

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 675 230**

51 Int. Cl.:

A61L 27/38 (2006.01)

A61L 27/46 (2006.01)

A61L 27/58 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.12.2016 PCT/EP2016/079622**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.06.2017 WO17093502**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.12.2016 E 16805151 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.05.2018 EP 3233146**

54 Título: **Membrana de forma estable reticulada reabsorbible**

30 Prioridad:

04.12.2015 EP 15198070

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

09.07.2018

73 Titular/es:

**GEISTLICH PHARMA AG (100.0%)
Bahnhofstrasse 40
6110 Wolhusen, CH**

72 Inventor/es:

**STIEFEL, NIKLAUS;
STENZEL, SERGEJ y
KAUFMANN, RAPHAEL**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 675 230 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

Membrana de forma estable reticulada reabsorbible

- 5 La invención se refiere a una nueva membrana de forma estable reticulada reabsorbible para uso en la cavidad bucal, a un proceso para preparar esa membrana y al uso de la misma como implante para soportar formación ósea, regeneración ósea, reparación ósea y/o reemplazo óseo en un sitio de defecto óseo dental sin contención en un ser humano o animal.
- 10 Con el fin de regenerar defectos óseos sin contención mediante formación ósea, tal como por ejemplo en aumentos horizontales o verticales en el maxilar o la mandíbula, se requiere la estabilización mecánica del defecto (Bendkowski 2005 "Space to Grow" *The Dentist*: 3; Merli, Migani et al., 2007 *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* 22 (3): 373-82; Burger 2010 *J. Oral Maxillofac. Surg.* 68 (7): 1656-61; Louis 2010 *Oral Maxillofac. Surg. Clin. North Am.* 22 (3): 353 - 68). De hecho, los tejidos bucales están expuestos a fuerzas mecánicas complejas durante la masticación, la deglución, el movimiento de la lengua, el habla, el movimiento dental y el tratamiento de ortodoncia.
- 15 Especialmente durante la cicatrización de heridas después de procedimientos quirúrgicos, pueden producirse fuerzas internas y externas, creando presión, fuerzas de cizallamiento y momentos de flexión sobre el dispositivo regenerador y el tejido recién formado.
- 20 Una membrana de forma estable que resista esas fuerzas es un medio útil para producir esa estabilización mecánica.
- Es conocido el uso para este fin de mallas de Ti, placas de Ti o membranas de forma estable de PTFE reforzadas con Ti que deben retirarse después de la regeneración ósea durante una segunda cirugía. Un ejemplo de una
- 25 membrana de forma estable reforzada con Ti disponible en el mercado es la membrana Cytoplast® comercializada por Osteogenics. Sin embargo, se notifica que la aparición de dehiscencias u otras complicaciones cuando se usan membranas reforzadas con Ti expandidas es alta (Strietzel 2001 *Mund Kiefer Gesichtschir.* 5(1): 28-32; Merli, Migani et al. 2007 *supra*; Rocchietta, Fontana et al. 2008 *J. Clin. Periodontol.* 35(8 Suppl): 203-15).
- 30 Las membranas de PTFE no reforzadas se usaron ampliamente antes de la introducción de membranas de colágeno reabsorbibles en 1996, pero desaparecieron muy rápidamente después de la introducción de membranas de colágeno.
- Para evitar la necesidad de tener que retirar una membrana de forma estable o mallas en una segunda cirugía, una
- 35 membrana de forma estable reabsorbible resulta ser de interés. Se han descrito varias membranas de forma estable o mallas reabsorbibles, esencialmente hechas de PLA (ácido poli-láctico) o PLGA (ácido poli-láctico-co-glicólico).
- Los ejemplos son particularmente (1) "Sonic Weld RX®" y "Resorb-X®" de KLS Martin, (2) "Guidor®" de Sunstar Americas, (3) el "Inion GTR System™" de Curasan y (4) "RapidSorb®" de Depuy Synthes. La desventaja de esas
- 40 membranas es que durante su degradación hidrolítica *in vivo* liberan ácido láctico y/o glicólico que causa irritación tisular y signos histológicos de una cicatrización de heridas alterada (Coonts, Whitman et al. 1998 *Biomed. Mater. Res.* 42(2): 303-11; Heinze 2004 *Business briefing: Lobar Surgery*: 4; Pilling, Mai et al. 2007 *Br J. Oral Maxillofac. Surg.* 45(6): 447-50).
- 45 Para superar los problemas de cicatrización de heridas relacionados con PLGA/PLA, el uso de bloques óseos autólogos del paciente y bloques óseos parcial o completamente purificados, tales como, por ejemplo, el bloque Geistlich Bio-Oss® (Geistlich Pharma AG) o el bloque de aloinjerto Puros® (RTI Surgical) Inc.), es ampliamente aceptado. Los bloques óseos autólogos tienen la desventaja de que se recogen de un segundo sitio, causando más dolor. (Esposito, Grusovin et al. 2009 *Eur. J Oral Implantol.* 2(3): 167-84)
- 50 Para permitir el uso de astillas óseas autólogas recogidas durante la cirugía, generalmente en combinación con partículas de injerto óseo xenogénico, se desarrolló la denominada técnica de escudo óseo usando hueso cortical autólogo de la mandíbula (Khoury, Hadi et al., 2007, "Bone Augmentation in Oral Implantology", Londres, Quintessence). Las desventajas de este procedimiento son que es extremadamente sensible a la técnica y que está
- 55 asociado con la morbilidad del segundo sitio y más dolor. Además, los escudos óseos se aplican solo lateralmente, por lo tanto, no se proporciona protección mecánica desde la cara coronal del defecto. La expresión "escudo óseo" se usó para anunciar las membranas PLA/PLGA, así como un escudo óseo cortical parcialmente desmineralizado (lámina semiblanda y blanda Osteobiol® de Technoss). Las desventajas de este escudo óseo desmineralizado son que los escudos óseos doblados deben fijarse siempre, que son relativamente gruesos en comparación con, por
- 60 ejemplo, las membranas de PTFE reforzadas con Ti y que solo vienen en formas redondas con bordes curvos en la cara coronal del defecto óseo. Para los dentistas, una meseta de 6 a 8 mm de ancho en la cara coronal de la cresta sería mucho más preferida (Wang and Al-Shammari 2002 *Int. J. Periodontics Restorative Dent.* 22(4): 335-43).
- Un intento de combinar cicatrización sin complicaciones y estabilidad de forma es la membrana de colágeno de
- 65 forma estable reabsorbible descrita en el documento US-8353967-B2, que se prepara a partir de una suspensión de colágeno en un 5-25 % de etanol/agua en un molde mediante liofilización y calentamiento a de 100 a 140 °C. Dicha

membrana es fabricada por Osseous Technologies of America y comercializada con el nombre comercial "Zimmer CurV Preshaped Collagen Membrane" por Zimmer. Esa membrana comercial tiene una estabilidad de forma débil y un grosor de aproximadamente 1,5 mm que aumenta después de la incubación en solución salina hasta aproximadamente 2,3 mm; esto puede causar un riesgo de una alta tasa de dehiscencia.

En resumen, las soluciones actuales no son totalmente satisfactorias para los dentistas o pacientes. O bien es necesaria una segunda cirugía y/o existe un alto riesgo de cicatrización de heridas accidentada. Las soluciones que no están asociadas con un alto riesgo de cicatrización de heridas accidentada no son membranas de forma estable, requieren una segunda cirugía o tienen otras desventajas.

El documento US 2013/0197662 desvela un proceso para fabricar un biomaterial que comprende a) unir un material poroso a base de colágeno con un material no poroso a base de colágeno aplicando una cantidad controlada de un gel que comprende colágeno a una superficie de unión del material no poroso a base de colágeno, y poner en contacto una superficie del material poroso a base de colágeno con el gel aplicado a la superficie de unión para hidratar parcialmente una sección del material poroso en la interfaz entre los materiales; b) secar el gel para unir los materiales entre sí; y c) reticular los colágenos en las capas de unión. El biomaterial fabricado obtenido combina un material poroso a base de colágeno, que puede estar mineralizado [0042], [0048] y un material no poroso a base de colágeno mecánicamente resistente, proporcionando así un armazón para la regeneración de tejidos portadores de carga (especialmente menisco, cartilago articular, tendones y ligamentos), que tiene tanto porosidad como resistencia mecánica, es decir, es capaz de resistir las fuerzas de compresión y de tensión. No se desvela nada sobre la resistencia a los momentos de flexión de ese biomaterial combinado ni sobre la composición del material mineralizado poroso a base de colágeno.

El documento US 2014/0193477 enseña que, en la fabricación de alfombras de colágeno a partir de colágeno soluble, estirar el colágeno antes de su reticulación aumenta su resistencia mecánica, en particular la resistencia máxima a la tracción (UTS), la rigidez y el módulo elástico (módulo de Young) (véase en particular [0109], [0110]).

Langdon, Shari E et al., *Biomaterials* 1998, 20(2), 137-153 CODEN y Chachra, Debbie et al., *Biomaterials* 1996, 17(19), 1865-1875 CODEN, desvelan que estirar una membrana derivada del pericardio antes de su reticulación aumenta su resistencia a la tracción y su rigidez.

