(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 676 545**

(51) Int. Cl.:

A61L 27/24 (2006.01)
A61F 2/18 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.06.2013** **PCT/AU2013/000621**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **19.12.2013** **WO13185173**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.06.2013** **E 13804320 (3)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.05.2018** **EP 2858691**

(54) Título: **Método para producir una membrana de colágeno y usos de la misma**

(30) Prioridad:

12.06.2012 AU 2012902458

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.07.2018

(73) Titular/es:

ORTHOCELL LTD (100.0%)
Building 191 Murdoch University South Street
Murdoch WA 6150, AU

(72) Inventor/es:

ZHENG, MING-HAO

(74) Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 676 545 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

Método para producir una membrana de colágeno y usos de la misma

Campo

La presente invención se refiere a un método para producir una membrana de colágeno que tiene propiedades mecánicas particulares. En particular, la presente invención se refiere a un método para producir una membrana de colágeno que comprende tratar un tejido que contiene colágeno con sales inorgánicas y tensioactivos aniónicos suficientes para producir propiedades mecánicas específicas.

Antecedentes

El colágeno y sus productos derivados se usan extensamente en la producción de armazones implantables que contienen colágeno. El colágeno es bien reconocido como un material que tiene antigenicidad baja, es biodegradable y tiene buenas propiedades de unión a células, mecánicas y hemostáticas (Sheu *et al*., (2001), Biomaterials, 22(13): 1713-9; Pieper *et al.*, (2002), Biomaterials, 23(15):3183-92; Chvapil *et al*., (1973), Int Rev Connect Tissue Res., 6:1-61; Pachence (1996), J. Biomed. Mater. Res.; 33(1):35-40; y Lee *et al*., (2001), Int JPharm.; 221(1-2): 1-22), que permite su uso para remplazar o reparar los tejidos de manera temporal o permanente. Los armazones de colágeno se usan rutinariamente en un sustrato sobre el cual las células pueden proliferar y diferenciarse y ser sustituidas eventualmente por tejido normal.

Sin embargo, es bien sabido también que los armazones que contienen colágeno pueden provocar inflamación y/o fibrosis cuando se implantan. Véase, por ejemplo, Wisniewski *et al*., (2000), J. Anal Chem.; 366 (6-7) (págs. 611-621). Como consecuencia, los armazones que contienen colágeno se tratan normalmente químicamente o físicamente (reticulados) para conferir resistencia mecánica y resistencia a la degradación enzimática (colagenasa). Existen varias estrategias de reticulación que se han usado en materiales que contienen colágeno. El glutaraldehído es el agente reticulante usado más ampliamente (Sheu *et al.,* (2001) *supra;* Barbani *et al*., (1995), J Biomater. Sci. Polym. Ed.; 7(6):461-9). Sin embargo, el glutaraldehído y sus productos de reacción se asocian con citotoxicidad *in vivo,* debido a la presencia de subproductos reticulantes y a la liberación de péptidos de colágeno enlazados con glutaraldehído durante la degradación enzimática (Huang-Lee *et al*., (1990), J Biomed Mater Res., 24(9): 1185-201; van Luyn *et al.*, (1992), Biomaterials, 13(14):1017-24.

Para evitar la citotoxicidad *in vivo* de colágeno reticulado con glutaraldehído, varios compuestos alternativos se han examinado como agentes reticulantes de colágeno potenciales (Khor (1997), Biomaterials, 18(2):95-105; Sung *et al*. (1996), Biomaterials; 17(14):1405-10) tales como poliepoxi, diisocianato de hexametileno (HMDI), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC), y radiación ultravioleta (UV) o de radiación de rayos gamma. Koob *et al*., (2001), J Biomed Mater Res., 56(1):31-48 mostraron que el ácido nordihidroguaiarético (NDGA) mejoró significativamente las propiedades mecánicas de las fibras de colágeno sintéticas. Además, mostraron que las fibras de colágeno reticuladas con NDGA no suscitaron una respuesta a cuerpos extraños ni estimularon una reacción inmunitaria durante seis semanas *in vivo.*

El documento WO 2011/132089 A2 divulga un método para producir un tejido bioprotésico humano que comprende: poner en contacto un tejido humano con una solución hipotónica para producir un tejido lisado; poner en contacto el tejido lisado con una primera solución de tensioactivo para producir un tejido tratado con tensioactivo (por ejemplo, SDS, conteniendo preferentemente una sal inorgánica tal como NaCl); poner en contacto el tejido tratado con tensioactivo con una solución de enzima nucleasa para producir un tejido tratado con enzimas; poner en contacto el tejido tratado con enzimas con una solución de limpieza que comprende un segundo tensioactivo (por ejemplo, SDS; comprendiendo además aproximadamente etanol al 70 %) para producir un tejido descelularizado; y poner en contacto el tejido descelularizado con una solución de agente reductor con carga biológica para producir el tejido bioprotésico humano, tal como la membrana timpánica. En algunas realizaciones, el método comprende además contactar uno o más de los tejidos con una solución fisiológicamente isotónica.

Sin embargo, a pesar de estos avances, sigue habiendo problemas con el uso de colágeno reticulado así como el colágeno nativo. Por lo tanto, sigue habiendo una necesidad de un armazón (*scaffold* en inglés) que contiene colágeno que tenga las siguientes propiedades:

a) poros que se interconectan de tal manera que favorecen la integración y la vascularizacion tisular;
b) biodegradabilidad y/o bioresorbabilidad de tal manera que el tejido normal sustituye finalmente al armazón;
c) química superficial que promueve la fijación, proliferación y diferenciación celular;
d) resistencia y flexibilidad; y
e) baja antigenicidad.

Un área que tiene una necesidad particular de una sustitución de un tejido que contiene colágeno es la reparación de las perforaciones de la membrana timpánica (TM). Si se dejan sin tratar, las perforaciones de la TM pueden dar como resultado una pérdida de audición, otorrea recurrente, posible infección del oído medio y colesteatoma

adquirido (Parekh *et al.*, (2009), The Laryngoscope; 119:1206-1213). Aunque las perforaciones más graves de la TM se cicatrizan espontáneamente, las perforaciones de la TM grandes o crónicas, especialmente de otitis media crónica supurativa, a menudo no pueden cicatrizarse y pueden requerir injerto (Lindeman *et al*., (1987), Archives of Otolaryngology-Head and Neck Surgery; 113:1285).

Actualmente, los métodos quirúrgicos tales como la miringoplastia se consideran como el tratamiento más eficaz y fiable de las perforaciones de la TM (Sheehy *et al*., (1980), The Annals of otology, rhinology, and laryngology; 89:331; Karela *et al*., (2008), European Archives of Oto-Rhino-Laryngology; 265:1039-1042). Se han usado varios injertos y aloinjertos autólogos tales como fascia muscular, cartílago, pericondrio y AlloDerm, sin embargo, todos tienen sus propias limitaciones (Levin *et al*., (2009), Expert review of medical devices; 6:653-664). Por ejemplo, la fascia temporal, que se considera como la "regla de oro", se asocia con la morbilidad de la zona donante, incisiones adicionales, larga duración de la operación y una escasez de material en casos de revisión (Levin *et al.,* (2009), *supra).* Hasta la fecha, una gama de xenoinjertos y materiales sintéticos, incluido Gelfoam® (Abbenhaus, (1978), Otolaryngology; 86:ORL485), parche de papel (Golz *et al.*, (2003), Otolaryngology--Head and Neck Surgery; 128:565) y derivados del ácido hialurónico (Teh *et al*., (2011), Expert Opinion on Biological Therapy; 1-14) se han investigado como armazones adecuados para sustentar la regeneración de la TM. Sin embargo, existe poca evidencia de sustentar cualquiera de estos materiales óptimos para varios tipos de perforaciones. Además, varios xenoinjertos disponibles comercialmente tales como la submucosa del intestino delgado porcino, contienen materiales del xeno ADN y evocan una respuesta inflamatoria debido a los componentes xenocelulares restantes que incluyen serotonina. Además, los materiales sintéticos no son biodegradables, y sus propiedades biomecánicas y materiales son diferentes en comparación con la TM normal, lo que puede afectar a la función cicatrizante a largo plazo (Levin *et al.,* (2009), *supra).* De este modo, existe una búsqueda constante de materiales mejores para lograr una cicatrización y audición mejoradas.

Sumario

La presente invención proporciona un método de producción de un tejido que contiene colágeno que tiene inflamación y/o fibrosis reducidas cuando se implanta en comparación con otro tejido que contiene colágeno. En algunas realizaciones, el tejido que contiene colágeno no reticulado.

Por lo tanto, en un primer aspecto, la presente invención provee un método de producción de una membrana de colágeno que comprende las etapas de:

(i) aislar un tejido que contiene colágeno e incubarlo en una solución de etanol;
(ii) incubar el tejido que contiene colágeno de la etapa (i) en una primera solución que comprende una sal inorgánica y un tensioactivo aniónico para desnaturalizar las proteínas no colagénicas contenidas en el mismo;
(iii) incubar el tejido que contiene colágeno producido en la etapa (ii) en una segunda solución que comprende un ácido inorgánico hasta que el colágeno en dicho material se desnaturalice; y
(iv) incubar el tejido que contiene colágeno producido en la etapa (iii) en una tercera solución que comprende un ácido inorgánico con estimulación mecánica simultánea durante un tiempo suficiente para permitir que los haces de colágeno en dicho tejido que contiene colágeno se alineen;

en donde la estimulación mecánica comprende aplicar tensión cíclicamente al tejido que contiene colágeno.

Se apreciará que cualquier sal inorgánica se puede usar en la primera solución siempre y cuando sea capaz de formar un complejo con los ácidos de Lewis. En algunas realizaciones, la sal inorgánica se selecciona del grupo que consiste en cloruro de trimetilamonio, cloruro de tetrametilamonio, cloruro de sodio, cloruro de litio, perclorato y trifluorometanosulfonato. En otras realizaciones, la sal inorgánica es cloruro de litio (LiCl).

Si bien se puede usar cualquier cantidad de tensioactivos aniónicos en la primera solución, en algunas realizaciones, el tensioactivo aniónico se selecciona entre el grupo que consiste en alquil sulfatos, alquil éter sulfatos, alquil sulfonatos y alquil aril sulfonatos. Los tensioactivos aniónicos particularmente útiles incluyen alquil sulfatos tales como dodecil sulfato de sodio (SDS).

En algunas realizaciones, la primera solución comprende SDS al 1 % (v/v) y LiCl al 0,2 % (v/v).

En algunas realizaciones, el ácido inorgánico en la segunda solución comprende HCl al 0,5 % (v/v), mientras que el ácido inorgánico en la tercera solución comprende HCl al 1 % (v/v).

Los expertos en la materia apreciarán que los periodos de incubación en cada una de las tres etapas variarán dependiendo de: (i) el tipo de tejido que contiene colágeno; (ii) el tipo de sal / ácido inorgánico y/o tensioactivo aniónico; (iii) la resistencia (concentración) de cada sal / ácido inorgánico y/o tensioactivo aniónico usado y (iv) la temperatura de incubación. En algunas realizaciones, el periodo de incubación en la etapa (i) es al menos 8 horas. En otras realizaciones, el periodo de incubación en la etapa (ii) es menos de 60 minutos, mientras que en otras realizaciones, el periodo de incubación en la etapa (iii) es al menos 20 horas.

En algunas realizaciones, la incubación en la etapa (ii) es a 4 °C. En otras realizaciones, la incubación en la etapa (ii) se realiza durante al menos 12 horas.

En algunas realizaciones, la segunda solución comprende HCl al 0,5 % (v/v).

En algunas realizaciones, la incubación en la etapa (iii) se realiza durante 30 minutos. En otras realizaciones, la incubación en la etapa (iii) se realiza con agitación.

En algunas realizaciones, la tercera solución comprende una solución de HCl al 1 % (v/v).

En algunas realizaciones, la incubación en la etapa (iv) se realiza durante 12 a 36 horas, preferentemente durante 24 horas. En otras realizaciones, la incubación en la etapa (iv) se realiza con agitación.

En algunas realizaciones, los métodos de la invención comprenden además una etapa de neutralización entre la etapa (iii) y la etapa (iv) que comprende la incubación de dicho tejido que contiene colágeno con NaOH al 0,5 % (v/v).

En algunas realizaciones, los métodos de la invención comprenden además la etapa (v) que comprende incubar el tejido que contiene colágeno de la etapa (iv) con acetona y después secar el tejido que contiene colágeno.

