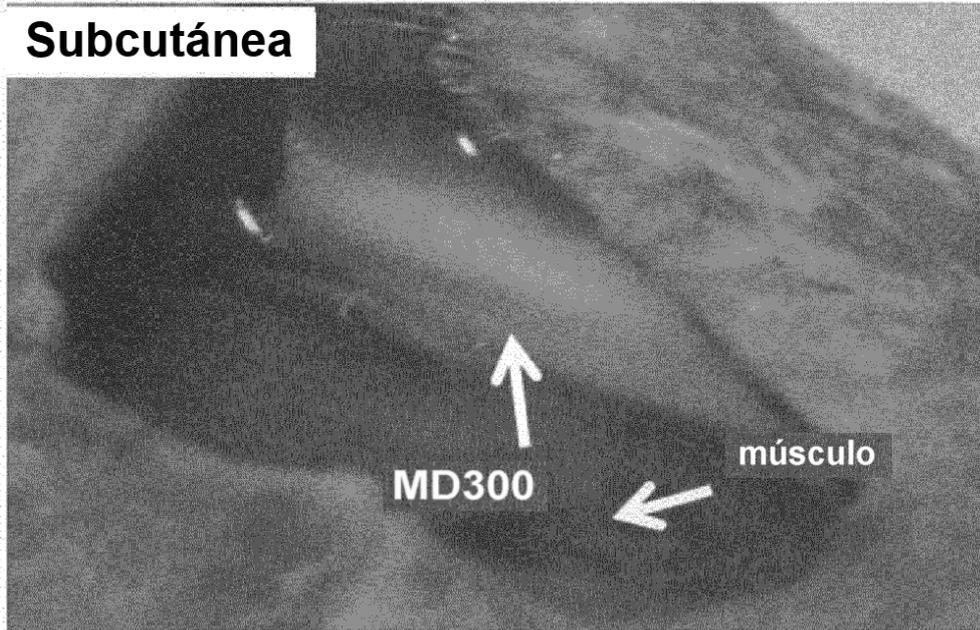
FIGURA 5

A

**Intramuscular**



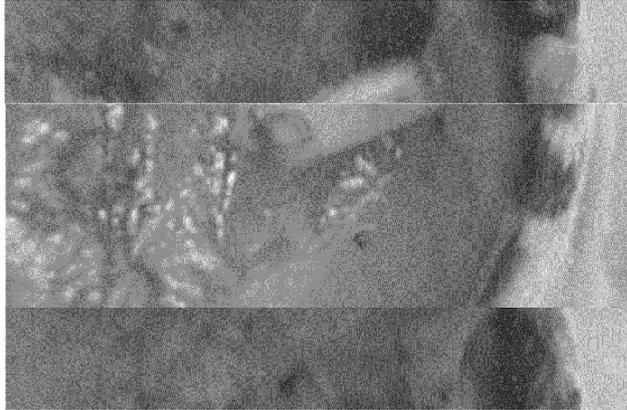
**Subcutánea**



B