Shu-Hua Teng ET AL: "Three-layered membranes of collagen/hidroxiapatite and chitosan for guided bone regeneration", *JOURNAL OF BIOMEDICAL MATERIALS RESEARCH. PART B: APPLIED BIOMATERIALS*, vol. 87B, no. 1, 1 de octubre de 2008 (01-10-2008), páginas 132-138, desvelan una membrana de estructura en sándwich de tres capas reabsorbible que comprende una capa superior y una inferior de material compuesto que comprende hidroxiapatita y colágeno y una capa media hecha de quitosana. Dicha membrana se usa para guiar la regeneración ósea. El objetivo de la presente invención es proporcionar una membrana de forma estable reabsorbible para uso en la cavidad bucal, apta para resistir presión, fuerzas de cizallamiento y momentos de flexión tal como para soportar formación ósea, regeneración ósea, reparación ósea y/o reemplazo óseo en un sitio de defecto óseo sin contención, notablemente en aumentos horizontales o verticales en el maxilar o la mandíbula, que no presente los inconvenientes anteriores.

El objetivo es conseguido por la invención como se define en las reivindicaciones adjuntas.

La invención proporciona una membrana de forma estable reticulada reabsorbible para uso en la cavidad bucal que comprende una capa compuesta de material de colágeno y partículas de cerámica inorgánica que contiene de 1,5 a 3,5 partes en peso de cerámica inorgánica para 1 parte en peso de material de colágeno, intercalada entre dos capas de material de colágeno pretensado elástico, comprendiendo el material de colágeno el 50-100 % (p/p) de colágeno y el 0-50 % (p/p) de elastina.

La expresión "material de colágeno" en este contexto significa un material a base de colágeno que comprende el 50-100 % (p/p) de colágeno y el 0-50 % (p/p) de elastina. El contenido de elastina se mide en este contexto mediante determinación de desmosina/isodesmosina de acuerdo con una modificación de un método conocido que implica hidrólisis y RP-HPLC (véase, por ejemplo, Guida E. *et al.* 1990 *Development and validation of a high performance chromatography method for the determination of desmosines in tissues* en *Journal of Chromatography* o Rodriguq P 2008 *Quantification of Mouse Lung Elastin During Prenatal Development* en *The Open Respiratory Medicine Journal*). Para determinar el contenido de desmosina/isodesmosina de elastina seca, la elastina del material de colágeno se somete a procedimientos de aislamiento de elastina según lo descrito por Starcher y Galione en 1976 (*Purification and Comparison of Elastin from Different Animal Species* en *Analytical Biochemistry*).

Ese material de colágeno procede adecuadamente de tejidos de origen natural que contienen dichas proporciones de colágeno y elastina. Los ejemplos de dichos tejidos incluyen, membrana peritoneal o pericárdica, membrana placentaria, submucosa del intestino delgado (SIS), dermis, duramadre, ligamentos, tendones, diafragma (Diafragma torácico), epiplón, fascias de músculos u órganos de vertebrados, en particular mamíferos (por ejemplo porcinos, bovinos, equinos, ovinos, caprinos, de conejo). Dichos tejidos son preferentemente porcinos, bovinos o equinos. Un tejido interesante es una membrana peritoneal porcina, bovina o equina.

Habitualmente, el colágeno es principalmente colágeno de tipo I, colágeno de tipo III o una mezcla de los mismos. El colágeno también puede incluir una proporción notablemente de colágeno de tipo II, de tipo IV, de tipo VI o de tipo VIII o cualquier combinación de estos o cualquier tipo de colágeno.

5 Preferentemente el material de colágeno contiene el 70-90 % (p/p) de colágeno y el 30-10 % (p/p) de elastina.

Un ejemplo de un material de partida adecuado para preparar dicho material de colágeno es una membrana de colágeno de peritoneo o pericardio porcino, bovino o equino preparada mediante un proceso similar al descrito en el "Ejemplo" del documento EP-B1-1676592, o la membrana Geistlich Bio-Gide® (obtenible de Geistlich Pharma AG, Suiza) preparado a partir del peritoneo porcino mediante dicho proceso.

Preferentemente, el material de colágeno procede de una membrana peritoneal o pericárdica, mucosa del intestino delgado (SIS) o fascias musculares porcinas, bovinas o equinas.

15 El material de colágeno es, general y preferentemente, material de colágeno fibroso, con una estructura de fibra natural o como fibras de colágeno cortadas.

Sin embargo, material de colágeno no fibroso, tal como fibrillas reconstituidas aproximadamente colágeno molecular o fragmentos de colágeno reticulados que tiene suficiente biocompatibilidad y reabsorbabilidad, también pueden usarse en la capa compuesta de material de colágeno y partículas de cerámica inorgánica, o en las capas de material de colágeno pretensado elástico, siempre que ese material de colágeno posea suficiente estabilidad mecánica en términos de módulo elástico así como resistencia máxima a la tracción (véase a continuación).

25 El término "reabsorbible" en este contexto significa que la membrana de forma estable reticulada es capaz de ser reabsorbida *in vivo* notablemente a través de la acción de colagenasas y elastasas. Una reabsorbabilidad *in vivo* controlada de la membrana de forma estable reticulada es esencial para la cicatrización sin excesiva inflamación o dehiscencia. El ensayo de degradación enzimática usando colagenasa de *Clostridium histolicum* descrito en detalle a continuación (ejemplo 4, 3) proporciona una excelente predicción de la reabsorbabilidad *in vivo*.

30 Todos los prototipos ensayados de la membrana de forma estable reticulada reabsorbible de la invención ensayada mostraron al menos un 10 % de degradación de colágeno (según lo evaluado mediante el ensayo DC Protein usando colágeno de tipo I como estándar) después de 4 horas, siendo la tasa de degradación de colágeno (menor que para la membrana Geistlich Bio-Gide®) dependiente de las condiciones de reticulación usadas.

35 El término "reticulado/a" significa que la membrana de forma estable reabsorbible ha sido sometida a al menos una etapa de reticulación, habitualmente reticulación química (usando por ejemplo EDC y NHS) o reticulación mediante tratamiento deshidrotérmico (DHT), realizándose esa etapa en la capa compuesta ensamblada de material de colágeno y partículas de cerámica inorgánica intercalada entre dos capas de material de colágeno pretensado elástico habitual mediante reticulación química (usando por ejemplo EDC y NHS) o mediante tratamiento deshidrotérmico (DHT). Opcionalmente la capa compuesta de material de colágeno y partículas de cerámica inorgánica se ha reticulado antes de su ensamblaje en la membrana de la invención, habitual mediante reticulación química o mediante tratamiento deshidrotérmico (DHT).

45 La expresión "membrana de forma estable para uso en la cavidad bucal" significa que la membrana reticulada reabsorbible es capaz de soportar formación ósea, regeneración ósea, reparación ósea y/o reemplazo óseo en un sitio de defecto óseo dental sin contención en un ser humano o animal proporcionando una estabilización mecánica del defecto, es decir resistencia a la presión, fuerzas de cizallamiento y momentos de flexión que se producen en la cavidad bucal. La estabilidad de forma de la membrana de la invención se evalúa mediante un ensayo de flexión uniaxial de 3 puntos descrito en detalle a continuación (en el ejemplo 4 2): ese ensayo es similar a los métodos expuestos en las normas EN ISO 178 y ASTM D6272-10, estando la membrana de la invención sumergida en PBS a un pH de 7,4 y una temperatura de 37 °C. Ese ensayo mostró que la membrana de la invención proporciona una estabilización sustancialmente más fuerte que la membrana de PLA de la competencia Resorb-X® (KLS Martin).

55 En general, en ese ensayo de flexión uniaxial de 3 puntos, la membrana de forma estable reticulada reabsorbible resiste a una fuerza de al menos 0,20 N, preferentemente al menos 0,30 N, para una deformación de 8 mm.

La expresión "capas de material de colágeno pretensado elástico" significa que, antes de su reticulación, las capas de material de colágeno han sido sometidas a un tensionado que causa un alargamiento o estiramiento del tamaño inicial de las capas de material de colágeno desde la región basal a la región lineal (también llamada elástica) de la curva de esfuerzo-deformación (véase Blayne A. Roder et al., 2002, Journal of Biomechanical Engineering, 124, 214-222, en particular figura 3, página 216, o la figura 5 de la presente solicitud). Dentro de esta región lineal, el módulo elástico es el más alto y, por lo tanto, puede conseguirse la rigidez más alta. Ese tensionado puede realizarse radialmente sobre los trozos de material de colágeno, por ejemplo mediante resortes. Las fuerzas a aplicar para que dicho tensionado cause un alargamiento o estiramiento del material de colágeno en la región lineal de la curva de esfuerzo-deformación dependen del material de colágeno. Cuando el material de colágeno procede de una membrana peritoneal porcina, bovina o equina, el tensionado que conduce a la región lineal de la curva de

esfuerzo-deformación del material de colágeno puede realizarse radialmente sobre los trozos de material de colágeno, mediante resortes tensionados entre 1 y 3 N, causando un alargamiento o estiramiento del 40 al 100 % del tamaño inicial de las capas de material de colágeno.

5 La expresión "material de colágeno pretensado elástico" significa, de este modo, material de colágeno que ha sido estirado para estar en la región lineal/elástica de la curva de esfuerzo-deformación.