En algunas realizaciones, los métodos de la invención comprenden además entre las etapas (ii) y (iii) y/o entre las etapas (iii) y (iv) una etapa de puesta en contacto del tejido que contiene colágeno con glicerol para visualizar y facilitar la eliminación de grasa y/o vasos sanguíneos.

El glicerol puede ser puesto en contacto con el tejido que contiene colágeno durante cualquier cantidad de tiempo que facilitará la eliminación de grasa y/o vasos sanguíneos. En algunas realizaciones, el tiempo de contacto es de al menos 10 minutos.

En algunas realizaciones, los métodos de la invención comprenden además entre las etapas (ii) y (iii) y/o entre las etapas (iii) y (iv) una etapa de lavado para el tejido que contiene colágeno. El propósito de la etapa de lavado usada entre las etapas (ii) y (iii) es eliminar las proteínas desnaturalizadas. Por lo tanto, se puede usar cualquier solución de lavado capaz de eliminar las proteínas desnaturalizadas. En algunas realizaciones la solución de lavado usada entre las etapas (ii) y (iii) es acetona.

Después del lavado con acetona, el tejido que contiene colágeno se lava adicionalmente con agua estéril.

En algunas realizaciones, el tejido que contiene colágeno se lava adicionalmente en una solución de NaOH:NaCl. Si el tejido que contiene colágeno se lava con NaOH:NaCl entonces se lava preferentemente con agua estéril.

En algunas realizaciones, después de la etapa (iv) el tejido que contiene colágeno se lava adicionalmente con la primera solución.

Los expertos en la materia apreciarán que el tejido que contiene colágeno puede ser cualquier tejido aislado de un animal mamífero. Sin embargo, se apreciará también que el tejido que contiene colágeno comprenderá tejido conectivo denso. En algunas realizaciones, el tejido que contiene colágeno se aísla de una oveja, de una vaca, de un cerdo o de un ser humano. Preferentemente, el tejido que contiene colágeno se aísla de un ser humano.

En algunas realizaciones, el tejido que contiene colágeno es autólogo.

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona una membrana de colágeno producida por un método del primer aspecto, en donde dicha membrana producida por el método comprende más del 80 % (p/p) de haces o fibras de colágeno de tipo I que tienen una estructura tejida y un módulo de más de 300 MPa.

En algunas realizaciones, la membrana de colágeno tendrá un módulo de más de 400 MPa y preferentemente más de 500 MPa.

La membrana de colágeno tendrá también una extensión a una carga máxima de menos del 85 %, preferentemente de menos del 80%.

En un tercer aspecto, la presente invención proporciona un método para preparar un dispositivo para la implantación en el cuerpo o tejido de una persona o animal, dicho método comprendiendo la colocación de una membrana de colágeno en dicho dispositivo, en donde dicha membrana de colágeno se produce por un método que comprende:

(i) aislar un tejido que contiene colágeno e incubarlo en una solución de etanol;
(ii) incubar el tejido que contiene colágeno de la etapa (i) en una primera solución que comprende una sal inorgánica y un tensioactivo aniónico para desnaturalizar las proteínas no colagénicas contenidas en el mismo;

(iii) incubar el tejido que contiene colágeno producido en la etapa (ii) en una segunda solución que comprende un ácido inorgánico hasta que el colágeno en dicho material se desnaturalice; y
(iv) incubar el tejido que contiene colágeno producido en la etapa (iii) en una tercera solución que comprende un ácido inorgánico con estimulación mecánica simultánea durante un tiempo suficiente para permitir que los haces de colágeno en dicho tejido que contiene colágeno se alineen;

en donde la estimulación mecánica comprende aplicar tensión cíclicamente al tejido que contiene colágeno.

En un cuarto aspecto, la presente invención provee un dispositivo que tiene biocompatibilidad aumentada para la implantación en el cuerpo o tejido de una persona o animal, en donde dicho dispositivo que comprende una membrana de colágeno se produce por un método que comprende:

(i) aislar un tejido que contiene colágeno e incubarlo en una solución de etanol;
(ii) incubar el tejido que contiene colágeno de la etapa (i) en una primera solución que comprende una sal inorgánica y un tensioactivo aniónico para desnaturalizar las proteínas no colagénicas contenidas en el mismo;
(iii) incubar el tejido que contiene colágeno producido en la etapa (ii) en una segunda solución que comprende un ácido inorgánico hasta que el colágeno en dicho material se desnaturalice; y
(iv) incubar el tejido que contiene colágeno producido en la etapa (iii) en una tercera solución que comprende un ácido inorgánico con estimulación mecánica simultánea durante un tiempo suficiente para permitir que los haces de colágeno en dicho tejido que contiene colágeno se alineen;

en donde la estimulación mecánica comprende aplicar tensión cíclicamente al tejido que contiene colágeno.

Una vez producida, la membrana de colágeno producida por los métodos de la presente invención puede usarse para reparar varios defectos tisulares.

Por consiguiente, en un quinto aspecto, la presente invención provee el uso de una membrana de colágeno de acuerdo con el primer o el segundo aspecto o un dispositivo de acuerdo con el cuarto aspecto para su uso en la reparación de un defecto tisular en un animal mamífero.

Los métodos de la presente invención se pueden usar para producir membranas de colágeno de varios grosores dependiendo de su uso final. Por ejemplo, las membranas para el uso en la reparación de membranas timpánicas en animales no humanos pueden tener 50 µm de grosor, mientras que la reparación de las membranas timpánicas en los seres humanos puede ser de 100 µm de grosor. Por lo tanto, se contemplan varios grosores de membrana.

En un séptimo aspecto, la presente invención provee una membrana de colágeno producida por el método del primer aspecto que es al menos de 10 µm. Preferentemente, la membrana tiene entre 10 µm y 400 µm de grosor. Más preferentemente, entre 50 µm y 200 µm de grosor. En algunas realizaciones, la membrana de colágeno de la presente invención es 100 µm de grosor.

En algunas realizaciones, el método del primer o segundo aspectos tiene la condición de que no tiene lugar ninguna reticulación del tejido que contiene colágeno. En algunas realizaciones, el método del primer o segundo aspectos tiene la condición de que no se usa ningún glutaraldehído en los métodos de la presente invención.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra la morfología de la superficie de la membrana de colágeno producida por los métodos de la presente invención (Tympacol™ denominado ACS en el presente documento) en comparación con otras membranas. La microscopía electrónica de barrido muestra la morfología de superficie de tres membranas (Panel A-C; ×500, D; ×200). Tympacol™ (denominado ACS en la Figura 1) posee dos superficies distintas, una superficie lisa que presenta haces de colágeno compacto (Panel A), y una superficie rugosa y porosa de fibras de colágeno sueltas (Panel B). La superficie con parche de papel (membrana) es irregular con cinco poros pequeños (Panel C). Gelfoam® muestra poros sustanciales de tamaños variables (Panel D). Barra de escala: 500 µm.

La Figura 2 muestra una imagen de microscopía electrónica de barrido (SEM) (X100) de una membrana de colágeno producida por los métodos de la presente invención.

La Figura 3 muestra una imagen de microscopía electrónica de barrido (SEM) (X200) de un bioarmazón disponible comercialmente ("Bio-gide™") Luitpold Pharmaceuticals, Inc, Shirley, NY, EE.UU.

La Figura 4 muestra una gráfica de barras que muestra una carga máxima media comparativa para una membrana de colágeno producida mediante los métodos de la presente invención y comercialmente Bio-gide™.

La Figura 5 muestra una gráfica de barras que muestra una extensión media comparativa en una carga máxima para una membrana de colágeno producida mediante los métodos de la presente invención y comercialmente Biogide™.

La Figura 6 muestra una gráfica de barras que muestra una carga media comparativa en un rendimiento para una membrana de colágeno producida por los métodos de la presente invención y comercialmente Bio-gide™.

La Figura 7 muestra una gráfica de barras que muestra una extensión media comparativa en un rendimiento para una membrana de colágeno producida por los métodos de la presente invención y comercialmente Bio-gide™.

La Figura 8 muestra fotomicrografías de membranas timpánicas cicatrizadas (TM) 28 días después del injerto de una membrana de colágeno producida mediante los métodos de la presente invención en comparación con otras membranas disponibles comercialmente. A los 28 días, las TM tratadas con Tympacol™ (ACS (Paneles B & D)) tuvieron una estructura trilaminar normal, que consistió en haces de colágeno densos y bien organizados en la capa de TC (tomografía computarizada). Las TM tratadas con parche de papel (Paneles E, H) y Gelfoam™ (Pfizer, Puurs, Bélgica) (Paneles F, I) permanecieron gruesos en el área cicatrizada con fibras de colágeno sueltas y desorganizadas en la capa media. Las TM en el grupo de control (Paneles G, J) permanecieron gruesas con una estructura atípica y regiones de fibras de colágeno irregulares. A los 14 días, todas las TM eran significativamente gruesas en comparación con la TM normal (Panel K). A los 28 días, los grosores de TM en los grupos de ACS no mostraron diferencias significativas en comparación con las TM normales (Panel L). (*$p < 0,05$, **$p < 0,01$). Las puntas de las flechas indican los armazones residuales. Tinción tricrómica de Masson y con H&E. Barras de escala: 50 µm.

La Figura 9 muestra la evaluación de las respuestas auditivas troncoencefálicas de la recuperación de audición después de un injerto. La recuperación de audición se definió como la diferencia entre el umbral auditivo inmediatamente después de la perforación (antes de la reparación) y en puntos temporales específicos después del injerto (después de la reparación). Los valores representan error medio ± estándar error de la media (SEM) (n=5). La recuperación de audición después de un injerto en cada grupo se llevó a cabo usando análisis de regresión lineal múltiple. El umbral auditivo de todas las ratas se recuperó con el tiempo y se observaron diferencias significativas cuando se comparó entre tratamientos diferentes ($p < 0,01$). La audición en las ratas tratadas por el ACS se recuperó significativamente más rápido en comparación con aquellas tratadas con parche de papel, Gelfoam® y cicatrización espontánea (control). La relevancia estadística entre los grupos fue: un ACS y cicatrización espontánea ($p < 0,01$); ACS y papel ($p < 0,01$); ACS y Gelfoam® ($p < 0,01$).

La Figura 10 muestra cicatrización de la perforación de la membrana timpánica en diferentes puntos temporales después de un injerto.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas de la invención

De modo general, las realizaciones de la invención objeto se dirigen a la membrana de colágeno, coberturas, revestimientos y/o armazones que son particularmente adecuados para dispositivos médicos implantables y métodos de elaboración y uso de los mismos en pacientes animales o humanos. El paciente puede ser un ser humano u otro animal, tal como un primate, animal equino, bovino, ovino, canino o felino. La membrana de colágeno, revestimientos, coberturas y/o armazones se pueden proveer como una superficie de contacto tisular que puede encapsular todos o una parte de los dispositivos implantables para proveer de este modo una respuesta inmunogénica reducida y/o funcionalidad *in vivo* duradera del dispositivo implantado.

La terminología usada en el presente documento únicamente tiene el propósito de describir realizaciones particulares y no debe considerarse limitante de la invención. Tal como se usan en el presente documento, las formas en singular "un", "una" y "el" o "la" pretenden incluir igualmente las formas plurales, a menos que el contexto indique claramente otra cosa. Se entenderá además que los términos "comprende" y/o "que comprende", cuando se usan en esta memoria descriptiva, especifican la presencia de características indicadas, números enteros, etapas, operaciones, elementos y/o componentes, pero no descartan la presencia o adición de una o más características, números enteros, etapas, operaciones, elementos, componentes y/o grupos de los mismos. Tal como se usan en el presente documento, el término "y/o" incluye cualquier y toda combinación de uno o más de los puntos enumerados asociados. Tal como se usan en el presente documento, frases tales como "entre X e Y" y "entre aproximadamente X e Y" se ha de interpretar que incluyen X e Y. Tal como se usan en el presente documento, frases tales como "entre aproximadamente X e Y" significan "entre aproximadamente X y aproximadamente Y". Tal como se usan en el presente documento, frases tales como "desde aproximadamente X hasta Y" significan "desde aproximadamente X hasta aproximadamente Y".

El término "aproximadamente" tal como se usa en el presente documento se refiere a una desviación en el valor que sigue al término en un 10 % arriba o abajo. Por ejemplo, la referencia a aproximadamente 70 % de etanol incluye intervalos entre 63 % y 77 %, es decir, un 10 % arriba o abajo del valor de 70 %. Esto incluye 64 %, 65 %, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76 % y 77 % de etanol.