**FIGURA 6**

**A**



**B**

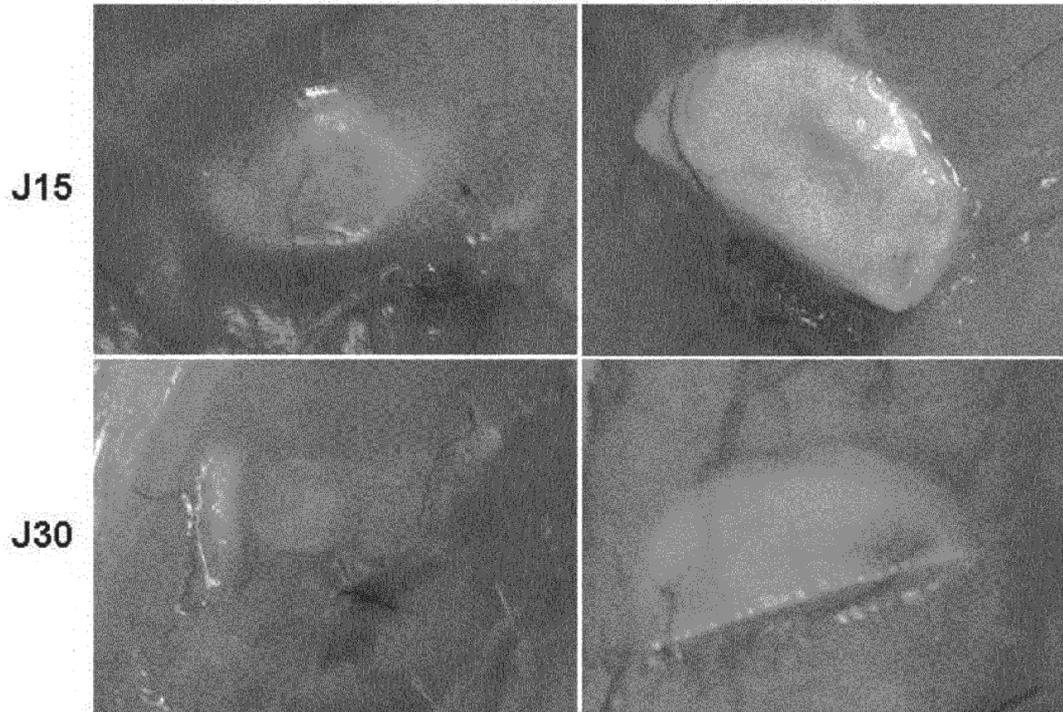


FIGURA 7

MD 300

Intramuscular

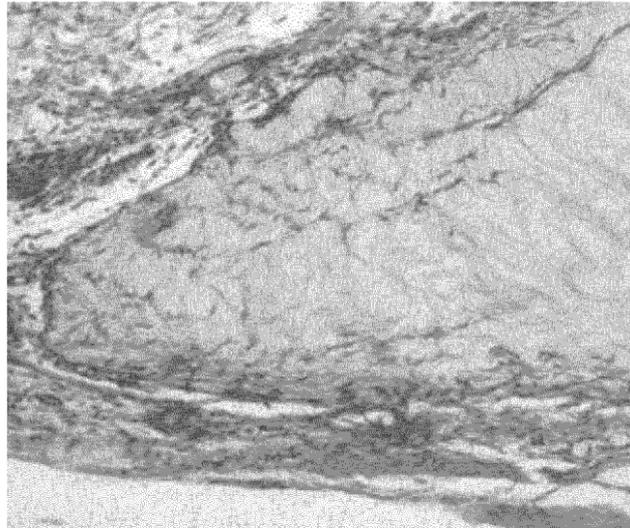
Subcutánea