10 El módulo elástico (también llamado módulo de Young), es decir la pendiente de la región lineal de la curva de esfuerzo-deformación expresado en MPa, del material de colágeno pretensado elástico es generalmente de 1 a 1000 MPa, preferentemente de 2 a 150 MPa, en particular de 5 a 80 MPa.

15 La presencia de esas dos capas de "material de colágeno pretensado elástico" que encierran a la capa compuesta de material de colágeno y partículas de cerámica inorgánica parece ser necesaria para impedir que la capa compuesta se rompa cuando la membrana se somete a fuerzas de tracción, de compresión, de cizallamiento y momentos de flexión.

20 Preferentemente, una de las capas de material de colágeno pretensado elástico incluye orificios de 5 a 500 μm . Cuando la membrana está en su lugar esa capa perforada de material de colágeno pretensado elástico estará orientada hacia el defecto óseo, permitiendo los orificios una invasión fácil por las células formadoras de hueso en el material compuesto de cerámica inorgánica-colágeno.

La cerámica inorgánica es un material biocompatible que promueve la regeneración ósea tal como hidroxiapatita o un mineral óseo natural.

25 Un mineral óseo natural bien conocido que promueve el crecimiento óseo en defectos óseos dentales, periodontales y maxilofaciales es Geistlich Bio-Oss®, disponible en el mercado de Geistlich Pharma AG. Ese material mineral óseo a base de hidroxiapatita se fabrica a partir de hueso natural mediante un proceso descrito en la patente de Estados Unidos No. 5.167.961, que permite la conservación de la arquitectura trabecular y la estructura nanocristalina del hueso natural.

30 Preferentemente, la cerámica inorgánica es un mineral óseo natural a base de hidroxiapatita, tal como por ejemplo Geistlich Bio-Oss®.

35 Las partículas de cerámica inorgánica tienen generalmente un tamaño de 50 a 600 μm , preferentemente de 150 a 500 μm , en particular de 250 a 400 μm .

40 El material compuesto de material de colágeno y partículas de cerámica inorgánica contiene de 1,5 a 3,5 partes en peso, preferentemente de 2,0 a 3,0 partes en peso de cerámica inorgánica para 1 parte en peso de material de colágeno.

45 De hecho, se ha descubierto inesperadamente que por debajo de 1,5 partes en peso de cerámica inorgánica para 1 parte en peso de material de colágeno o por encima de 3,5 partes en peso de cerámica inorgánica para 1 parte en peso de material de colágeno, la membrana no es "de forma estable" como se ha definido anteriormente y evaluado mediante el ensayo de flexión uniaxial de 3 puntos descrito en detalle a continuación (en el ejemplo 4.2). La estabilidad de forma es especialmente alta cuando el material compuesto de material de colágeno y partículas de cerámica inorgánica contiene de 2,0 a 3,0 partes en peso de cerámica inorgánica para 1 parte en peso de material de colágeno.

50 La membrana de forma estable reticulada reabsorbible de la invención es hidrófila, siendo generalmente completamente humedecida por PBS en de 5 a 10 minutos.

55 La membrana de forma estable reticulada reabsorbible de la invención tiene propiedades de adherencia celular similares a las de Geistlich Bio-Gide®, que es bien conocida por sus buenas propiedades de cicatrización con una baja tasa de dehiscencia o inflamación excesiva. Esto es indicativo de buenas propiedades de cicatrización sin acontecimientos adversos tales como dehiscencia o inflamación excesiva.

Dichas buenas propiedades de cicatrización se han observado cuando la implanta la membrana de forma estable reticulada de la invención para proteger defectos óseos creados en el cráneo de conejos.

60 El grosor de la membrana de forma estable reticulada reabsorbible de la invención es habitualmente de 0,5 a 2,5 mm, preferentemente de 1,0 a 2,0 mm, en particular de 1,2 a 1,8 mm.

65 Las formas típicas y las dimensiones típicas de la membrana de forma estable reticulada reabsorbible de la invención se representan en la figura 1.

La invención también se refiere a la de forma estable reticulada reabsorbible para uso como un implante para soportar formación ósea, regeneración ósea, reparación ósea y/o reemplazo óseo en un sitio de defecto óseo dental sin contención en un ser humano o animal.

5 La invención también se refiere a un proceso para preparar la membrana de forma estable reticulada reabsorbible definida anteriormente, que comprende una capa compuesta de material de colágeno y partículas de cerámica inorgánica intercalada entre dos capas de material de colágeno pretensado elástico, que comprende las etapas de:

10 (a) Preparar una capa compuesta de material de colágeno y partículas de cerámica inorgánica, opcionalmente reticular esa capa compuesta,

(b) Ensamblar y encolar la capa compuesta de material de colágeno y partículas de cerámica inorgánica entre dos capas de material de colágeno sometidas a tensionado que causa un estiramiento del material de colágeno en la región lineal de la curva de esfuerzo-deformación, dando de este modo una capa compuesta de material de colágeno y partículas de cerámica inorgánica intercalada entre dos capas de material de colágeno pretensado elástico, y

15 (c) Reticular esa capa compuesta de material de colágeno y partículas de cerámica inorgánica intercalada entre dos capas de material de colágeno pretensado elástico, seguido por un tratamiento de fabricación hidrófilo.

La etapa (a) puede realizarse:

20 - Produciendo, como partículas de cerámica inorgánica, partículas de mineral óseo de hidroxiapatita a partir de hueso cortical o esponjoso mediante un proceso similar al descrito en el documento US-A-5417975 o, como alternativa, triturando gránulos pequeños de Geistlich Bio-Oss (disponibles de Geistlich Pharma AG) en partículas más pequeñas, y sometiendo a esas partículas a un tamizado en el intervalo deseado (por ejemplo de 25 150 a 500 μm o de 250 a 400 μm), dando de este modo partículas de mineral óseo de hidroxiapatita tamizadas.

- Preparando material de colágeno fibroso

30 \circ sometiendo tejido rico en colágeno de peritoneo o pericardio porcino, bovino o equino a un proceso similar al descrito en el ejemplo del documento EP-B1-1676592, o como alternativa comenzando a partir de la membrana Geistlich Bio-Gide (disponible de Geistlich Pharma AG) obtenida de peritoneo porcino mediante dicho proceso o a partir del producto intermedio obtenido antes de la esterilización en la producción industrial de la membrana Geistlich Bio-Gide, llamado la membrana Geistlich Bio-Gide no estéril,

35 \circ cortando (por ejemplo con tijeras) trozos del tejido fibroso de colágeno obtenido de este modo, mezclar esos trozos de tejidos fibrosos de colágeno cortados con hielo seco usando un molino de cuchillas, dando de este modo fibras de colágeno cortadas,

\circ cortando trozos de tejidos fibrosos de colágeno con un molino cortante con un tamiz, dando de este modo una fracción tamizada de fragmentos de fibra de colágeno.

40 - Preparando una capa compuesta de material de colágeno fibroso y partículas de mineral óseo de hidroxiapatita

\circ mezclando y agitando en solución salina tamponada con fosfato PBS, del 0 al 40 % en peso de las fibras de colágeno cortadas y del 60 al 100 % en peso de la fracción tamizada de fragmentos de fibras de colágeno obtenidas anteriormente,

45 \circ añadiendo de 1,5 a 3,5 partes en peso, en particular de 2,0 a 3,0 partes en peso, de las partículas de mineral óseo de hidroxiapatita tamizadas obtenidas anteriormente a 1 parte en peso del colágeno fibroso obtenido en el párrafo anterior, centrifugando a de 2000 a 6000 x g, preferentemente de 3000 a 5000 x g, vertiendo el sedimento obtenido en un molde rectangular y formando una placa usando una espátula. La capa compuesta de material de colágeno fibroso y partículas de mineral óseo de hidroxiapatita obtenida se seca en un horno de vacío.

50 Reticular la capa compuesta seca de material de colágeno y partículas de cerámica inorgánica al final de (a) no es necesario pero tiene la ventaja de que facilita la manipulación de esa capa compuesta durante la etapa (b).

55 Esa reticulación puede realizarse usando productos químicos o mediante tratamiento deshidrotérmico (DHT).

La reticulación con productos químicos puede realizarse usando cualquier agente de reticulación farmacéuticamente aceptable capaz de dar a la membrana de forma estable reticulada la resistencia mecánica requerida. Agentes de reticulación de ese tipo adecuados incluyen glutaraldehído, glioxal, formaldehído, acetaldehído, 1,4-butano diglicidil éter (BDDGE), hexanoato de N-sulfosuccinimidil-6-(4'-azido-2'-nitrofenilamino), hexametilendiisocianato (HMDC), 60 cinamida, difenilfosforilazida, genipina, EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida) y una mezcla de EDC y NHS (N-hidroxisuccinimida).

La reticulación usando productos químicos se realiza convenientemente usando una mezcla de EDC y NHS.

65

En ese caso, la capa compuesta seca de material de colágeno fibroso y partículas de mineral óseo de hidroxiapatita obtenida anteriormente puede reticularse en EDC 10-400 mM y NHS 13-520 mM en una solución de MES (ácido 2-(N-morfolino)-etanosulfónico) 0,1 M y etanol al 40 % a pH 5,5 durante de 1 a 3 horas a temperatura ambiente. La reacción se detiene a continuación incubando los prototipos dos veces en tampón Na₂HPO₄ 0,1 M. Los residuos polares pueden retirarse incubando los prototipos durante 1 hora en una solución de cloruro sódico 1 M y dos veces durante una hora en una solución de cloruro sódico 2 M. Los prototipos reticulados químicamente pueden lavarse un total de 8 veces durante 30 - 60 minutos en agua destilada. El secado puede realizarse a continuación llevando a cabo inmersión en etanol durante 15 minutos un total de 5 veces, seguido por tres veces tratamiento con dietiléter durante 5 minutos y posterior secado a 10 mbares y 40 °C durante una noche, o mediante liofilización (congelación por debajo de -5 °C y secado mediante tratamiento de liofilización convencional).