Salvo que se defina de otro modo, todos los términos (incluidos los términos técnicos y científicos) utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el que entiende comúnmente una persona normalmente experta en la técnica a la cual pertenece la presente invención. Se entenderá además que se han de interpretar los términos, tales como aquellos definidos en los diccionarios usados comúnmente, por tener un significado que es consistente con su significado en el contexto de la memoria descriptiva y de la técnica relevante y no han de interpretarse en un sentido idealizado o demasiado formal salvo que se defina así expresamente en el presente documento. Las funciones y construcciones bien conocidas no se pueden describir en detalle por motivos de brevedad y/o claridad.

Se entenderá que cuando se hace referencia a que un elemento está "sobre", "fijado" a, "conectado" a, "acoplado" con, "en contacto" con, etc., otro elemento, puede estar directamente sobre, fijado a, conectado a, acoplado con o en contacto con el otro elemento o que pueden estar también presentes elementos intervinientes. Por el contrario, cuando se hace referencia a que un elemento está, por ejemplo, "directamente sobre", "directamente fijado" a, "directamente conectado" a, "directamente acoplado" con o "directamente en contacto" con otro elemento, no hay elementos intervinientes presentes. Los expertos en la materia apreciarán también que referencias a una estructura o característica que está dispuesta "adyacente" a otra característica puede tener porciones que están superpuestas o subyacentes a la característica adyacente.

Se entenderá que, aunque los términos primero, segundo, etc. se puedan usar en el presente documento para describir varios elementos, componentes, regiones, capas y/o secciones, estos elementos, componentes, regiones, capas y/o secciones no han de estar limitados por estos términos. Estos términos se usan únicamente para distinguir un elemento, componente, región, capa o sección de otra región, capa o sección. Por lo tanto, un primer elemento, componente, región, capa o sección descritos a continuación se podrían denominar un segundo elemento, componente, región, capa o sección sin alejarse de las enseñanzas de la presente invención. La secuencia de operaciones (o etapas) no se limita al orden presentado en las reivindicaciones o figuras a menos que se indique específicamente de otra manera.

El término "implantable" significa el "tejido que contiene colágeno", la "membrana de colágeno", el "dispositivo" o el "armazón" que se puede insertar, introducir, injertar o fijar o colocar de otra manera de manera precisa o crónica sobre o en un paciente. La expresión "tejido que contiene colágeno" significa piel, músculo y similar que se puede aislar de un cuerpo de mamífero que contiene colágeno. La expresión "tejido que contiene colágeno" también abarca un tejido producido "sintéticamente" en el que se ha ensamblado o fabricado colágeno o material que contiene colágeno fuera de un cuerpo.

A este respecto, se pretende que la expresión "membrana de colágeno" se entienda que significa una membrana fundamentalmente basada en colágeno. Una "membrana" normalmente comprende los componentes tal y como se describen en el presente documento.

El término "crónicamente" significa que el "tejido que contiene colágeno", la "membrana de colágeno", el "dispositivo" o el "armazón" se configuran para permanecer implantados durante al menos 2 meses, normalmente al menos 6 meses, y en algunas realizaciones, uno o más años mientras que permanecen operativos para su función prevista. Los términos "recubrimiento" o "cobertura" se refieren a un material sobre una superficie objetivo de la membrana, el dispositivo o el armazón. El recubrimiento puede ser un recubrimiento poroso que puede inhibir la incrustación celular y tisular de la membrana subyacente, el dispositivo o el armazón. El recubrimiento no puede promover el crecimiento tisular. El recubrimiento puede ser una película delgada o gruesa, espuma u otra barrera de incrustación y biodegradación tisular. El término "armazón" se refiere a un material poroso y/o estructura en la que las células, tejido, vasos, etc., pueden crecer, colonizar y poblar su interior.

Los haces de colágeno están compuestos por fibras de colágeno. Las fibras de colágeno están compuestas por tres cadenas polipeptídicas que se entrecruzan para formar una triple hélice derecha. Cada cadena polipeptídica de colágeno se designa como una cadena α y es rica en glicina, prolina e hidroxiprolina. Existe una cantidad de diferentes cadenas α y diferentes combinaciones de estas cadenas α corresponden con diferentes tipos de colágeno. En algunas realizaciones, la membrana de colágeno de la presente invención comprende colágeno de tipo I. El colágeno de tipo I está compuesto por dos cadenas α1 y una cadena α2.

En algunas realizaciones, las fibras o haces de colágeno están provistos de tejido conectivo denso aislado de una fuente. La expresión "tejido conectivo denso" tal como se usa en el presente documento se refiere a la matriz formada en primer lugar por fibras o haces de colágeno de tipo I que se encuentran en los tendones, ligamentos y dermis de todos los mamíferos. El tejido conectivo denso es distinto del "tejido conectivo suelto". El tejido conectivo suelto se caracteriza por fibras dispuestas libremente y una abundancia de células y está presente, por ejemplo, debajo de los epitelios que cubren las superficies corporales y bordean los órganos internos.

El tejido conectivo denso puede ser regular o irregular. El tejido conectivo denso regular provee una conexión fuerte entre los diferentes tejidos y se encuentra en los tendones y ligamentos. Las fibras de colágeno en el tejido conectivo denso regular se agrupan de una manera paralela. El tejido conectivo denso irregular tiene fibras que no están dispuestas en haces paralelos como en el tejido conectivo denso regular y comprende una gran porción de la capa

dérmica de la piel. La membrana de colágeno de la presente invención puede estar compuesta sea por tejido conectivo denso regular o sea por tejido conectivo denso irregular, o una combinación de ambos.

Las "microfibrillas", "fibrillas", "fibras" y "fibras naturales" se refieren a estructuras producidas de manera natural que se encuentran en un tendón. Las microfibrillas tienen un diámetro de aproximadamente 3,5 a 50 nm. Las fibrillas tienen un diámetro de aproximadamente 50 nm a 50 µm. Las fibras naturales tienen un diámetro de más de 50 µm. Una "fibra sintética" se refiere a cualquier material de tipo fibra que se ha formado y/o que se ha creado o alterado química o físicamente a partir de su estado producido de manera natural. Por ejemplo, una fibra extruida de fibrillas formadas a partir de un tendón digerido es una fibra sintética pero una fibra de tendón recién recogida de un mamífero es una fibra natural. Obviamente, las fibras de colágeno sintéticas pueden incluir componentes no colagénicos, tales como hidroxiapatita o fármacos que facilitan el crecimiento tisular. Por ejemplo, las composiciones pueden contener factores de crecimiento tales como factor de crecimiento de fibroblastos básico, factor beta de crecimiento tumoral, proteínas morfogénicas óseas, factor de crecimiento derivado de plaquetas y factores de crecimiento de tipo insulina; factores quimiotácticos tales como fibronectina e hialuronano; y moléculas de la matriz extracelular tales como agrecano, biglicano y decorina. Obviamente, las fibras de colágeno sintéticas pueden incluir componentes no colagénicos, tales como partículas, hidroxiapatita y otras fases minerales, o fármacos que facilitan el crecimiento tisular. Por ejemplo, las composiciones pueden contener nanotubos de carbono, nanohilos de zinc, diamante nanocristalino, u otras partículas de escala nanométrica; partículas cristalinas y no cristalinas superiores tales como fosfato de calcio, sulfato de calcio, minerales de apatita. Por ejemplo, las composiciones pueden contener agentes terapéuticos tales como bisfosfonatos, esteroides antiinflamatorios, factores de crecimiento tales como factor de crecimiento de fibroblastos básico, factor beta de crecimiento tumoral, proteínas morfogénicas óseas, factor de crecimiento derivado de plaquetas y factores de crecimiento de tipo insulina; factores quimiotácticos tales como fibronectina e hialuronano; y moléculas de la matriz extracelular tales como agrecano, biglicano y decorina.

El término "fuente" como se usa en el presente documento se refiere a cualquier tejido de colágeno que contenga tejido conectivo denso en cualquier mamífero. En algunas realizaciones, el tejido que contiene tejido conectivo denso es un tendón. Un tendón es el tejido que conecta el músculo al hueso en un mamífero.

En algunas realizaciones, el tejido que contiene colágeno se puede aislar de cualquier animal mamífero incluyendo, pero sin limitación, una oveja, una vaca, un cerdo o un ser humano. En otras realizaciones, el tejido que contiene colágeno se aísla de un ser humano.

En algunas realizaciones, el tejido que contiene colágeno es "autólogo", es decir, está aislado del cuerpo del sujeto que necesita tratamiento.

En algunas realizaciones, la presente invención provee una membrana de colágeno que comprende más del 80 % de colágeno de tipo I. En otras realizaciones, la membrana de colágeno comprende al menos un 85 % de colágeno de tipo I. Aún en otras realizaciones, la membrana de colágeno comprende más del 90 % de colágeno de tipo I.

Las fibras o haces de colágeno de la membrana de colágeno forman una estructura tejida. La expresión "estructura tejida" tal como se usa en el presente documento se refiere a una estructura que comprende los primeros y segundos grupos de fibras o haces donde las fibras o haces en el primer grupo se extienden predominantemente en una primera dirección y las fibras o haces del segundo grupo se extienden predominantemente en una segunda dirección, donde las primeras y segundas direcciones son diferentes unas de otras y las fibras o haces en el primer grupo se intercalan o se entrelazan de otra manera con las fibras o haces del segundo grupo. La diferencia de dirección debe ser aproximadamente 90°.

La expresión "resistencia en la carga de tracción máxima" tal como se usa en el presente documento se refiere a la carga máxima de tracción que puede soportar la membrana de colágeno. En una curva de Carga-Extensión, esto se representa mediante la carga máxima sobre la curva.

En algunas realizaciones, la membrana de colágeno tiene resistencia en la carga de tracción máxima de más de 20 N. En algunas realizaciones, la membrana de colágeno de la presente invención tiene una resistencia en la carga de tracción máxima superior a 25 N, 40 N, 60 N, 80 N, 100 N, 120 N o 140 N.

Además, Se cree que la estructura tejida de las realizaciones de la membrana de colágeno provee extensión reducida en la carga máxima del bioarmazón mientras que provee un aumento en el módulo.

El término "módulo" como se usa en el presente documento significa Módulo de Young y se determina como la relación entre tensión y presión. Esto provee una medida de la rigidez de la membrana de colágeno.

En algunas realizaciones, la membrana de colágeno tiene un módulo de más de 100 MPa. En otras realizaciones, la membrana de colágeno tiene un módulo de más de 200 MPa, 300 MPa, 400 MPa o 500 MPa.

La expresión "extensión en la carga máxima" tal como se usa en el presente documento significa la extensión de la membrana de colágeno en la resistencia en la carga de tracción máxima con referencia a la longitud original de la

membrana de colágeno en una condición no cargada. Esto ha de contrastarse con la extensión máxima que será superior.

En algunas realizaciones, la membrana de colágeno tiene una extensión en la carga máxima inferior al 85 % de la longitud original.

Ejemplos de dispositivos que pueden beneficiarse de la membrana de colágeno, recubrimientos de colágeno y/o armazones contemplados por las realizaciones de la invención, incluyen, pero sin limitación, stents implantables, que incluyen stents cardíacos, arteriales, neurológicos (cerebrales), urinarios y otros, generadores de energía implantables (IPG), marcapasos, desfribiladores, cardioversores, estimuladores y/o sistemas estimuladores y/o sistemas conductores para el cerebro, sistema nervioso central (SNC) o sistema nervioso periférico, sistema cardíaco u otro sistema biológico, válvulas de sustitución cardíacas, sensores implantables incluyendo los sensores de glucosa, sensores cardíacos, sensores de identidad o sensores de seguimiento (por ejemplo, RFID), sensores para detectar o medir O_2, pH, temperatura, iones y similares, implantes ortopédicos, incluyendo implantes tisulares, tales como implantes faciales para el mentón, mejilla, mandíbula y nariz, orificios de acceso implantables subcutáneos o percutáneos, tubos de drenaje tales como tubos de drenaje de la trompa de Eustaquio, catéteres tales como catéteres urinarios, tubos de respiración asistida y similares.

La membrana, armazón o cobertura de colágeno de fibras se puede configurar para envolver sustancialmente el dispositivo implantable objetivo o puede cubrir solo una porción del mismo.

La membrana, armazón o cobertura de colágeno puede ser una matriz tridimensional de fibras o fibrillas sostenidas juntas o sobre el dispositivo de cualquier manera adecuada incluyendo su afinidad natural para adherirse entre sí después de la compresión o extrusión, usando un recubrimiento adherente o adhesivo, tal como un recubrimiento gelatinoso o fijando de otra manera las fibras para formar la matriz.