**FIGURA 8**

**A**

**MD20**



**B**

**MD40**

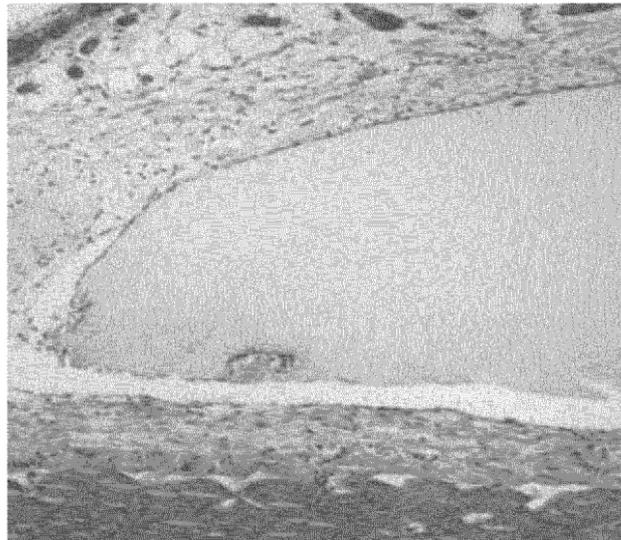


FIGURA 9

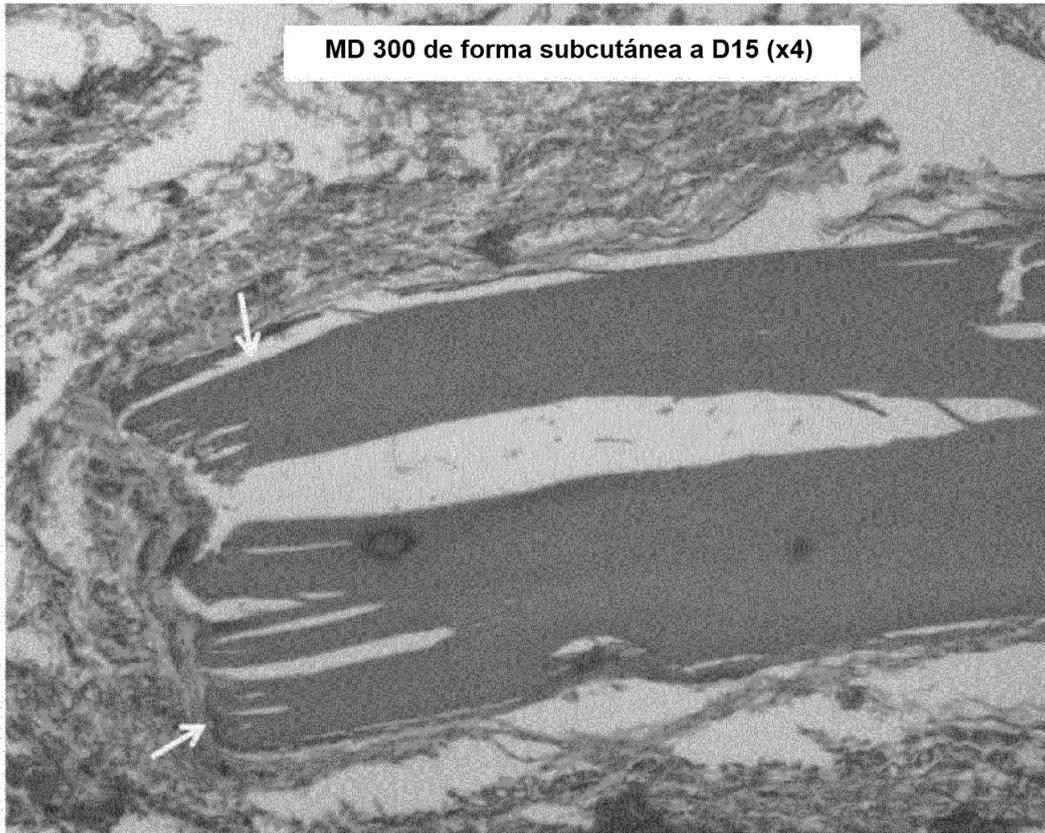


FIGURA 10