Como alternativa, la reticulación se realizó mediante tratamiento deshidrotérmico (DHT) a 0,1 - 10 mbares y 80 - 160 °C durante 1-4 días. En este caso no es necesario ningún método de secado posterior.

La etapa (b) puede realizarse:

- Preparando una cola de fibras de colágeno

- mezclando la fracción tamizada anterior de fragmentos de colágeno en una solución acuosa de H₃PO₄ de pH 3,5 a una concentración del 3 % usando un homogeneizador a alta presión a 1500-2000 bares, repitiéndose esa mezcla varias veces,

- neutralizando la suspensión espesa resultante a pH 7,0 añadiendo una solución de hidróxido sódico, concentrando mediante liofilización el colágeno y homogeneizando este último moliendo en molino de cuchillas,

- preparando la cola de fibras de colágeno a partir de la suspensión espesa obtenida como una solución al 2-10 % en solución salina tamponada con fosfato PBS de pH 7,4 calentando a 60 °C hasta que ya no había más partículas visibles, y

- Usando por ejemplo un equipo similar al de la figura 2, sometiendo dos capas prehumedecidas de material de colágeno a tensionado que causa un estiramiento del material de colágeno en la región lineal de la curva de esfuerzo-deformación, dando de este modo dos capas de material de colágeno pretensado elástico húmedo, insertando la capa compuesta de material de colágeno y partículas de cerámica inorgánica obtenida en (a) embebida con la cola de fibras de colágeno anterior entre las dos capas anteriores de material de colágeno pretensado elástico húmedo,

- usando por ejemplo un equipo similar al de la figura 3, prensando esas dos capas de material de colágeno pretensado elástico húmedo contra esa capa compuesta de material de colágeno y partículas de cerámica inorgánica embebida con la cola de fibras de colágeno, y

- secando la capa compuesta de material de colágeno y partículas de cerámica inorgánica intercalada entre dos capas de material de colágeno pretensado elástico húmedo a una temperatura de 35 a 45 °C a presión reducida (por ejemplo, de 20 a 1 mbar).

En el procedimiento descrito anteriormente, una de las capas prehumedecidas de material de colágeno puede haber sido sometida a una perforación con agujas para incluir orificios de 5 a 500 μm.

En la etapa (c), reticular esa capa compuesta de material de colágeno y partículas de cerámica inorgánica intercalada entre dos capas de material de colágeno pretensado elástico, puede realizarse usando productos químicos (usando por ejemplo EDC y NHS) o mediante tratamiento deshidrotérmico DHT.

La reticulación química puede realizarse usando cualquier agente de reticulación farmacéuticamente aceptable capaz de dar a la membrana de forma estable reticulada la resistencia mecánica requerida. Agentes de reticulación de ese tipo adecuados incluyen glutaraldehído, glioxal, formaldehído, acetaldehído, 1,4-butano diglicidil éter (BDDGE), hexanoato de N-sulfosuccinimidil-6-(4'-azido-2'-nitrofenilamino), hexametilendiisocianato (HMDC), cinamida, difenilfosforilazida, genipina, EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida) y una mezcla de EDC y NHS (N-hidroxisuccinimida).

La reticulación usando productos químicos se realiza convenientemente usando una mezcla de EDC y NHS.

En ese caso, la capa compuesta seca de material de colágeno fibroso y partículas de mineral óseo de hidroxiapatita obtenida anteriormente puede reticularse en EDC 10-400 mM y NHS 13-520 mM en una solución de MES (ácido 2-(N-morfolino)-etanosulfónico) 0,1 M y etanol al 40 % a pH 5,5 durante de 1 a 3 horas a temperatura ambiente. La reacción se detiene a continuación incubando los prototipos dos veces en tampón Na₂HPO₄ 0,1 M a pH 9,5 durante de 1 a 3 horas. Los residuos polares pueden retirarse incubando los prototipos durante 1 hora en una solución de cloruro sódico 1 M y dos veces durante una hora en una solución de cloruro sódico 2 M. Los prototipos reticulados químicamente pueden lavarse un total de 8 veces durante 30 - 60 minutos en agua destilada. La deshidratación y el secado pueden realizarse a continuación mediante inmersión en etanol durante 15 min un total de 5 veces seguida por llevar a cabo tres veces tratamiento con dietiléter durante 5 minutos y posterior secado a 10 mbares y 40 °C

durante 30 minutos, o mediante liofilización (congelación por debajo de -10 °C y secado mediante tratamiento de liofilización convencional) sin tratamiento con disolvente.

5 Como alternativa, la reticulación se realizó mediante tratamiento deshidrotérmico (DHT) a 0,1-10 mbares y 80 - 160 °C durante 1-4 días. En este caso no es necesario ningún método de secado posterior.

10 El tratamiento de fabricación hidrófilo de la etapa c) generalmente comprende sumergir la capa compuesta reticulada de material de colágeno y partículas de cerámica inorgánica intercalada entre dos capas de material de colágeno pretensado elástico hidrófilo en una solución de sal fisiológicamente aceptable tal como una solución de cloruro sódico, preferentemente una solución de cloruro sódico a 100-300 g/l, en particular a 150-250 g/l.

15 Preferentemente, el tratamiento de fabricación hidrófilo comprende sumergir la capa compuesta reticulada de material de colágeno y partículas de cerámica inorgánica intercalada entre dos capas de material de colágeno pretensado elástico hidrófilo en una solución de cloruro sódico.

La membrana de forma estable reticulada reabsorbible de la invención puede esterilizarse mediante irradiación con rayos X, rayos beta o gamma.

20 Breve descripción de los dibujos

La invención se describirá con más detalle en lo sucesivo con referencia a ejemplos ilustrativos de realizaciones preferidas de la invención y las figuras de dibujos adjuntas, en las que:

25 La figura 1 representa formas típicas y dimensiones típicas de membranas de forma estable reticuladas reabsorbibles de acuerdo con la invención. Esas membranas pueden ser planas (1), (1'), rectas en forma de U (2), (2') o curvas en forma de U (3), (3') correspondiendo a los espacios alveolares de 1 a 3 dientes (incisivos, caninos, premolares o molares) situados en la parte frontal, en la curvatura lateral izquierda o lateral derecha o en la parte posterior de la dentadura.

30 El tamaño de los productos anteriores es similar al de los productos posteriores, siendo el radio de curvatura para adaptarse a la cresta alveolar. Dimensiones típicas son a = 5-20mm, b = 8-20 mm, c = 6-10 mm, d = 25-40 mm, e = 15 mm, f = 20-40 mm.

La figura 2 es una vista esquemática de equipo adecuado para permitir el tensionado de las capas poliméricas antes de su ensamblaje en una membrana de forma estable plana o en forma de U de la invención.

35 La figura 3 representa el ensamblaje de una membrana de forma estable plana, en el que (1) es una placa de acero, (2) es una esponja de poliuretano comprimida, (3) es una red de poliamida, (4) es una capa de colágeno pretensado elástico and (5) es una placa de hidroxapatita-colágeno reticulada.

La figura 4 representa la variación de la fuerza en función de la deformación en un ensayo de análisis de flexión de 3 puntos para la membrana de forma estable reabsorbible de la invención reticulada mediante EDC/NHS o DHT en comparación con la membrana de PLA Resorb-X® (KLS Martin).

40 La figura 5 representa las curvas de esfuerzo-deformación de unos cuantos materiales de colágeno húmedos y estériles disponibles en el mercado que podrían usarse en las capas de material de colágeno pretensado elástico de las membranas de forma estable reticuladas reabsorbibles de acuerdo con la invención, concretamente la membrana de colágeno Geistlich Bio-Gide® derivada de peritoneo porcino (Geistlich Pharma AG), la membrana de colágeno Jason® derivada de pericardio porcino (aap Biomaterials/Botiss) y la membrana de colágeno Dynamatrix® derivada de SIS porcina (Cook Biotech Inc.), y un material de colágeno derivado de fascias musculares. En cada una de esas curvas de esfuerzo, hay una región basal caracterizada por grandes deformaciones tras valores mínimos de esfuerzo, una región lineal o elástica caracterizada por un aumento lineal de deformación por unidad de esfuerzo y una región de fallo caracterizada por la rotura de las fibras poliméricas. En las curvas de esfuerzo-deformación representadas en esta figura, el módulo elástico (o módulo de Young, es decir la pendiente de la región lineal de la curva de esfuerzo-deformación) es de aproximadamente 8 MPa para la membrana Geistlich Bio-Gide®, aproximadamente 64 MPa para la membrana Jason, aproximadamente 54 MPa para la membrana Dynamatrix® y aproximadamente 56 MPa para el material de colágeno derivado de fascias musculares.