La expresión "estimulación mecánica simultánea" usada en los métodos descritos en el presente documento se refiere al proceso de estiramiento de la membrana de colágeno durante el procesamiento químico del tejido que contiene colágeno. La membrana puede experimentar estiramiento estático y/o cíclico. Por consiguiente, en algunas realizaciones, la estimulación mecánica simultánea puede comprender:

(i) estiramiento de la membrana durante un periodo preestablecido;
(ii) relajación de la membrana durante un periodo preestablecido; y
(iii) repetición n veces de las etapas (i) y (ii), donde n es un número entero superior o igual a 1.

Si la estimulación mecánica se lleva a cabo mediante el estiramiento de la membrana, la membrana es preferentemente estirada a lo largo de su eje largo.

En algunas realizaciones, la estimulación mecánica simultánea comprende aplicar tensión cíclicamente al tejido que contiene colágeno, en donde la periodicidad de la tensión comprende un periodo de estiramiento de 10 segundos a 20 segundos y un tiempo de relajación de 10 segundos, y la presión que se obtiene como resultado es de aproximadamente un 10 %, y la estimulación mecánica continúa hasta que los haces de colágeno dentro del tejido que contiene colágeno se alinean según se describe en el presente documento.

La invención objeto también concierne al uso de las membranas de colágeno o armazones de la invención para la liberación *in vitro* o *in vivo* de compuestos bioactivos, fármacos, factores de crecimiento, proteínas, péptidos, ácidos nucleicos, moléculas inorgánicas u orgánicas, etc. Un tejido o armazón que contiene colágeno de la invención se puede cargar con un compuesto bioactivo, etc. y después el armazón cargado se puede implantar o poner en contacto con el cuerpo, tejido, células, etc. de una persona o animal. Por lo tanto, los compuestos se pueden liberar desde el armazón en el cuerpo, tejido, célula, etc. La membrana o armazón de colágeno se puede proveer sobre una estructura o matriz de soporte biodegradable o no degradable.

El colágeno usado en la presente invención puede ser sintético o derivado de cualquier especie animal adecuada. El colágeno puede ser de un animal vertebrado o uno invertebrado (por ejemplo, estrella de mar, erizo de mar, esponjas, etc.). En algunas realizaciones, el colágeno es colágeno de pez, tiburón, raya o mantarraya. En otra realización, el colágeno es colágeno humano, equino, bovino, ovino, porcino, canino o felino. En una realización ejemplificada, el colágeno es colágeno bovino.

El tejido o armazones que contienen colágeno de la presente invención son estables tanto *in vitro* como *in vivo* durante al menos 4 semanas a temperatura corporal.

Los términos "reparador" o "reparación" o equivalentes gramaticales de los mismos se usan en el presente documento para cubrir la reparación de un defecto tisular en un animal mamífero, preferentemente un ser humano. "Reparación" se refiere a la formación de tejido nuevo suficiente para rellenar al menos parcialmente una discontinuidad hueca o estructural en una zona de defecto tisular. La reparación, sin embargo, no significa, o de otra

manera, no necesita, un proceso de cicatrización completa o un tratamiento, que sea 100 % eficaz en la restauración de un defecto tisular hasta su estado fisiológico/estructural/mecánico anterior al defecto.

El término "defecto tisular" o "zona de defecto tisular", se refiere a una alteración de epitelio, tejido conectivo o muscular. Un defecto tisular da como resultado un tejido que funciona a un nivel subóptimo o que está en una condición subóptima. Por ejemplo, un defecto tisular puede ser un desgarro de grosor completo o parcial en un tendón o el resultado de muerte celular local debida a un infarto en el músculo cardíaco. Un defecto tisular puede asumir la configuración de un "hueco", que se entiende que significa un defecto tridimensional tal como, por ejemplo, un espacio, cavidad, agujero o cualquier interrupción sustancial de la integridad estructural del epitelio, tejido conectivo o muscular. En determinadas realizaciones, un defecto tisular es tal que es incapaz de reparación endógena o espontánea. Un defecto tisular puede ser el resultado de un accidente, enfermedad y/o manipulación quirúrgica. Por ejemplo, los defectos de cartílago pueden ser el resultado de un traumatismo en una articulación tal como un desplazamiento de tejido del menisco desgarrado en la articulación. Los defectos tisulares pueden ser el resultado también de enfermedades degenerativas tales como osteoartritis.

Típicamente, la membrana de colágeno de la invención se implantará en la zona del defecto tisular y se fijará en su sitio mediante cualquier medio convencional conocido por los expertos en la materia, por ejemplo, sutura, anclajes de sutura, dispositivos de fijación ósea y tornillos poliméricos biodegradables u óseos.

Todas las patentes, solicitudes de patente, solicitudes provisionales y publicaciones a las que se hace referencia o citadas en el presente documento se han incorporado por referencia en su totalidad, incluidas todas las figuras y tablas, hasta el punto que no son inconsistentes con las enseñanzas explícitas de esta memoria descriptiva.

A continuación, se dan ejemplos que ilustran procedimientos para poner en práctica la invención. Estos ejemplos no han de interpretarse como limitativos. Todos los porcentajes son en peso y todas las proporciones de mezclas de disolventes son en volumen a menos que se indique de otra manera.

Ejemplo 1 Método para la fabricación de una membrana de colágeno

Un segmento de colágeno de revestimiento orgánico interno porcino se separó cuidadosamente y se colocó en una solución que comprendía aproximadamente 70 % de etanol y se dejó incubar brevemente a temperatura ambiente. El tejido que contiene colágeno se extendió después con el lado adiposo hacia arriba sobre la superficie de trabajo y de manera que se eliminara tanto tejido adiposo y vasos sanguíneos como fuera posible.

Para visualizar el tejido adiposo presente, el tejido que contiene colágeno se recubrió con glicerol durante aproximadamente 10 minutos. Punto en el cual el colágeno fue transparente, pero el tejido adiposo tenía un color blanco. Mediante fórceps se separó el tejido adiposo blanco del colágeno con un microscopio anatómico.

Tras completarse, el tejido que contiene colágeno se transfirió cuidadosamente a un recipiente sellado y se incubó en una solución que comprendía SDS al 1 % (v/v) y LiCl al 0,2 % (v/v) aproximadamente para desnaturalizar las proteínas no colagénicas. La incubación se dejó durante una noche a 4 °C.

El tejido que contiene colágeno se lavó después cuidadosamente dos veces en acetona al 100 % para eliminar las proteínas no colagénicas desnaturalizadas. El tejido se centrifugó después a 100 RPM en un recipiente de 200 ml para centrifugar suavemente las soluciones residuales, las proteínas no colagénicas y los ácidos nucleicos del tejido que contiene colágeno.

El tejido que contiene colágeno se eliminó cuidadosamente y se lavó una vez más en agua Steripure™ de Membrane 3 veces.

Algunas veces, también se lavó el tejido que contiene colágeno en una solución que comprendía NaOH:NaCl tras lo cual se centrifugó el tejido a 100 RPM durante 90 minutos.

El tejido que contiene colágeno se sumergió después en 0,5 % (v/v) de HCl y se colocó en un agitador durante 30 minutos para desnaturalizar el colágeno. Se encontró que la concentración de HCl y el tiempo de incubación fue importante para evitar dañar la estructura mecánica del tejido resultante.

El tejido que contiene colágeno se eliminó después y se lavó una vez más en agua Steripure™ 3 veces.

El tejido que contiene colágeno se neutralizó después usando NaOH al 0,5 % (v/v). En esta etapa, se pudo realizar la evaluación preliminar de las propiedades mecánicas del tejido que contiene colágeno resultante.

El tejido que contiene colágeno se manipuló después usando fuerzas mecánicas (compresión y extensión) usando un marco de acero inoxidable. Una vez que el tejido que contiene colágeno se estiró hasta el tamaño correcto, el grosor y similares, el tejido se desnaturalizó *in situ*, es decir, dentro del marco, con inmersión en una solución que

comprendía HCl al 1 % (v/v). Típicamente, el tejido se incubó con agitación a 100 RPM durante 22-25 horas hasta que los haces de fibras de colágeno se alinearon.

El tejido que contiene colágeno se lavó después con agua y se enjuagó con una mezcla de SDS al 1 % (v/v) y LiCl al 0,2 % (v/v).

Dependiendo del uso final, el tejido que contiene colágeno se volvió a recubrir después con glicerol durante 10 minutos para visualizar cualquier tejido adiposo residual. Al igual que en el caso anterior, se usaron fórceps para separar el tejido adiposo restante del colágeno con un microscopio anatómico. Cualquier haz de colágeno extra se eliminó también en esta etapa para controlar el grosor del tejido que contiene colágeno.

Finalmente, el tejido que contiene colágeno se trató con acetona y se secó al aire mientras que se seguía extendiendo en el marco de tal manera que se volvieron fijos los haces de colágeno alineados. El tejido que contiene colágeno se extendió después, se comprimió y/o se estiró para crear una superficie lisa. El tejido de membrana de colágeno acabado se examinó después y se cortó hasta el tamaño usando un cortador láser.

Se llevó a cabo una SEM para caracterizar la morfología de la superficie de la membrana de colágeno comparado con otros tipos de membranas. En resumen, las muestras de tejido se recubrieron por pulverización catódica (*sputtering*) con 5 nm de platino grueso (unidad de recubrimiento por SEM, E 1020, Hitachi Science Systems Ltd., Japón) y se observaron ambos lados con un microscopio electrónico de barrido (S260, Leica, Cambridge, Inglaterra) con un voltaje bajo (20 kV).

La Figura 1 muestra la morfología de la superficie de la membrana de colágeno producida por los métodos de la presente invención (Tympacol™ denominado ACS en el presente documento) en comparación con otras membranas. La microscopía electrónica de barrido muestra la morfología de superficie de tres armazones (Panel A-C; ×500, D; ×200). Tympacol™ (denominado ACS en la Figura 1) posee dos superficies distintas, una superficie lisa que presenta haces de colágeno compacto (Panel A), y una superficie rugosa y porosa de fibras de colágeno sueltas (Panel B). La superficie con parche de papel (membrana) es irregular con cinco poros pequeños (Panel C). Gelfoam® muestra poros sustanciales de tamaños variables (Panel D). Barra de escala: 500 µm.

La Figura 2 muestra una imagen de microscopía electrónica de barrido (SEM) (X100) de una membrana de colágeno producida por el método anterior.

La Figura 3 muestra una imagen de microscopía electrónica de barrido (SEM) (X200) de un bioarmazón disponible comercialmente ("Bio-gide™") Luitpold Pharmaceuticals, Inc, Shirley, NY, EE.UU. Se puede observar que la disposición de los haces de colágeno en el Bio-gide™ es menos uniforme que Tympacol™.

La Figura 4 muestra una gráfica de barras que muestra una carga máxima media comparativa para una membrana de colágeno producida mediante los métodos de la presente invención y comercialmente Bio-gide™.

La Figura 5 muestra una gráfica de barras que muestra una extensión media comparativa en una carga máxima para una membrana de colágeno producida mediante los métodos de la presente invención y comercialmente Biogide™.

La Figura 6 muestra una gráfica de barras que muestra una carga media comparativa en un rendimiento para una membrana de colágeno producida por los métodos de la presente invención y comercialmente Bio-gide™.

La Figura 7 muestra una gráfica de barras que muestra una extensión media comparativa en un rendimiento para una membrana de colágeno producida por los métodos de la presente invención y comercialmente Bio-gide™.

Conclusiones

Se encontró que el método anterior tiene beneficios con respecto a los métodos ácidos-alcalinos tradiciones de tratamiento del tejido que contiene colágeno de la siguiente manera:

1) La incubación con una solución que comprende SDS al 1 % y LiCl al 0,2 % permiten la desnaturalización y eliminación de proteínas y ácidos nucleicos no colagénicos que se conocen por provocar una respuesta inflamatoria con otras membranas implantables.
2) El recubrimiento de glicina permite la separación de un tejido adiposo del tejido que contiene colágeno que, si no se elimina, provoca problemas con la flexibilidad del tejido.
3) El uso de HCl junto con el tiempo de incubación nos permitió producir una membrana con las propiedades mecánicas apropiadas sin el uso de agente reticulante tal como glutaraldehído.
4) Las fuerzas mecánicas aplicadas a la membrana de colágeno mientras que se fijó al marco permitió reordenar los haces de colágeno y fibras necesarias para la formación de la estructura especial.
5) El examen macro y microscópico en la dirección de los haces de colágeno en el y el tejido que contiene colágeno muestra una orientación estructural de haces de colágeno que hace el tejido más útil en estudios de implantación.