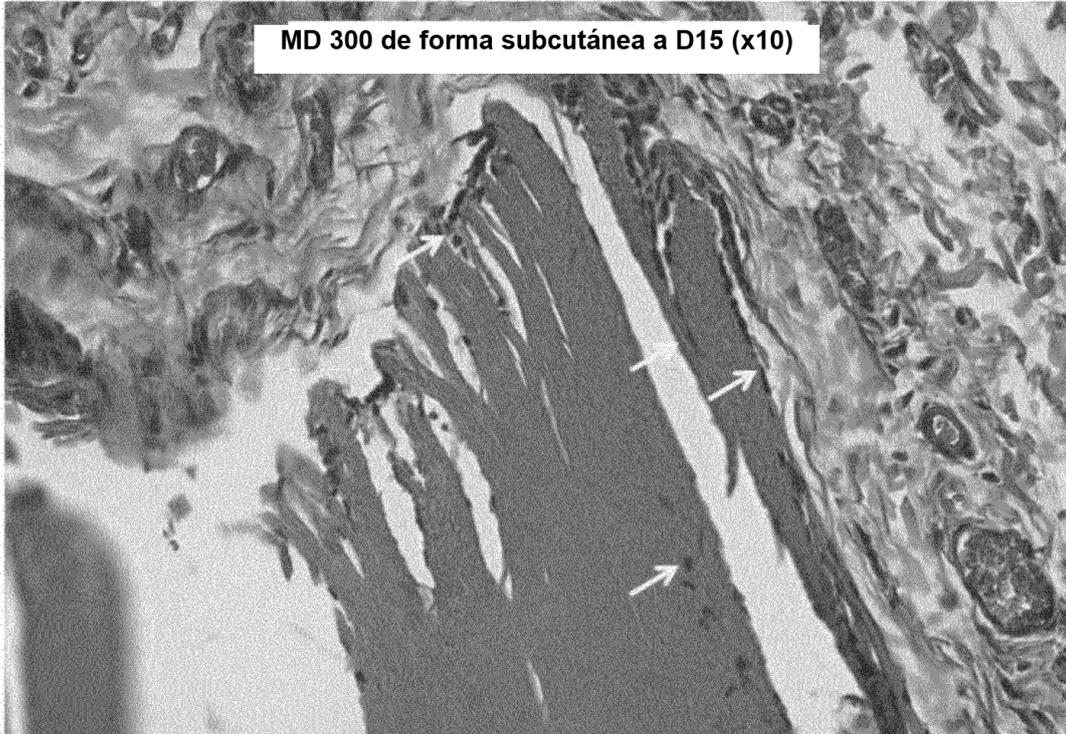


FIGURA 11

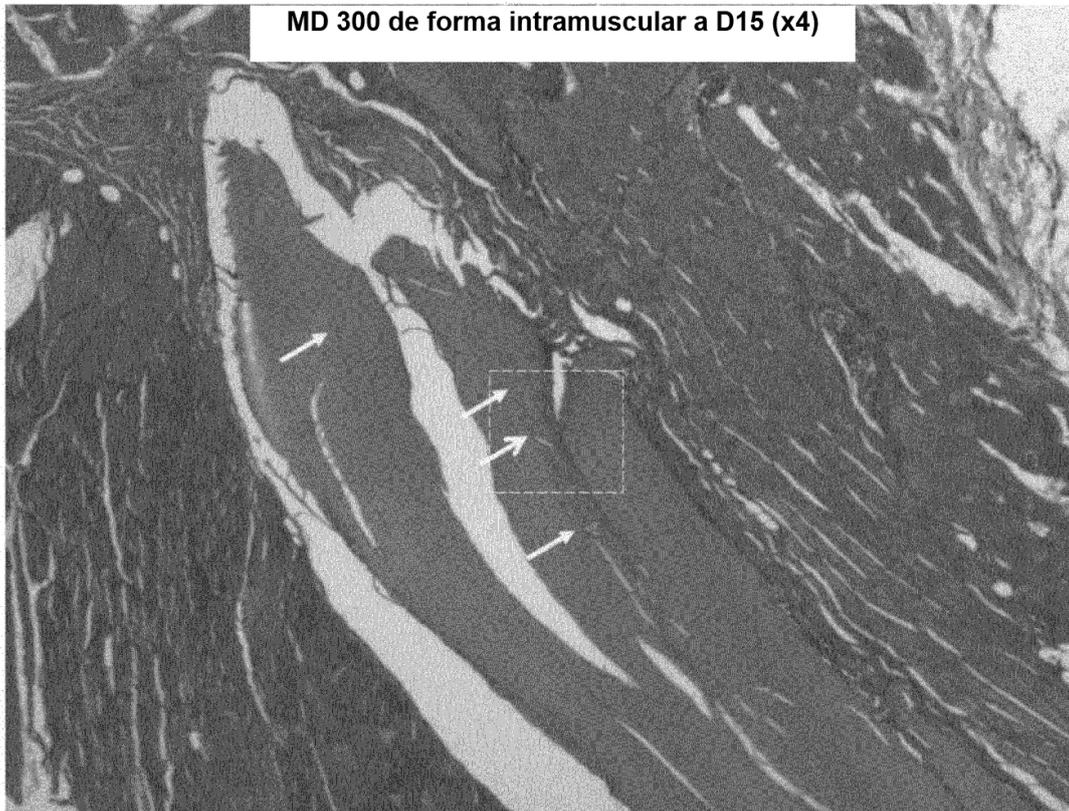


FIGURA 12

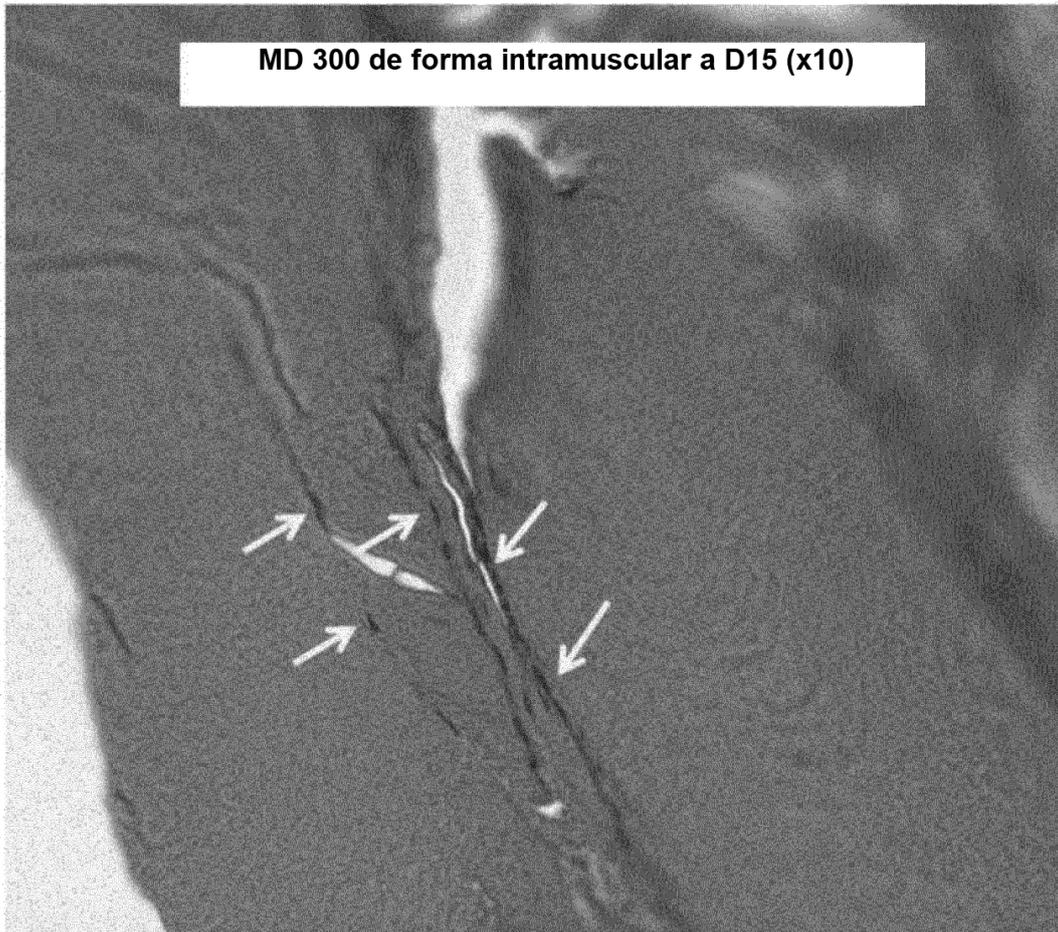


FIGURA 13