45 La figura 6 es un diagrama de barras del % de fibroblastos gingivales humanos que se han adherido a la membrana después de incubación durante 24 horas en PBS a 37 °C para la membrana de colágeno Geistlich Bio-Gide®, un prototipo de la membrana de forma estable reabsorbible de la invención reticulada mediante DHT (FRM) y la membrana de PTFE Cystoplast® (Keystone Dental).

60 Los siguientes ejemplos ilustran la invención sin limitar su alcance.

Ejemplo 1 Preparación de las materias primas

Preparación de partículas finas de hidroxiapatita que tienen un tamaño de 250 a 400 µm (A)

Se produjeron partículas finas de mineral óseo de hidroxiapatita a partir de hueso cortical o esponjoso como se describe en los ejemplos 1 a 4 del documento US-A-5417975, usando una etapa de tamizado adicional entre 250 y 400 µm.

Como alternativa, se produjeron partículas finas de mineral óseo de hidroxiapatita triturando gránulos pequeños de Geistlich Bio-Oss® (disponibles de Geistlich Pharma AG, CH-6110, Suiza) impactando cuidadosamente usando una pistola y una etapa de tamizado adicional entre 250 y 400 µm.

Las partículas finas de mineral óseo de hidroxiapatita que tienen un tamaño de 250 a 400 µm preparadas anteriormente (A) se almacenaron en frascos de vidrio hasta el uso.

Preparación de fibras de colágeno (B)

Como se describe en el "Ejemplo" del documento EP-B1-1676592, membranas peritoneales de cerdos jóvenes se liberaron completamente de carne y grasa por medios mecánicos, se lavaron con agua corriente y se trataron con una solución de NaOH al 2 % durante 12 horas. Las membranas se lavaron a continuación con agua corriente y se acidificaron con HCl al 0,5 %. Después de que el material se había acidificado en todo su grosor (durante aproximadamente 15 minutos) el material se lavó con agua hasta que se obtuvo un pH de 3,5. El material se contrajo luego con solución salina al 7 %, se neutralizó con solución de NaHCO₃ al 1 % y se lavó con agua corriente. El material se deshidrató a continuación con acetona y se desengrasó con n-hexano y se secó usando etanol-éter. Trozos de 2 x 2 cm de las membranas de colágeno obtenidos de este modo se cortaron a mano usando tijeras.

Como alternativa, trozos de 2 x 2 cm de la membrana Geistlich Bio-Gide® (disponible de Geistlich Pharma AG) se cortaron a mano usando tijeras. 1 g de los trozos de 2 x 2 cm de las membranas de colágeno obtenidas anteriormente se mezcló con 200 ml de hielo seco y se mezclaron en un molino de cuchillas (Retsch® Grindomix) a 5000 rpm hasta que no se produjo ningún bloqueo. La velocidad se aumentó a continuación a 6000, 7000, 9000 y 10.000 rpm durante de 20 a 30 segundos, añadiendo cada vez 50 ml de hielo seco.

El hielo seco se evaporó y las fibras de colágeno obtenidas de este modo (B) se almacenaron en envolturas de plástico Minigrip hasta uso adicional.

Preparación de segmentos de fibra de colágeno en molino cortante (C)

Los trozos de fibra de colágeno de 2 X 2 cm obtenidos anteriormente se cortaron en un molino cortante con un tamiz de 0,8 mm a 1500 rpm, dando una fracción tamizada de segmentos de fibra de colágeno en molino cortante (C).

Preparación de una cola de fibras de colágeno (D)

La fracción tamizada de segmentos de fibra de colágeno en molino cortante (C) se mezcló en agua para obtener una solución del 3 %, el pH se ajustó a 3,5 añadiendo ácido fosfórico H₃PO₄ y la suspensión se homogenizó a alta presión a 1500-2000 bares, repitiéndose esto de 3 a 5 veces.

La suspensión espesa resultante se neutralizó a aproximadamente pH 7 añadiendo una solución de hidróxido sódico NaOH y se gelificó durante una noche a 4 °C. El colágeno se concentró mediante liofilización a - 10 °C y 0,310 mbares después de congelar durante 4 horas a -40 °C y se homogenizó mediante molienda en molino de cuchillas.

La cola de fibras de colágeno (D) se preparó a partir de la suspensión espesa obtenida como una solución al 2-10 % en solución salina tamponada con fosfato, pH 7,4 calentando a 60 °C hasta que ya no había más partículas visibles.

Ejemplo 2 Preparación de una placa de hidroxiapatita/colágeno opcionalmente reticulada (E)

4 g de fibras de colágeno (B) y 6 g de segmentos de fibra de colágeno en molino cortante (C) preparados en el ejemplo 1 se mezclaron con 140 g de solución salina tamponada con fosfato y se agitaron en un mezclador de cócteles. En otro ejemplo, las fibras de colágeno se sustituyeron completamente por segmentos de fibra de colágeno en molino cortante.

20 g partículas finas de hidroxiapatita (A) preparadas en el ejemplo 1 se añadieron y se mezclaron a mano.

34,14 g de esta mezcla se centrifugaron a 7000 g (7000 veces la aceleración de la gravedad) durante 2 minutos.

El sedimento se vertió entre dos redes de poliamida (de 21 µm de tamaño de poro y un total del 17 % de estructura abierta) en una forma rectangular plana de 8 x 12 cm y la materia se condensó retirando el exceso de agua con una cuchara de laboratorio. Las placas obtenidas se comprimieron a una presión de 1 - 1,7 kPa y se secaron en un

horno de vacío a 30 °C/ 50 mbares durante 2 horas, a continuación a 30 °C/10 mbares durante 8 horas. Las redes de poliamida se retiraron.

Reticulación opcional de la placa de hidroxiapatita-colágeno

5 Para facilitar la manipulación de la placa de hidroxiapatita-colágeno, esta última se reticuló químicamente o mediante tratamiento deshidrotérmico (DHT).

10 Se realizó reticulación química del colágeno con EDC/NHS, causando un aumento de estabilidad global de la placa de hidroxiapatita-colágeno. Las placas secas se reticularon a continuación en EDC 10 - 400 mM y NHS 13 - 520 mM en MES 0,1 M (ácido 2-(N-morfolino)-etanosulfónico) y etanol al 40 % a pH 5,5 durante 2 horas a temperatura ambiente.

15 La reacción se interrumpió incubando los prototipos dos veces en 0,1 mol/l de tampón Na₂HPO₄ a pH 9,5 durante una hora. Los residuos polares se retiraron incubando los prototipos durante 1 hora en 1 mol/l de solución de cloruro sódico y dos veces durante una hora en 2 moles/l de solución de cloruro sódico. Los prototipos reticulados químicamente se lavaron un total de 8 veces durante 30 - 60 minutos en agua destilada, a continuación se deshidrataron mediante inmersión en etanol durante 15 minutos un total de 5 veces. El secado se realizó a continuación llevando a cabo tres veces tratamiento con dietiléter durante 5 minutos y posterior secado a 10 mbares y 40 °C durante 30 minutos, o mediante liofilización (congelación por debajo de -10 °C y secado mediante tratamiento de liofilización convencional).

20 Como alternativa, la reticulación se realizó mediante tratamiento deshidrotérmico (DHT) a 0,1 - 10 mbares y 80 - 120 °C durante 1-4 días. En este caso no fue necesario ningún método de secado posterior.

25 Ejemplo 3 Preparación de una membrana de forma estable reticulada reabsorbible (M) ensamblando y encolando dos capas de colágeno pretensado elástico en las dos caras opuestas de las placas de hidroxiapatita/colágeno (E)

30 La siguiente descripción se entenderá mejor con referencia a las figuras 2 y 3. El ensamblaje de un prototipo plano o en forma de U requiere el uso de marcos fijos o flexibles que permitan el tensionado de las capas de material de colágeno.

Formación de prototipos planos o en forma de U (F)

35 La figura 2 es una vista esquemática de equipo adecuado para permitir el tensionado de las capas de material de colágeno antes de su ensamblaje en una membrana de forma estable plana o en forma de U de la invención.

40 Ese equipo consiste en un marco (a), que puede estar hecho de cualquier material adecuado, por ejemplo acero o aluminio. El propósito principal para el marco es anclar los resortes (b), que tensionan las dos capas de colágeno húmedas (c). La placa de hidroxiapatita/colágeno (E) se situó entre las dos capas de colágeno (c).

45 Si se desea una membrana de forma estable reticulada reabsorbible en forma de U, se usan un molde negativo (e) para flexionar la placa de colágeno (E) y marcos con bisagras (f), conduciendo de este modo a prototipos rectos en forma de U.

50 Capas de material de colágeno de las capas de colágeno Geistlich Bio-Gide no estériles se pretensaron alargando o estirando del 40 al 100 % de la longitud inicial mediante tensionado cada resorte mediante 2 - 3 N, para estar en la región lineal de la curva de esfuerzo del material de colágeno. Dentro de esta región lineal, el módulo elástico es el más alto y, por lo tanto, se consigue la rigidez más alta

55 Debido a la naturaleza viscoelástica de los tejidos de colágeno, los materiales húmedos y tensionados se mantuvieron durante aproximadamente 30 minutos en estado tensionado. Debido a la relajación de la membrana de colágeno pretensada, los resortes se tensionaron de nuevo a 1-3 N, por ejemplo, para estar en la región lineal de la curva de esfuerzo del material de colágeno.