Ejemplo 2 Caracterización de membrana de colágeno comparado con otra membrana

Una muestra de 40 µm de grosor de Tympocol™ producida por el método en el Ejemplo 1, se usó en un ensayo clínico en comparación con las membranas disponibles comercialmente. Los productos comerciales incluían:

1). Parche de papel, que se obtuvo de papel de cigarrillo (Tally Ho, Imperial Tobacco Australia, Australia) y con un grosor de aproximadamente 20 µm, blanco y opaco;
2). Gelfoam® (esponja de gelatina absorbible, Pharmacia & Upjohn Inc, Nueva York, EE.UU.), es una esponja muy absorbente, no elástica que tiene un grosor de alrededor de 4 mm con el tamaño de poro variando entre 30-700 µm (Rohanizadeh et al., (2008), J. Materials Science; 19:1173-1182.

Ratas Sprague-Dawley macho, con un peso de 250-300 gramos, se usaron para el ensayo clínico de acuerdo con la aprobación ética animal institucional. Antes del estudio, se inspeccionaron todos los animales usando un otomicroscopio modelo S5 (Zeiss, Alemania) para confirmar que no tenían patología del oído medio. Se dividieron los animales aleatoriamente en cuatro grupos de reparación de armazones, específicamente, Tympocol™ (n=30), parche de papel (n=30), Gelfoam® (n=30) y control (cicatrización espontánea) (n=30). Además, un grupo de diez ratas (n=10) se asignaron como controles normales (sin ninguna perforación o armazón).

Todos los procedimientos quirúrgicos se realizaron con anestesia general con Ketamina intramuscular (80 mg/kg) y Medetomidina (0,5 mg/kg). El resto del canal auditivo externo se eliminó usando un espéculo aural de 3,0 mm y los canales auditivos externos se prepararon con solución de yodo povidona. Se crearon perforaciones de membrana timpánica (TM) bilaterales, que medían aproximadamente 1,8 mm de diámetro, usando una aguja estéril de calibre 23 en la mitad posterior mediante un enfoque transcanal. Cuatro materiales diferentes se recortaron en pedazos (2,4 mm de diámetro), se enjuagaron con solución salina tamponada con fosfato 1 × (pH 7,4) (Invitrogen, Shanghai, China), y se injertaron en la perforación de la TM derecha usando miringoplastia por la técnica de *onlay*. El oído izquierdo sirvió como control interno donde no se colocó ningún material de injerto sobre la TM perforada. A todas las ratas se les administró buprenorfina subcutánea (0,02-0,08 mg/kg) para analgesia postoperatoria.

La cicatrización de la TM de distintos grupos de tratamiento se evaluó por otoscopia, microscopía electrónica de barrido (SEM), histología y microscopía electrónica de transmisión (TEM), mientras que la función auditiva se analizó mediante respuestas auditivas troncoencefálicas (ABR). En cada grupo, las mismas cinco ratas (n=5) se seleccionaron aleatoriamente para evaluación otoscópica y de ABR a 3, 5, 7, 9, 14 y 28 días postoperatoriamente. En estos subgrupos de cinco ratas, tres se usaron para evaluación histológica y una para cada SEM y TEM.

Observación otoscópica

Para investigar la cicatrización de TM se estableció un modelo de rata preciso de perforación de TM. Cinco ratas de cada grupo se eligieron aleatoriamente en cada punto temporal para observación otoscópica usando un otoscopio de video digital (MedRX, Largo, FL) con anestesia general. Se observaron las TM mediante dos observadores independientes con respecto al cierre de la perforación, infección, miringoesclerosis, tejido de granulación y engrosamiento. Cada perforación de TM se graduó como completamente cerrada o no cerrada. Solo las TM que se cerraron completamente se consideraron cicatrizadas. Se grabaron imágenes digitales usando el software Aurisview (Ear Science Institute Australia, Subiaco, Australia).

SEM se llevó a cabo para evaluar el proceso de cicatrización de TM después de la reparación mediante los armazones. Brevemente, los especímenes de TM de rata se fijaron con glutaraldehído al 2,5 % a 4 °C durante una noche, se deshidrataron en soluciones de etanol seguido por secado de punto crítico (HCP-2, Hitachi, Tokio, Japón). Finalmente, las muestras se recubrieron con platino de 5 nm de grosor donde se observó la superficie medial de las TM con SEM.

Todas las ratas sobrevivieron a los procedimientos quirúrgicos sin complicaciones postoperatoriamente. El aspecto lateral de las TM se observó por medio de un otoscopio para evaluar el efecto del injerto en cada punto temporal. No se observaron signos de infección ni anomalías en ninguna de las ratas.

En el grupo de control, las TM aparecieron más gruesas y opacas después de la perforación, con microvasos prominentes visibles cerca del margen de perforación. A los 14 días, la TM se volvió cada vez más transparente y la mayoría de las perforaciones se cerraron completamente. A los 28 días, todas las perforaciones habían cicatrizado completamente, aunque se observaron cicatrices visibles que parecían un anillo opalescente en la zona de perforación. La semitransparencia de Tympocol™ permitió la observación directa de la cicatrización de la TM. En todo el proceso de cicatrización, Tympocol™ retuvo su estabilidad estructural y se adhirió bien a la TM remanente. La opacificación de TM y de los microvasos fue menos pronunciada en comparación con aquellas en el grupo de control. Las perforaciones habían cicatrizado tan pronto como 7 días después del injerto donde las TM cicatrizadas aparecieron normales. Por el contrario, el parche de papel y Gelfoam® fueron opacos, haciendo más difícil examinar el oído medio durante la cicatrización. Además, estos materiales tendieron a separarse fácilmente de la TM en cicatrización. En particular, el volumen de Gelfoam® disminuyó y su estructura porosa desapareció con el tiempo. A

los 28 días, las TM en los grupos de parche de papel y Gelfoam® aparecieron cicatrizadas pero algunas con algunas cicatrices.

Después del sacrificio en puntos temporales individuales, el cierre de la perforación se confirmó observando la superficie interna de las TM recogidas usando un otomicroscopio. La cicatrización de la TM en los grupos de Tympocol™ fue marcadamente más rápida en comparación con los otros grupos (Figura 10). El 60 % (3/5) de los oídos tratados con Tympocol™ cicatrizó completamente pero en el grupo de control no había cicatrizado ninguno (0/5) (p < 0,05). Después de 9 días, la TM había cicatrizado completamente en las cinco ratas en los grupos de Tympocol™ y parches de papel, lo que fue significativamente diferente en comparación con el grupo de control (2/5) (p < 0,05). A los 14 días, todos los oídos cicatrizaron completamente excepto una TM en el grupo de control (4/5). A los 28 días después de la cirugía, todas las perforaciones habían cicatrizado completamente.

Evaluación histológica

Después del sacrificio, ambos oídos externos se separaron en las uniones osteocartilaginosas y las TM junto con el anillo óseo se eliminaron de la bulla timpánica. Los especímenes recogidos se fijaron en formalina tamponada neutra al 10 % durante 24 horas seguido de descalcificación en solución de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) al 10 % (pH 7,4) durante dos a tres semanas. Las TM descalcificadas se deshidrataron en una serie de alcoholes graduados, introducidas en cera de parafina y seccionadas transversalmente con un grosor de 4 µm. Todas las secciones se evaluaron usando tinción con hematoxilina y eosina (H&E). La tinción tricrómica de Masson se llevó a cabo para examinar la morfología de las fibras de colágeno. Todos los portaobjetos teñidos se exploraron digitalmente usando un escáner de portaobjetos automático de Aperio ScanScope XT (Aperio Technologies Inc., Vista, CA; 40x/0.75 Plan Apo objective). Se guardaron las imágenes como TIFF para evaluación histológica. Los grosores de las TM de las secciones de TM cicatrizadas del día 14 y 28 se midieron usando el software Aperio ImageScope Viewer.

La histología de la cicatrización de las TM y los efectos de los cuatro armazones se examinaron después de 28 días. En comparación con otros grupos, la cicatrización de las TM en el grupo de control fue relativamente más lenta. En la primera semana, la perforación permaneció patente, mientras que la hiperplasia se observó en las capas del tejido epitelial y conectivo (TC) de la TM. En el día 5, se observó un espolón de keratina y las perforaciones empezaron a cerrarse en 9 días con un engrosamiento significativo a lo largo de las tres capas de TM. A los 28 días, las TM cicatrizadas se volvieron más delgadas pero con engrosamiento residual en la zona de perforación previa. La capa de TC se encontró que estaba desorganizada con fibras de colágeno empaquetadas libremente (Figura 8).

En el grupo tratado con Tympocol ™, la hiperplasia epitelial y la proliferación vascular fueron evidentes en las etapas tempranas. Las células infiltradas parecidas a fibroblastos fueron abundantes en la capa de TC con linfocitos ocasionales alrededor del injerto. A los 28 días, la TM cicatrizada apareció normal con una estructura trilaminar (Figura 8).

Por el contrario, numerosas células inflamatorias (predominantemente linfocitos) y exudado prominente se observó alrededor del parche de papel. Aunque se cicatrizó finalmente la perforación de la TM, la TM permaneció gruesa con desorganización de las fibras sintetizadas recientemente (Figura 8). Asimismo, Gelfoam® indujo la infiltración de células inflamatorias en la zona implantada. A diferencia de otros materiales, la proliferación de fibroblastos prominente y vasos sanguíneos rellenos de eritrocitos se encontraron en la capa de TC. Después de 28 días, la TM cicatrizada permaneció gruesa con fibras de colágeno desorganizadas atípicas en la capa de TC (Figura 8).

Las secciones transversales de la TM se usaron para cuantificar los cambios en el grosor de la TM después del tratamiento (Figura 8). A los 14 días, Las TM en todos los grupos eran sustancialmente gruesas en comparación con la normal TM (p < 0,05) excepto la TM tratada con SFS, que tuvo un grosor similar (14,13 ± 4,04 µm) hasta la TM normal (p > 0.05). A los 28 días, una diferencia estadísticamente significativa en los grosores de las TM se encontró en los grupos de control, de parche de papel y de Gelfoam® (p < 0,05). Sin embargo, no se observó ninguna diferencia estadísticamente significativa en los grosores de TM entre los grupos de Tympocol™ (8,55 ± 4,25 µm) comparado con la TM normal (p > 0,05).

Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

TEM se realizó para investigar la microestructura de las TM cicatrizadas en el día 28 después de la reparación. Brevemente, después de la disección, la zona de perforación de las muestras de TM recogidas se fijó en glutaraldehído al 2,5 % y se almacenaron durante una noche a 4 °C. Los especímenes de tejido se lavaron, se fijaron posteriormente (1 % de ácido ósmico), se deshidrataron y se introdujeron para la observación de la transmisión. Las secciones transversales delgadas se cortaron y examinaron con TEM (TECNAI 10, Philips Co., Países Bajos) a 80 kV.

La observación con TEM se llevó a cabo para investigar la ultraestructura de las TM cicatrizadas 28 días después de la cirugía. En TM tratadas con Tympocol™ y cicatrizadas espontáneamente, la capa de TC era moderadamente gruesa y la acumulación de fibroblastos fue aparente en comparación con la TM normal. En el grupo de Tympocol™, las tres capas de la TM se identificaron rápidamente, y la capa de TC fue compacta con haces de colágeno bien

orientados. Sin embargo, en los grupos de parche de papel y de Gelfoam®, las fibras de colágeno se dispusieron libre e irregularmente en la capa fibrosa, con un edema obvio observado.

El aspecto medial de las TM se observó con SEM para evaluar la fijación de armazones, la integración celular con cierre de perforación y armazón. Tympocol™ mostró fijación estable al margen de perforación a lo largo del proceso de cicatrización, conservando de este modo la función del armazón. Las células epiteliales de la TM migraron a través del margen de la herida y se adhirieron a la superficie interna de Tympocol™ en el día 5. A los 9 días, las TM del grupo de Tympocol™ habían cicatrizado y la superficie interna de las neomembranas era lisa. Por el contrario, el parche de papel demostró una separación parcial temprana de la superficie de la TM, pero su función de armazón desapareció parcialmente. La formación de exudados y la infiltración de células inflamatorias fue evidente en la zona de perforación en el grupo de papel. Gelfoam® mostró desintegración temprana de su estructura de esponja. La contracción y la absorción progresaron, la mayor parte de Gelfoam® se disolvió, dando como resultado una pérdida de su función de soporte. Las TM cicatrizadas en los grupos de papel y Gelfoam® mostraron alguna cicatriz a los 14 días. En el grupo de control sin implantación de armazón, un borde estirado de perforación de la TM no cicatrizada fue visible a los 9 días. La TM cicatrizó eventualmente a los 14 días, pero con una cicatriz obvia.