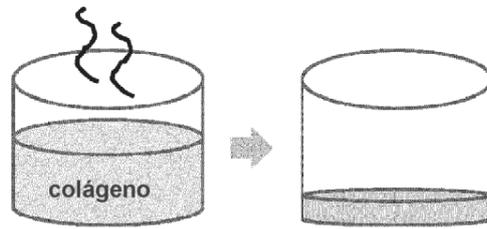


FIGURA 14

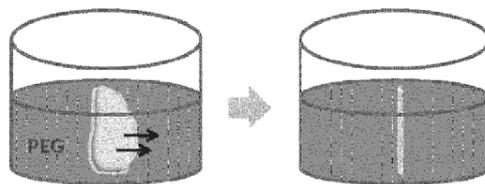


FIGURA 15

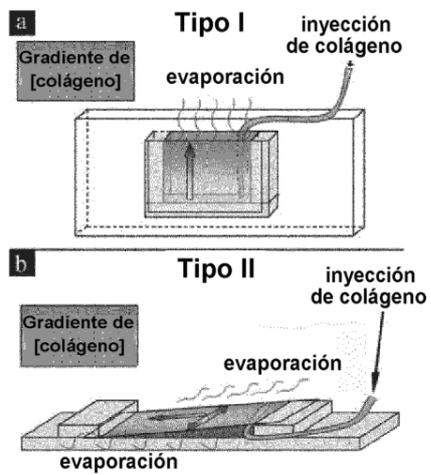


FIGURA 16