60 Se usaron dos trozos redondos de colágeno con un diámetro de 10 cm cortados a partir de membrana de colágeno Geistlich Bio-Gide® no estéril, uno de los cuales se perforó con un tambor de agujas que contenía 50 agujas por cm² con un diámetro del eje de 0,88 mm. Esos dos trozos redondos de colágeno se humedecieron y tensionaron de forma radial mediante 12 resortes, cada uno tensionado a 1-3 N, lo que condujo a un alargamiento del 40-100 % del tamaño inicial de los trozos de colágeno.

Una vez completada esta etapa, las placas de hidroxiapatita/colágeno (E) se humedecieron en ambas caras con la cola de fibras de colágeno (C) y a continuación, la placa de hidroxiapatita/colágeno se colocó entre las dos capas de colágeno pretensado elástico. La barra central (e) así como las bisagras (f) son necesarias para producir prototipos en forma de U (véase a continuación).

65

Las membranas elásticas pretensadas se colocaron en una placa calefactora y se precalentaron a 40 °C.

La placa Bio-Oss reticulada (E) obtenida en el ejemplo 2 se sumergió brevemente en cola de fibras de colágeno (D) precalentada y se colocó entre las dos membranas de colágeno pretensado elástico.

5 Redes de poliamida, así como esponjas (de grosores de 5 cm, densidad de aprox. 20 - 25 mg/cm³, que contienen poros interconectados, hechos de poliuretano), se colocaron a ambos lados, se comprimieron un 50 - 95 % conduciendo a presiones de compresión de hasta 120 kPa.

10 Véase la figura 3, que representa el ensamblaje de una membrana de forma estable plana, en la que (1) es una placa de acero, (2) es una esponja de poliuretano comprimida, (3) es una red de poliamida, (4) es una capa de colágeno pretensado elástico y (5) es una placa de hidroxiapatita-colágeno reticulada.

15 Posteriormente, la construcción se secó en un horno de vacío a 40 °C con una disminución constante de la presión del aire hasta 10 mbares durante un total de 32 horas.

Formación de prototipos en forma de U

20 El experto en la materia adaptará fácilmente el aparato de la figura 2 y 3 y el método descrito anteriormente a la formación de prototipos en forma de U rectos o curvos, flexionando la construcción sobre un molde negativo apropiada y sustituyendo una de las esponjas por una esponja de poliuretano más fina o una tolla de papel libre de fibras.

Reticulación de prototipos planos o en forma de U (G)

25 Prototipos planos o en forma de U (F) se cortaron a las dimensiones deseadas con unas tijeras o una sierra circular pequeña. Los prototipos se reticularon a continuación químicamente o mediante un tratamiento deshidrotérmico (DHT).

30 La reticulación química se realizó en 0,1 mol/l de tampón MES a pH 5,5 y un contenido de etanol del 40 % en volumen a una concentración de EDC y NHS de 10 a 400 mM y 13 a 520 mM respectivamente. La concentración del prototipo en la solución de reticulación fue del 10 %. Para permitir la reticulación homogénea, las placas se trataron inicialmente al vacío (<40 mbares) y la reacción de reticulación se llevó a cabo a 4 °C durante 2 horas, estando todos los tampones preenfriados a esta temperatura.

35 La reacción se interrumpió incubando los prototipos dos veces en 0,1 mol/l de tampón Na₂HPO₄ a pH 9,5 durante una hora. Los residuos polares se retiraron incubando los prototipos durante 1 hora en una solución de 1 mol/l de NaCl y dos veces durante una hora en una solución de 2 moles/l de NaCl. Los prototipos se lavaron un total de 8 veces durante 30-60 minutos en agua destilada. La deshidratación y el secado se realizaron a continuación llevando a cabo 5 veces de tratamiento con etanol durante 15 minutos y tres veces de tratamiento con dietiléter durante 5 minutos y posterior secado a 10 mbares y 40 °C durante una noche o hasta que el producto estuviera completamente seco, o mediante liofilización convencional (congelación por debajo de -10 °C y secado mediante tratamiento de liofilización convencional) del producto no tratado con disolvente.

45 Como alternativa, la reticulación se realizó mediante tratamiento deshidrotérmico (DHT) a 0,1 - 10 mbares a 80 - 160 °C durante 1-4 días. En este caso no fue necesario ningún método de secado posterior.

50 Los prototipos obtenidos mediante los métodos descritos anteriormente se humedecen en solución salina o PBS en una o dos horas. Para permitir la humectación en 10 minutos, los prototipos se rehumedecen en agua destilada durante aproximadamente 1 a 2 horas. En este momento también es posible la perforación de un lado con el tambor de agujas descrito anteriormente. Se aplica cloruro de sodio incubando los prototipos tres veces durante 40 minutos en una solución de 200 g/l de NaCl. El cloruro sódico se precipita como se describe a continuación (H).

Secado de prototipos planos o en forma de U reticulados (H)

55 Los prototipos reticulados se deshidrataron mediante inmersión en etanol durante 15 minutos un total de 5 veces. A continuación se secaron por secado con disolvente (tres veces el tratamiento con dietiléter durante 5 minutos y posterior secado a 10 mbares y 40 °C) o mediante liofilización convencional (congelación por debajo de -10 °C y secado mediante tratamiento de liofilización convencional).

60 El grosor de la membrana de forma estable reticulada de los diferentes prototipos en estado húmedo fue de 1,0 a 2,0 mm, para la mayoría de ellos de 1,2 a 1,8 mm. Los prototipos secos se esterilizaron opcionalmente mediante irradiación con rayos x a 27 - 33 kGy.

Ejemplo 4 Propiedades de la membrana de forma estable reticulada reabsorbible

Se determinaron las siguientes características de la membrana de forma estable reticulada reabsorbible obtenidas en el ejemplo 3: (1) Humectabilidad en PBS, (2) Resistencia mecánica, (3) Degradación enzimática usando colagenasa de *Clostridium histolyticum* y (4) Adherencia celular (5) Medición del alargamiento del material de capas de colágeno pretensado elástico (6) Medición del grosor de las placas de colágeno-hidroxiapatita y los prototipos finales

(1) Humectabilidad en PBS

Se observó que el tiempo de humectación completa en PBS (Solución salina tamponada con fosfato) según se evaluó visualmente está entre 5 y 10 minutos para los diferentes prototipos de la membrana de forma estable reticulada reabsorbible, dependiendo ese tiempo principalmente del tratamiento con cloruro sódico antes de deshidratación con etanol y secado.

(2) Resistencia mecánica

La estabilidad de forma de la membrana de la invención se evaluó mediante un ensayo de flexión uniaxial de 3 puntos que es similar a los métodos descritos en las normas EN ISO 178 y ASTM D6272-10, estando la membrana de la invención sumergida en PBS a un pH de 7,4 y una temperatura de 37 °C.

Este ensayo se consideró el más útil, ya que cada membrana de forma estable diseñada para estabilizar mecánicamente un defecto óseo en un sitio sin contención experimentará momentos de flexión. Por lo tanto, la flexión de 3 o 4 puntos se puede utilizar como un ensayo para caracterizar los materiales usados y, además, para comparar diferentes productos con, por ejemplo, grosores diferentes. Para la caracterización del material, el módulo de flexión es el parámetro más adecuado. Sin embargo, para comparar diferentes productos que tienen grosores diferentes, la fuerza máxima después de 8-10 mm de indentación es más relevante y, por lo tanto, se usa para caracterizar el producto.

En el ensayo de flexión uniaxial de 3 puntos usado, las muestras se cortaron a un tamaño de 50 x 13 mm y se incubaron en PBS a 37 °C hasta la humectación completa como se observó visualmente. Los ensayos mecánicos se llevaron a cabo a 5 mm por minuto en un aparato de flexión de 3 puntos con un ancho de luz de soporte de 26 mm y un radio de 5 mm de cada estructura de soporte. El módulo de flexión se calculó dentro del 1 y el 5% de deformación de flexión. Las fuerzas máximas resultantes se leyeron después de bajar la máquina de prueba por indentación central entre 8 y 10 mm.

El ensayo se realizó para una membrana de la invención de 1,5 mm de grosor reticulada por EDC/NHS, una membrana de la invención de 1,6 mm de grosor reticulada por DHT y la membrana de PLA Resorb-X® de KLS Martin de 0,137 mm de grosor.

La figura 4, que representa la variación de la fuerza en función de la deformación para esas membranas, muestra que la estabilidad mecánica de la membrana de la invención reticulada por EDC/NHS (aproximadamente 0,65 N para 8 mm de deformación) o reticulada por DHT (aproximadamente 0,40 N para 8 mm de deformación) es sustancialmente superior a la de la membrana de PLA Resorb-X® (aproximadamente 0,10 N para 8 mm de deformación). La membrana de la invención estabilizará, de este modo, mejor el defecto óseo en un sitio sin contención.

(3) Ensayo de degradación enzimática usando colagenasa de *Clostridium histolyticum*

En el cuerpo humano, los colágenos son degradados por la metaloproteinasa de la matriz tisular humana (MMP), las catepsinas y supuestamente por algunas serina proteinasas. Las mejor estudiadas son las MMP en las que las colagenasas (especialmente MMP-1, MMP-8, MMP-13 y MMP-18) son las enzimas más importantes para la degradación directa del colágeno (Lauer-Fields *et al.* 2002 *Matrix metalloproteinases and collagen catabolism* en Biopolymers - Peptide Science Section y Song *et al.* 2006 *Matrix metalloproteinase dependent and independent collagen degradation* en Frontiers in Bioscience).