Respuestas auditivas troncoencefálicas (ABR)

Para evaluar la audición de ratas después de un injerto, se llevó a cabo ABR (del inglés: *Auditory Brainstem Responses*) usando el sistema de medición Nihon Kohden Neuropack-μ (MEB-9100, Nihon Koden, Japón) en una sala insonorizada. Las ratas fueron anestesiadas antes de la evaluación tal como se ha descrito anteriormente. Los electrodos de aguja subdérmica de platino se insertaron en el vértice del cuero cabelludo (electrodo activo), ambos mastoides (electrodo de referencia) y en la punta de la nariz (electrodo de tierra). Los estímulos de prueba (chasquido) con 0,1 ms de duración se presentaron a través de un auricular de inserción. Los animales se presentaron con una serie de intensidades de estímulos desde 90 hasta 0 dB de nivel de presión sonora (SPL en inglés: *Sound Pressure Level*) en decrecimientos de 10 dB. Un total de 512 respuestas se promediaron en cada serie de estímulos sobre un periodo de análisis de 10 ms. Los umbrales se definieron como la intensidad más baja para obtener una longitud de onda de ABR reproducible con una morfología típica de onda III u onda IV. Los umbrales auditivos de estímulos de chasquidos se midieron antes y después de la perforación de la TM en el oído derecho de todas las ratas, y en cada punto temporal después de la miringoplastia para los cinco animales de cada grupo. Los oídos normales y los oídos con perforación de TM sin materiales sirvieron como controles.

Los umbrales auditivos fueron similares en todos los grupos de tratamiento en los que se midió antes de la perforación ($p > 0,05$) así como después de la perforación ($p > 0,05$). El umbral auditivo promedio de una rata normal fue 15,0 dB y este aumentó significativamente hasta 29,5 dB después de la perforación, lo que indicaba que la perforación de la TM provocó una pérdida auditiva significativa ($p < 0,01$). La evaluación audiométrica usando ABR demostró la recuperación de audición para todos los grupos después del tratamiento (Figura 9). La recuperación de audición se definió como la diferencia entre el umbral auditivo inmediatamente después de la perforación (antes de la reparación) y en puntos temporales específicos después del injerto (después de la reparación). El umbral auditivo de todas las ratas se recuperó con el tiempo, y se observaron diferencias significativas cuando se compararon entre tratamientos diferentes ($p < 0,01$). De manera más evidente, la audición en los animales tratados con Tympocol™ se recuperó significativamente más rápido en comparación con aquellas tratadas con parche de papel ($p < 0,01$), Gelfoam® ($p < 0,01$) y cicatrización espontánea ($p < 0,01$).

Análisis estadístico

Los índices de cicatrización determinados mediante observación otoscópica se compararon usando la prueba de chi-cuadrado (χ^2). El análisis estadístico para ABR y el grosor de TM se evaluó usando análisis unidireccional de varianza (ANOVA) mientras que la recuperación de audición en cada grupo con el tiempo se llevó a cabo usando análisis de regresión lineal múltiple. Todos los análisis se llevaron a cabo usando el software Statistical Software R (Versión 2.11.1, paquete meta). La relevancia estadística se definió como $p < 0,05$.

Conclusión

Este estudió demostró que la membrana de colágeno de la presente invención (Tympocol™) acortó significativamente el tiempo de cierre de una perforación y promovió la cicatrización de heridas de la TM en comparación con dos armazones usados comúnmente (parche de papel y Gelfoam®) y la cicatrización espontánea en un modelo de rata. Las TM cicatrizadas en los grupos de Tympocol™ mostraron morfología mejorada con la regeneración de fibras de colágeno compactas, retorno rápido a un grosor de TM normal, así como la recuperación de audición completa en una etapa temprana en comparación con otros grupos. Como las finalidades de un tratamiento quirúrgico para la perforación de la TM son lograr un cierre completo de la perforación y restauración de la audición, estos resultados sugieren que Tympocol™ es eficaz y servirá como un armazón ideal para restaurar tanto la cicatrización de la TM como la audición. La biocompatibilidad de un armazón es un elemento importante que se debe considerar, puesto que una respuesta inflamatoria después de la aplicación de biomateriales puede conducir a un fracaso en cirugía. El colágeno se conoce también por suscitar una respuesta inflamatoria y antigénica mínima (Pachence, (1996), J. biomed. Mat. Res.; 33:35-40). En este estudio, el Tympocol™ aceleró y mejoró la

cicatrización de la TM, parcialmente atribuida a una respuesta inflamatoria en las zonas de implantación. En este estudio, se mostró que el Tympocol™ logró una recuperación de audición significativamente más rápida en comparación con otros grupos. Se postula que esta mejora resulta de una organización mejorada de las fibras de colágeno de las TM cicatrizadas y la remodelación temprana para lograr un grosor comparable a una TM normal.

Se encontró que Tympocol™ es fácil de manipular durante la cirugía puesto que no es frágil como el papel ni voluminoso o esponjoso como Gelfoam®. Además, la transparencia de Tympocol™ permitió la observación directa de la TM, mientras que la opacidad del papel y Gelfoam® obstruyó la visibilidad directa de la cicatrización de la TM. Desde un punto de vista clínico, estas características hacen que Tympocol™ sea más favorable en comparación con el papel y Gelfoam®.

REIVINDICACIONES

1. Un método de producción de una membrana de colágeno que comprende las etapas de:

(i) aislar un tejido que contiene colágeno e incubar el mismo en una solución de etanol, preferentemente una solución de etanol que comprende más del 70 % de etanol;
(ii) incubar el tejido que contiene colágeno de la etapa (i) en una primera solución que comprende una sal inorgánica y un tensioactivo aniónico para desnaturalizar las proteínas no colagénicas contenidas en el mismo;
(iii) incubar el tejido que contiene colágeno producido en la etapa (ii) en una segunda solución que comprende un ácido inorgánico hasta que el colágeno en dicho tejido se desnaturalice; y
(iv) incubar el tejido que contiene colágeno producido en la etapa (iii) en una tercera solución que comprende un ácido inorgánico con estimulación mecánica simultánea durante un tiempo suficiente para permitir que los haces de colágeno en dicho tejido que contiene colágeno se alineen; en donde la estimulación mecánica comprende aplicar tensión cíclicamente al tejido que contiene colágeno.

2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la sal inorgánica en la primera solución es capaz de formar un complejo con los ácidos de Lewis; y se selecciona preferentemente entre el grupo que consiste en cloruro de trimetilamonio, cloruro de tetrametilamonio, cloruro de sodio, cloruro de litio, perclorato y trifluorometanosulfonato.

3. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde la sal inorgánica es cloruro de litio (LiCl).

4. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el tensioactivo aniónico en la primera solución se selecciona entre el grupo que consiste en alquil sulfatos, alquil éter sulfatos, alquil sulfonatos y alquil aril sulfonatos; preferentemente el tensioactivo aniónico es dodecil sulfato de sodio (SDS).

5. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la primera solución comprende SDS al 1 % (v/v) y LiCl al 0,2 % (v/v).

6. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la incubación en la etapa (ii) es a 4 ºC y se realiza preferentemente durante al menos 12 horas.

7. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la segunda solución comprende HCl al 0,5 % (v/v).

8. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la incubación en la etapa (iii) se realiza durante 30 minutos; preferentemente con agitación.

9. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde la tercera solución comprende una solución de HCl al 1 % (v/v).

10. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde la incubación en la etapa (iv) se realiza durante 12 a 36 horas; preferentemente durante 24 horas; y preferentemente con agitación.

11. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que comprende además una etapa de neutralización entre la etapa (iii) y la etapa (iv) que comprende la incubación de dicho tejido que contiene colágeno con NaOH al 0,5 % (v/v).

12. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, que comprende además la etapa (v) que comprende incubar el tejido que contiene colágeno de la etapa (iv) con acetona y después secar el tejido que contiene colágeno.

13. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde entre las etapas (ii) y (iii) y/o entre las etapas (iii) y (iv) el tejido que contiene colágeno se pone en contacto con glicerol para visualizar y facilitar la eliminación de grasa y/o vasos sanguíneos.

14. Un método de acuerdo con la reivindicación 13, en donde el glicerol se pone en contacto con el tejido que contiene colágeno durante al menos 10 minutos.

15. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en donde entre las etapas (ii) y (iii) y/o entre las etapas (iii) y (iv) se lava el tejido que contiene colágeno; preferentemente el lavado usado entre las etapas (ii) y (iii) es acetona para eliminar las proteínas desnaturalizadas.

16. Un método de acuerdo con la reivindicación 15, en donde el tejido que contiene colágeno se lava adicionalmente después de la acetona con agua estéril; y preferentemente se lava adicionalmente en una solución de NaOH:NaCl.

17. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en donde después de la etapa (iv) el tejido que contiene colágeno se lava con agua estéril.

18. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, en donde el tejido que contiene colágeno comprende tejido conectivo denso; preferentemente el tejido que contiene colágeno se aísla de una oveja, de una vaca, de un cerdo o de un ser humano.

19. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, en donde el tejido que contiene colágeno es autólogo.

20. Un tejido que contiene colágeno producido por el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, en donde dicho tejido comprende más del 80 % (p/p) de haces o fibras de colágeno de tipo I que tienen una estructura tejida y un módulo de más de 300 MPa; y preferentemente una extensión en carga máxima de menos del 85 %.

21. Un tejido que contiene colágeno de acuerdo con la reivindicación 20, que comprende más del 90 % (p/p) de colágeno de tipo I y preferentemente, más del 80 % de fibras o haces de colágeno de tipo I que tienen una estructura tejida y con una extensión en carga máxima de menos del 80 %.

22. Un tejido que contiene colágeno de acuerdo con la reivindicación 20 o 21 para el uso en la reparación de un defecto de tejido en un animal mamífero.

23. Un tejido que contiene colágeno para su uso de acuerdo con la reivindicación 22, en donde el animal mamífero es un ser humano.

24. Un tejido que contiene colágeno para su uso de acuerdo con la reivindicación 22 o 23, en donde el tejido que contiene colágeno tiene un grosor de 40 µm.

25. Un tejido que contiene colágeno para su uso de acuerdo con la reivindicación 22 o 23, en donde el defecto de tejido es una perforación de la membrana timpánica.

26. Un método para preparar un dispositivo para la implantación en el cuerpo o tejido de una persona o animal, dicho método comprendiendo la colocación de una membrana de colágeno en dicho dispositivo, en donde dicha membrana de colágeno se produce por un método de acuerdo con la reivindicación 1.

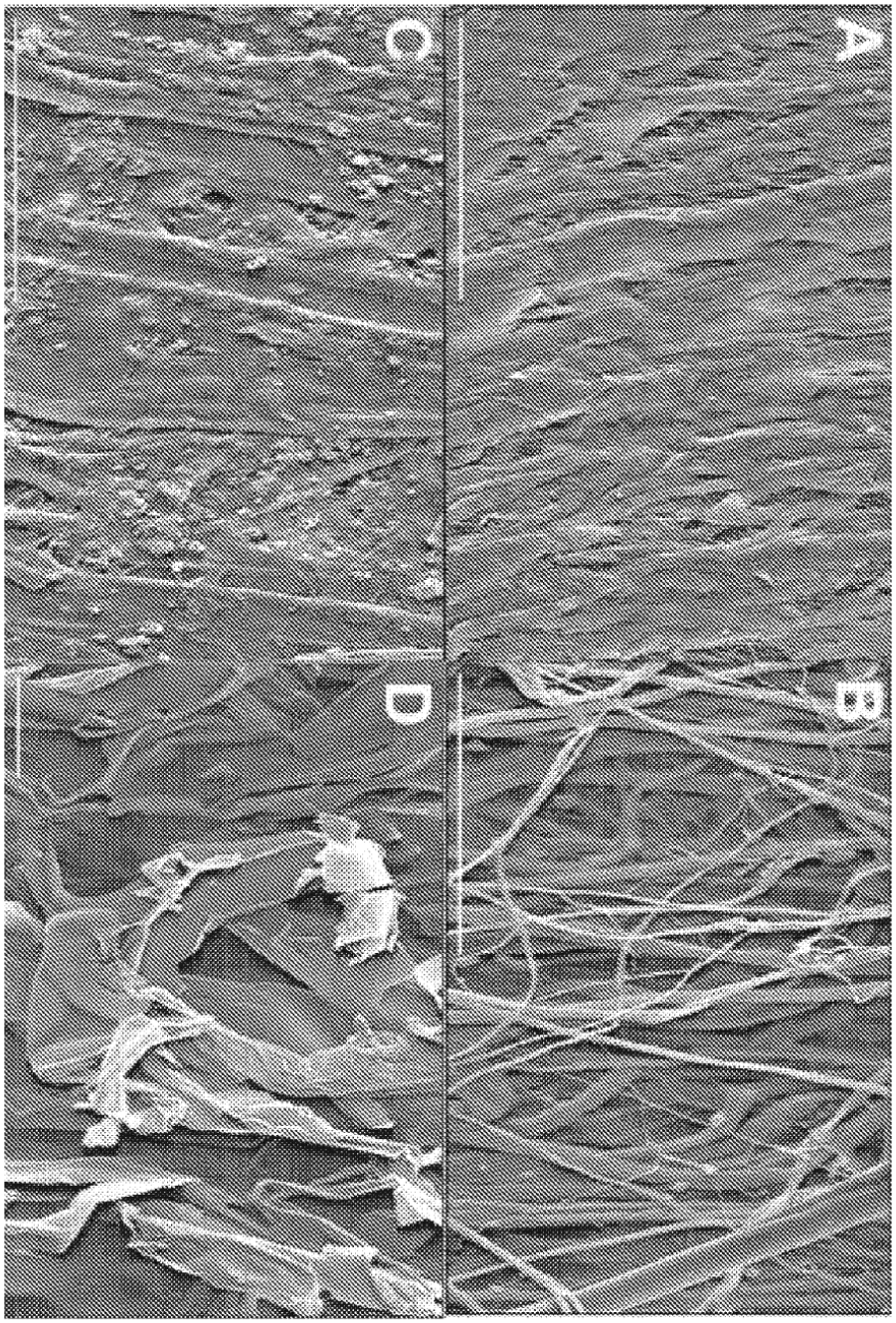


Figura 1

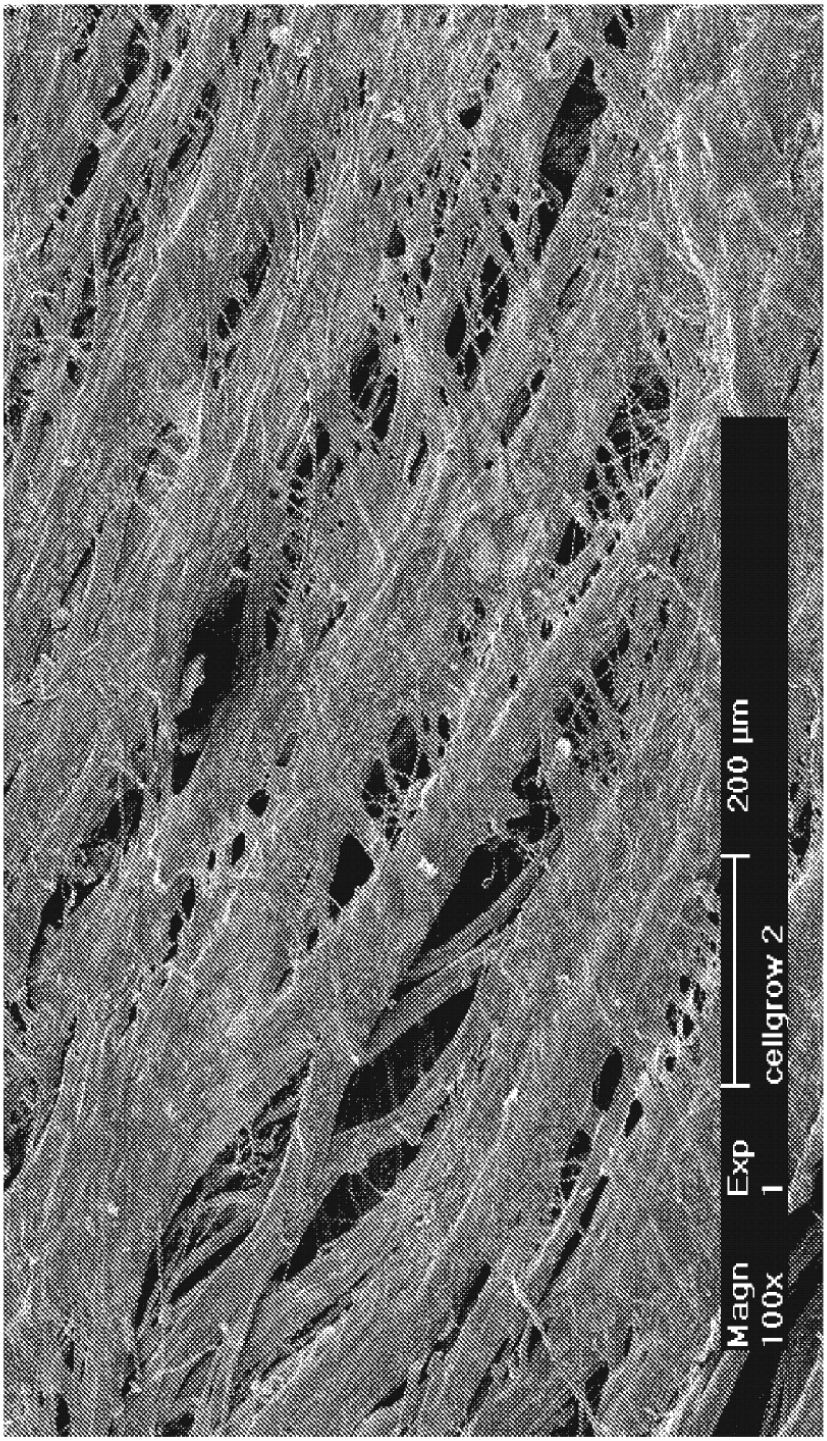


Figura 2

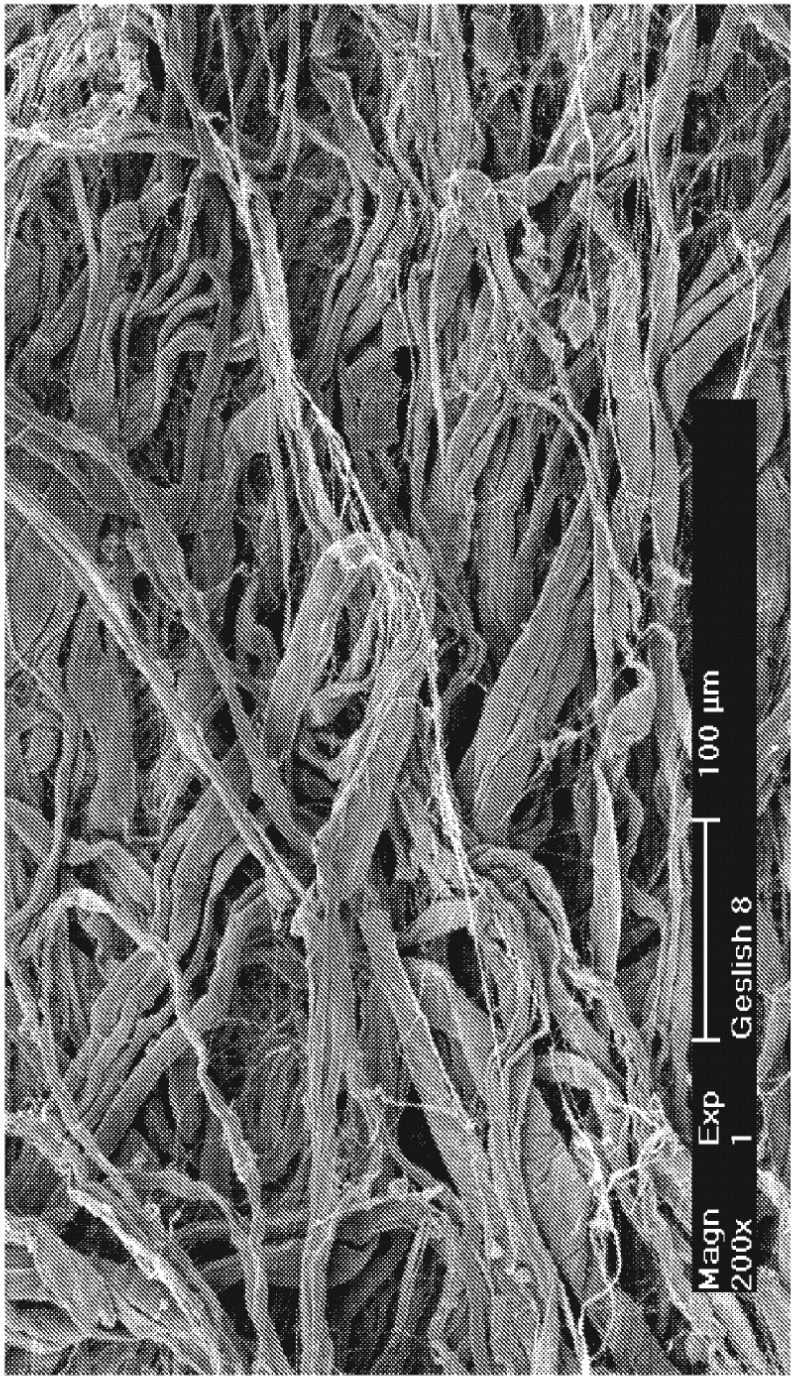


Figura 3

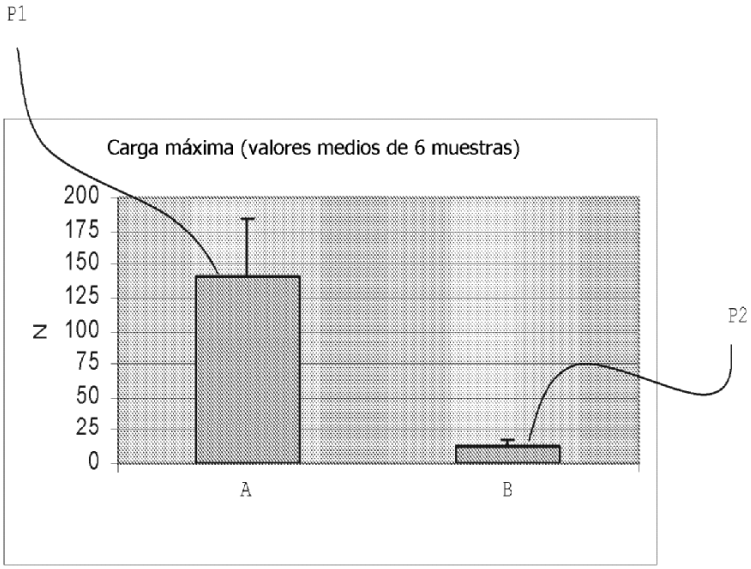

P1
Carga máxima (valores medios de 6 muestras)
200
175
150
125
N 100
75
50
25
0
A
B
P2