La capacidad de la colagenasa para degradar tejidos y membranas de colágeno depende de la flexibilidad del sustrato y del tipo de colágeno, los sitios activos de MMP y los exositos de MMP. Las colagenasas se alinean en el colágeno de triple hélice, lo desenrollan y posteriormente lo escinden (Song et al. 2006, véase anteriormente).

Con la intención de superar las diferencias de degradación entre los diferentes tipos de colágeno, la degradación por colagenasa del colágeno a menudo se evalúa utilizando colagenasa de *Clostridium histolyticum* que tiene una alta velocidad catalítica (Kadler et al., 2007 *Collagen at a glance* en J Cell Sci). Generalmente, un producto de colágeno natural se degrada más rápido que un producto de colágeno reticulado químicamente.

En este ensayo, los productos de colágeno (muestras de la membrana de forma estable reticulada reabsorbible a 1 mg/ml de colágeno) se incubaron a 37 °C con 50 unidades/ml de *Clostridium histolyticum* (una unidad se definió como péptidos liberadores a partir de colágeno de tendón de Aquiles bovino equivalente en color de ninhidrina a 1,0 micromol de leucina en 5 horas a pH 7,4 a 37 °C en presencia de iones de calcio) en un tampón Tris que contiene calcio y la degradación de la matriz de colágeno se midió visualmente y con el ensayo "DC Protein" de Bio-Rad Laboratories (Hercules, USA, N° de pedido 500-0116) usando colágeno de tipo I como material de referencia. La concentración de colágeno se determinó usando un espectrómetro de microplacas (Infinite M200, disponible de Tecan).

10 Todos los prototipos de la membrana de forma estable reticulada reabsorbible de la invención mostraron al menos un 10 % de degradación de colágeno (según lo evaluado mediante el ensayo DC Protein usando colágeno de tipo I como estándar) después de 4 horas, siendo la tasa de degradación de colágeno (menor que para la membrana Geistlich Bio-Gide®) dependiente de las condiciones de reticulación usadas.

15 (4) Adherencia celular

La adherencia celular a diferentes membranas se evaluó mediante primera siembra de punzones para membrana de 8 mm con 100.000 fibroblastos gingivales humanos previamente marcados con un tinte fluorescente, lipófilo, incubando durante 24 horas en PBS a 37 °C, retirando células no adherentes mediante el lavado de las membranas en PBS, lisando células adherentes y cuantificándolas midiendo la fluorescencia a 485 nm. La fluorescencia se normalizó a una curva estándar establecida con punzones para membrana sembrados de células que no se lavaron antes de la lisis.

25 Los resultados obtenidos para la membrana reabsorbible estable se representan en la figura 5 que es un diagrama de barras que representa horizontalmente el % de células capaces de adherirse a diferentes tipos de membranas dentales en porcentaje, la membrana de forma estable reticulada reabsorbible de la invención y la membrana de PTFE Cystoplast® (Keystone Dental).

30 La figura 5 muestra que la adherencia a la membrana de forma estable reticulada reabsorbible de la invención es aproximadamente el 10,5 %, un valor mucho más cercano al de la membrana Geistlich Bio-Gide® de aproximadamente el 13 % que al de la membrana de PTFE Cystoplast® de aproximadamente el 4 %. La membrana Geistlich Bio-Gide® es bien conocida por sus buenas propiedades de cicatrización con una baja tasa de dehiscencia (Zitzmann, Naef et al. 1997; Tal, Kozlovsky et al. 2008) o sin inflamación excesiva (Jung, 2012). Este valor medido de adherencia de fibroblastos gingivales humanos a la membrana de forma estable reticulada reabsorbible de la invención es predictivo para cicatrización de tejido blando sin acontecimientos adversos tales como inflamación excesiva o dehiscencia.

35 (5) Medición del alargamiento del material de capas de colágeno pretensado elástico

40 Para determinar la cantidad de tensionado de las capas de colágeno, la capa de colágeno seco se monta en un anillo de tensionado (figura 2, parte a) usando los resortes aún no tensionados (figura 2, parte b). En el centro de la membrana, al menos 4 puntos, que están a varios centímetros de distancia entre sí, se marcan usando un lápiz o un bolígrafo. La distancia entre cada punto se mide usando una regla. Las distancias medidas se definen como las longitudes iniciales entre cada punto. La capa de colágeno se sumerge en agua y se tensiona a la fuerza deseada. 45 La capa de colágeno se incubaba en agua durante 30 minutos. Debido a la naturaleza viscoelástica de la mayoría de las capas de colágeno, la tensión se reduce. Por lo tanto, las capas de colágeno deben tensionarse nuevamente. Después de 30 - 40 minutos de incubación, la distancia entre cada punto se mide con una regla. El porcentaje de deformación se determina restando la longitud inicial de la longitud después del tensionado, dividida por la longitud inicial y multiplicada por 100.

50 Resultados típicos para estar en la región lineal de la curva de esfuerzo-deformación están entre el 40 y el 100 % de deformación (alargamiento, estiramiento) para Geistlich Bio-Gide no estéril. Los valores de deformación medidos mediante este método no son directamente comparables con los valores de deformación obtenidos en un ensayo de alargamiento uniaxial.

55 (6) Medición del grosor de una placa de colágeno-hidroxiapatita y prototipo final

El grosor de los prototipos finales o la placa "E" de colágeno/hidroxiapatita se puede medir como se ha descrito anteriormente o usando un calibre deslizante.

60 (7) Análisis de las propiedades mecánicas de diferentes capas de colágeno (figura 5)

Para comparar diferentes fuentes de capas de colágeno y estimar sus propiedades mecánicas, se usó el tensionado uniaxial estándar de muestras húmedas. Una configuración general para dicho método analítico se describe en la norma ASTM D882-09 "Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting". Debido a los altos costes de las membranas de colágeno usadas, se adaptaron varios parámetros de la prueba. Las muestras se

5 cortaron en láminas rectangulares de, por ejemplo, 2 x 1 cm, se prehumedecieron en solución salina isotónica tamponada con fosfato y se montaron en una máquina de ensayo de tracción con una distancia de 1 cm entre cada portamuestras. Las muestras se tensionaron a una velocidad constante del 33 % de la longitud inicial por minuto. La fuerza previa, a la que se registra el 100 % de la longitud inicial, generalmente se estableció en 50 kPa. El alargamiento de la muestra se calculó usando la distancia entre los dos portamuestras.

De este modo se obtuvieron las curvas de esfuerzo-deformación de la figura 5.

10 Aunque la invención se ha ilustrado y descrito en detalle en los dibujos y en la descripción anterior, dicha ilustración y descripción se deben considerar ilustrativas o ejemplares y no restrictivas: la invención no está limitada por las realizaciones desveladas.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una membrana de forma estable reticulada reabsorbible para uso en la cavidad bucal que comprende una capa compuesta de material de colágeno y partículas de cerámica inorgánica que contienen de 1,5 a 3,5 partes en peso de cerámica inorgánica para 1 parte en peso de material de colágeno, intercalada entre dos capas de material de colágeno pretensado elástico, en la que el material de colágeno pretensado elástico es un material de colágeno que ha sido estirado para estar en la región lineal/elástica de la curva de esfuerzo-deformación, comprendiendo el material de colágeno el 50-100 % (p/p) de colágeno y el 0-50 % (p/p) de elastina.
- 10 2. Una membrana de forma estable reticulada reabsorbible de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la capa compuesta de material de colágeno y partículas de cerámica inorgánica contiene de 2,0 a 3,0 partes en peso de cerámica inorgánica para 1 parte en peso de material de colágeno.
- 15 3. Una membrana de forma estable reticulada reabsorbible de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en la que el material de colágeno comprende el 70-90 % (p/p) de colágeno y el 10-30 % (p/p) de elastina.
- 20 4. Una membrana de forma estable reticulada reabsorbible de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el material de colágeno procede de tejidos de origen natural seleccionados del grupo de membrana peritoneal o pericárdica, membrana placentaria, submucosa del intestino delgado (SIS), dermis, duramadre, ligamentos, tendones, diafragma (por ejemplo, diafragma torácico), epiplón y fascias de músculos u órganos de mamífero.
- 25 5. Una membrana de forma estable reticulada reabsorbible de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el material de colágeno procede de una membrana peritoneal o pericárdica, mucosa del intestino delgado (SIS) o fascias musculares porcinas, bovinas o equinas.
- 30 6. Una membrana de forma estable reticulada reabsorbible de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que el material de colágeno pretensado elástico tiene un módulo elástico de 2 a 150 MPa.
- 35 7. Una membrana de forma estable reticulada reabsorbible de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que una de las capas del material de colágeno pretensado elástico incluye orificios de 5 a 500 µm.
8. Una membrana de forma estable reticulada reabsorbible de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que las partículas minerales inorgánicas tienen un tamaño de 150 a 500 µm.
9. Una membrana de forma estable reticulada reabsorbible de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que la cerámica inorgánica es hidroxiapatita.
- 40 10. Una membrana de forma estable reticulada reabsorbible de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la que la cerámica inorgánica es mineral óseo de hidroxiapatita.
11. Una membrana de forma estable reticulada reabsorbible de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que está químicamente reticulada.
- 45 12. Una membrana de forma estable reticulada reabsorbible de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que se reticula mediante tratamiento deshidrotérmico DHT.
- 50 13. Un proceso para preparar una membrana de forma estable reticulada reabsorbible reticulada, de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 que comprende las etapas de:
- (a) Preparar una capa compuesta de partículas de cerámica inorgánica y material de colágeno, opcionalmente reticular esa capa compuesta,
- (b) Ensamblar y encolar la capa compuesta de material de colágeno y partículas de cerámica inorgánica entre dos capas de material de colágeno sometidas a tensionado que causa un estiramiento del material de colágeno en la región lineal de la curva de esfuerzo-deformación, dando de este modo una capa compuesta de material de colágeno y partículas de cerámica inorgánica intercalada entre dos capas de material de colágeno pretensado elástico, y
- (c) Reticular esa capa compuesta de material de colágeno y partículas de cerámica inorgánica intercalada entre dos capas de material de colágeno pretensado elástico, seguido por un tratamiento de fabricación hidrófilo.
- 60 14. Un método de la reivindicación 13, en el que el tratamiento de fabricación hidrófilo comprende sumergir la capa compuesta reticulada de material de colágeno y partículas de cerámica inorgánica intercalada entre dos capas de material de colágeno pretensado elástico, en una solución de cloruro sódico.

15. Una membrana de forma estable reticulada reabsorbible de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, para uso como un implante para soportar formación ósea, regeneración ósea, reparación ósea y/o reemplazo óseo en un sitio de defecto óseo dental sin contención en un ser humano o animal.

Fig 1

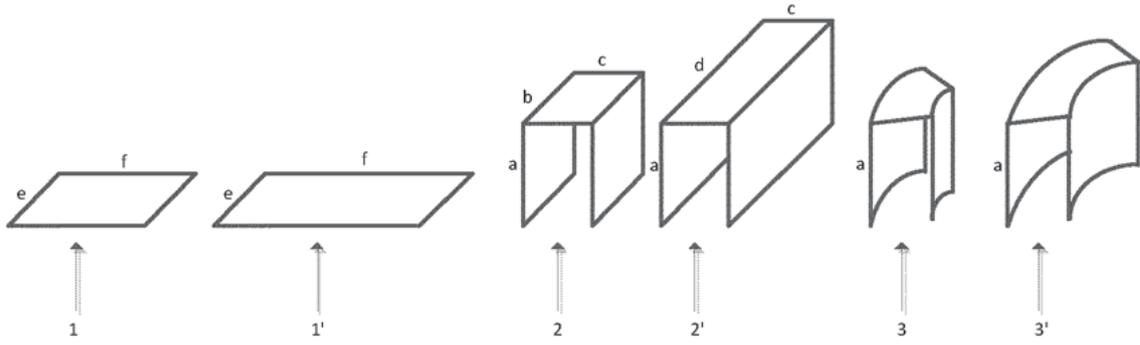


Fig. 3

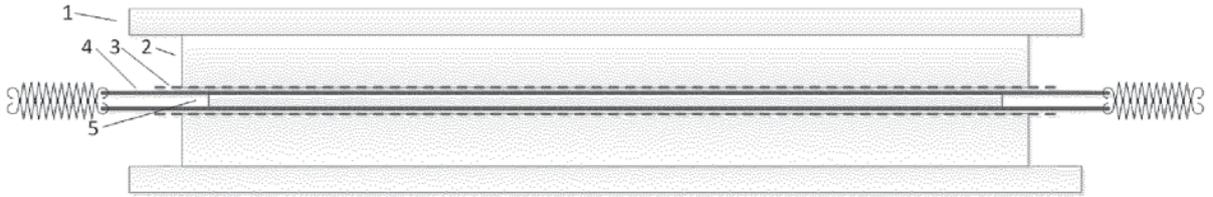


Figura 4

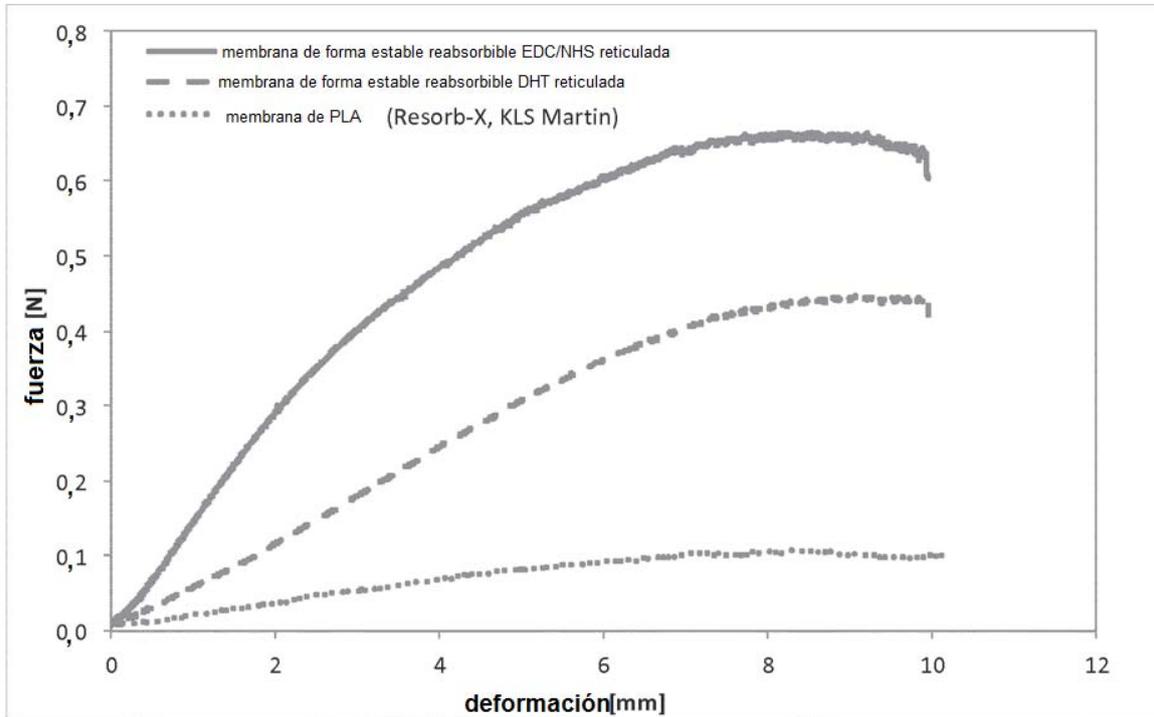


Figura 5

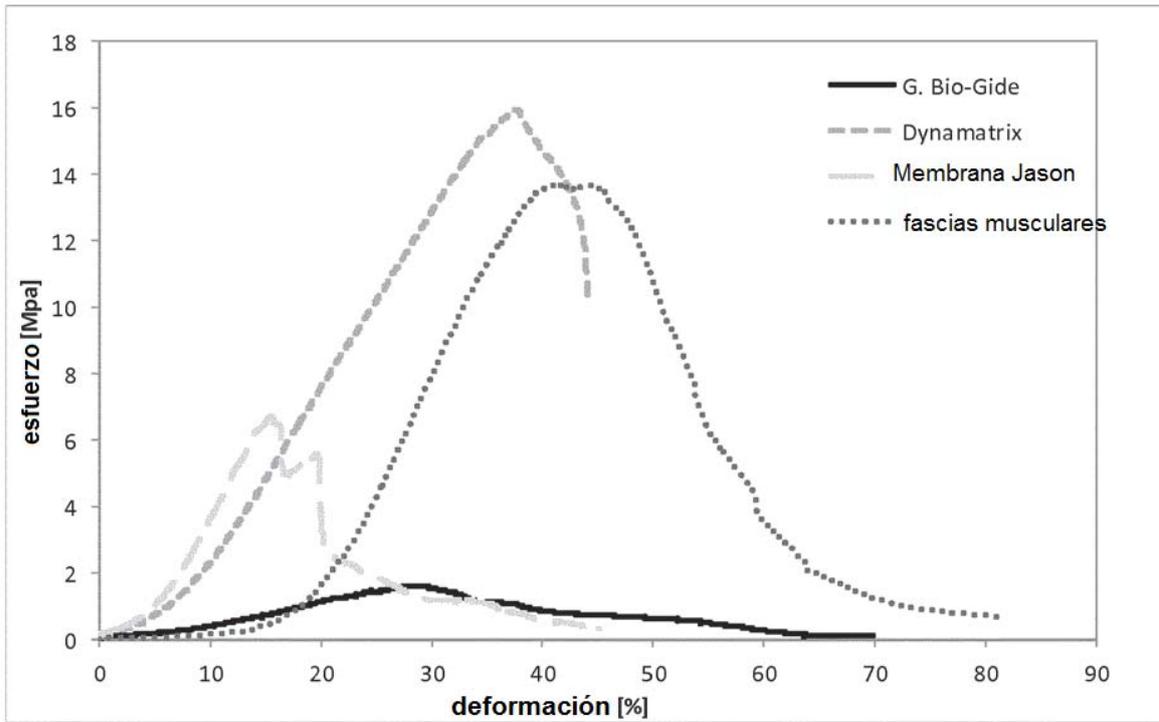


Figura 6