Figura 4

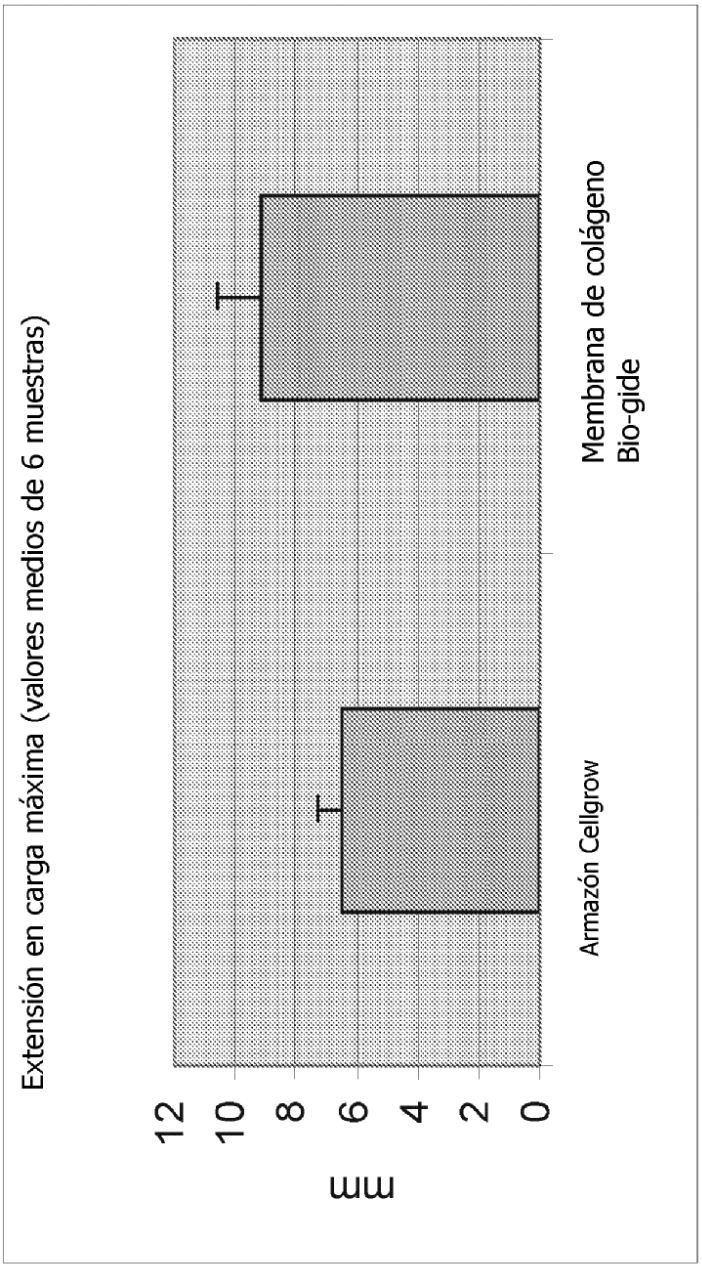
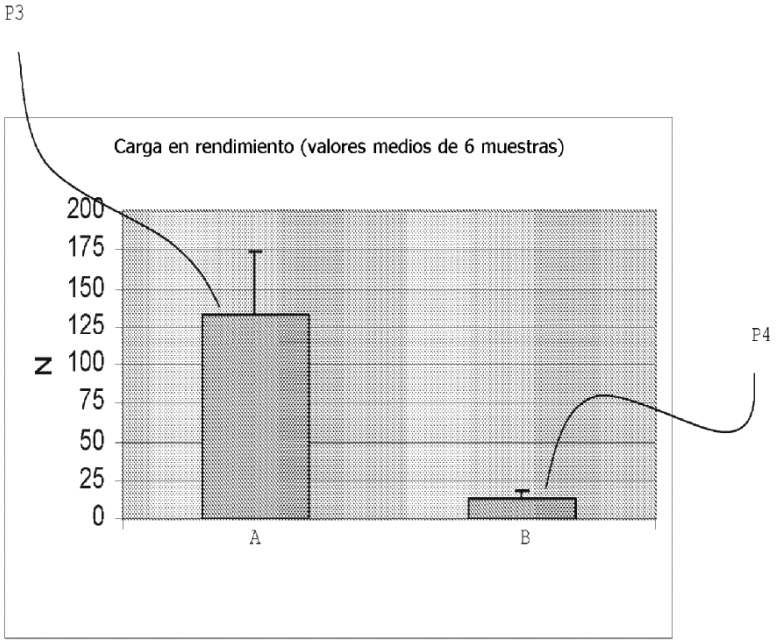

Extensión en carga máxima (valores medios de 6 muestras)
mm
12
10
8
6
4
2
0
Armazón Cellgrow
Membrana de colágeno
Bio-gide

Figura 5

Figura 6


P3
Carga en rendimiento (valores medios de 6 muestras)
200
175
150
125
N
100
75
50
25
0
A
B
P4

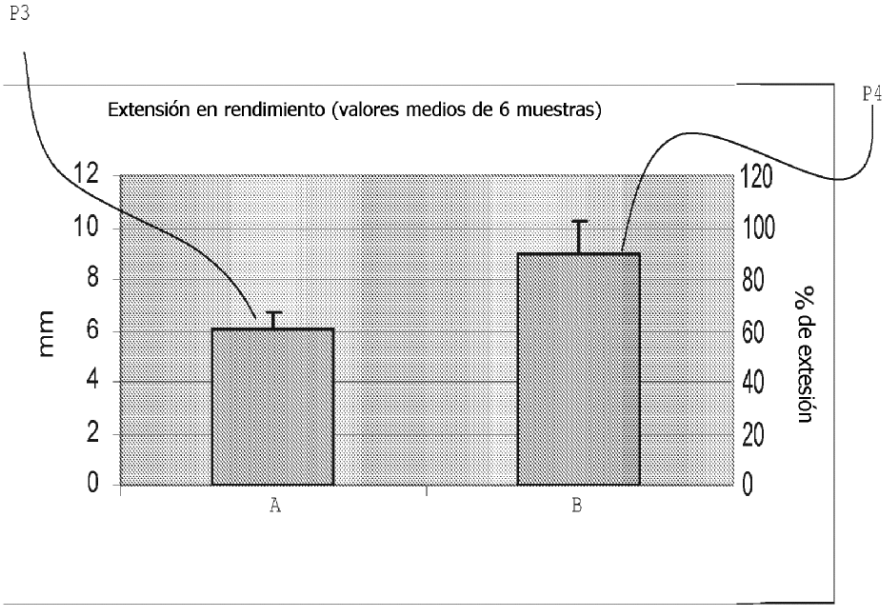

P3
P4
Extensión en rendimiento (valores medios de 6 muestras)
mm
12
10
8
6
4
2
0
% de extesión
120
100
80
60
40
20
0
A
B

Figura 7

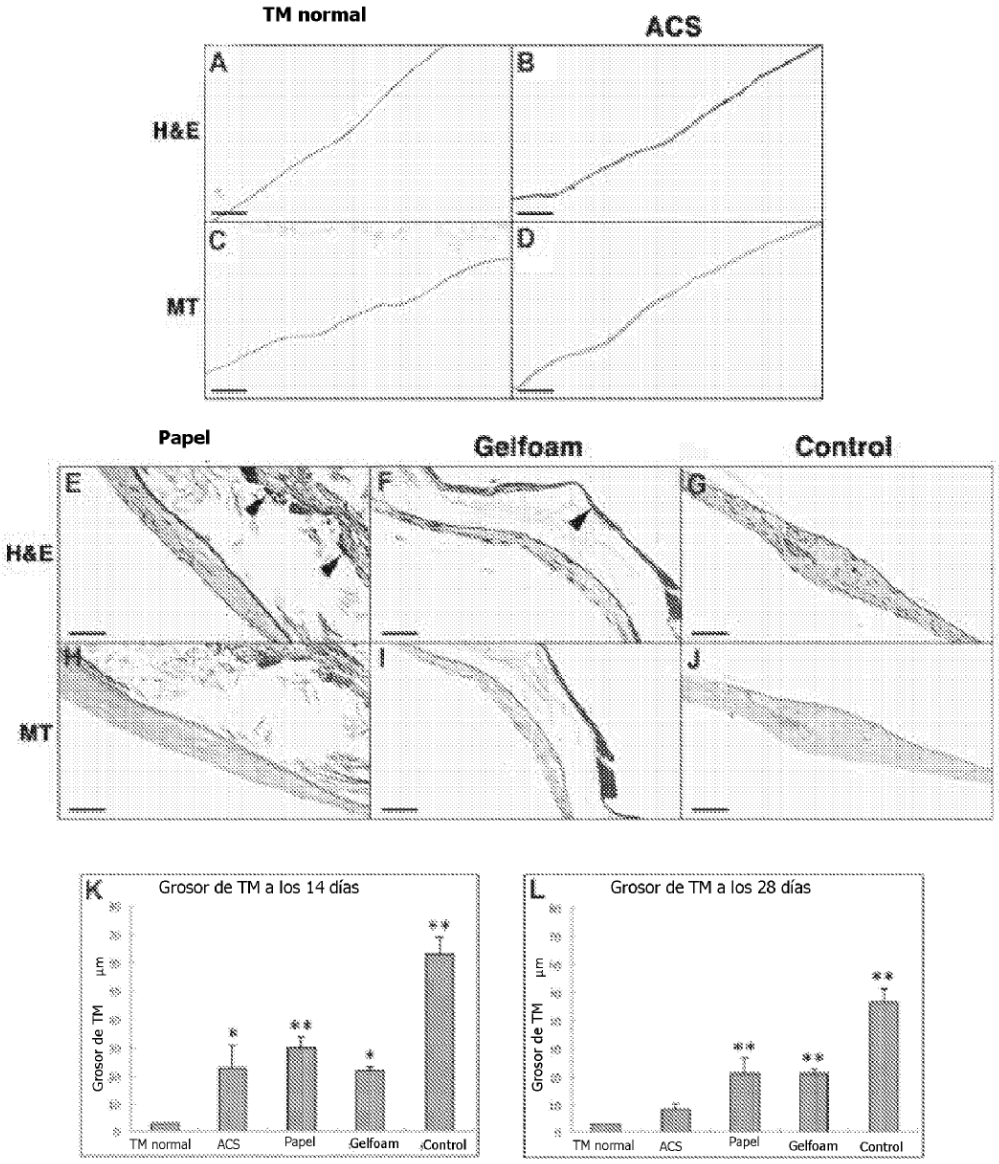

TM normal
ACS
A
B
H&E
C
D
MT
Papel
Gelfoam
Control
E
F
G
H&E
H
I
J
MT
K
Grosor de TM a los 14 días
Grosor de TM µm
TM normal
ACS
Papel
Gelfoam
Control
L
Grosor de TM a los 28 días
Grosor de TM µm
TM normal
ACS
Papel
Gelfoam
Control

Figura 8

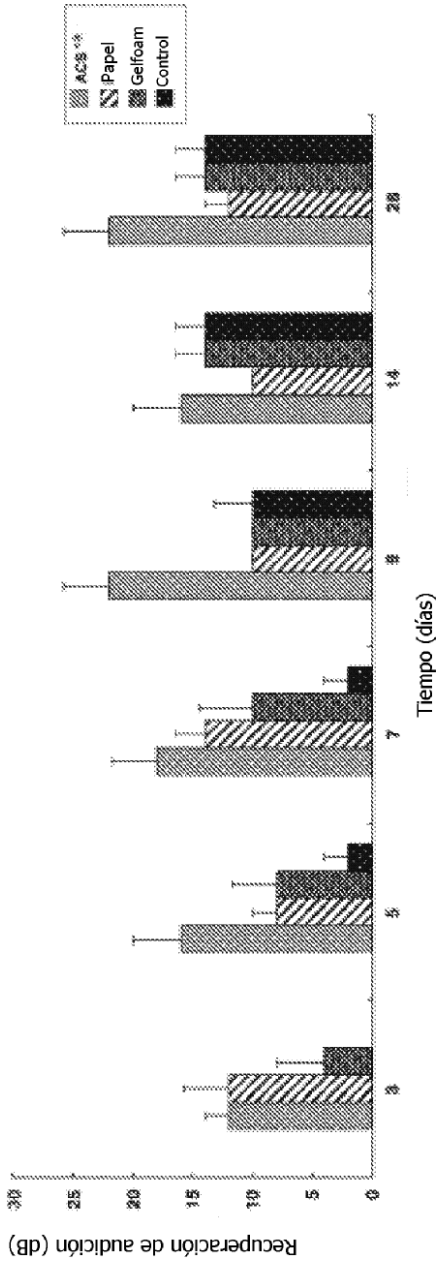

ACS
Papel
Gelfoam
Control
30
25
20
15
10
5
0
Recuperación de audición (dB)
3
5
7
10
14
28
Tiempo (días)

Figura 9

Grupo	*3 días* (*n*=5)	*5 días* (*n*=5)	*7 días* (*n*=5)	*9 días* (*n*=5)	*14 días* (*n*=5)	*28 días* (*n*=5)
ACS	0/5 (0,0%)	0/5 (0,0%)	3/5 (60,0%)*	5/5 (100%)*	5/5 (100%)	5/5 (100%)
Parche de papel	0/5 (0,0%)	0/5 (0,0%)	2/5 (40,0%)	5/5 (100%)*	5/5 (100%)	5/5 (100%)
Gelfoam	0/5 (0,0%)	0/5 (0,0%)	0/5 (0,0%)	3/5 (60,0%)	5/5 (100%)	5/5 (100%)
Control	0/5 (0,0%)	0/5 (0,0%)	0/5 (0,0%)	2/5 (40,0%)	4/5 (80,0%)	5/5 (100%)

*p<0,05, diferencia estadísticamente significativa entre el control (cicatrización espontánea) y el otro armazón

Figura 10