

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 742 530**

51 Int. Cl.:

A61L 27/36 (2006.01)

A61L 31/04 (2006.01)

A61F 2/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.06.2015 PCT/KR2015/005925**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.12.2015 WO15190860**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.06.2015 E 15806752 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.05.2019 EP 3154600**

54 Título: **Biomembrana artificial que utiliza un capullo y método para la fabricación de la misma**

30 Prioridad:

13.06.2014 KR 20140071972

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

14.02.2020

73 Titular/es:

**REPUBLIC OF KOREA MANAGEMENT: RURAL
DEVELOPMENT ADMINISTRATION (100.0%)
300 Nongsaengmyeon-ro, Wansan-gu
Jeonju-si, Jeollabuk-do 560-500, KR**

72 Inventor/es:

**JO, YOU YOUNG;
KWEON, HAE YONG;
LEE, KWANG GILL;
YEO, JOO HONG;
LEE, HEUI SAM y
KIM, HYUN BOK**

74 Agente/Representante:

RIZZO , Sergio

ES 2 742 530 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

Biomembrana artificial que utiliza un capullo y método para la fabricación de la misma

Campo técnico

5 [0001] La presente invención se refiere a una biomembrana que utiliza capullo, y a un método de fabricación de la misma. Más concretamente, la presente invención hace referencia a una biomembrana artificial a base de capullo que es biocompatible y que presenta un excelente potencial de crecimiento celular, y a un método para la fabricación de la misma.

[0002] Además, la presente invención se refiere a una biomembrana que presenta una excelente resistencia a la tensión y elongación, y a un método de fabricación de la misma.

10 **Estado de la técnica**

[0003] De entre diversos materiales para aplicaciones biomédicas, el colágeno derivado de animales presenta una alta biocompatibilidad e histocompatibilidad. Asimismo, el colágeno posee actividad hemostática, y es biodegradable y se absorbe completamente *in vivo*.

15 [0004] Dicho colágeno se puede aislar y purificar a partir de tejidos conectivos de diversos órganos de animal, incluyendo piel, hueso, cartilago, tendón, etc., mediante acidólisis, alcalinólisis, hidrólisis neutra o enzimólisis.

[0005] Los colágenos extraídos de manera convencional para materiales biomédicos presentan un nivel molecular de monómeros u oligómeros y se almacenan en forma de polvo o líquido.

20 [0006] Debido a que sus moléculas de colágeno se descomponen hasta el grado de monómeros u oligómeros, los colágenos extraídos de manera convencional se transforman rápidamente en sólidos tras su exposición a agua, fluido corporal o sangre.

[0007] Para resultar útil como material biomédico en el organismo, los colágenos necesitan dureza en cierta medida. Para ello, se aplican colágenos en materiales poliméricos sintéticos como el nailon, la silicona, etc. Además, o de manera alternativa, un injerto hecho de colágeno extraído se cura químicamente con un agente reticulante o físicamente con radiación, como radiación de electrones o radiación UV, o con calor con el fin de
25 mantener su forma durante un período predeterminado de tiempo tras su aplicación en el organismo.

[0008] No obstante, cuando el colágeno se combina con materiales poliméricos sintéticos, los materiales poliméricos sintéticos permanecen como materia extraña en el cuerpo tras la degradación del colágeno y, por lo tanto, son propensos a provocar efectos secundarios como formación de bulbos, inflamación, etc. Por lo tanto, no se pueden aplicar materiales poliméricos sintéticos en ninguna célula u órgano.

30 [0009] A pesar de que los materiales de colágeno están reticulados, sus propiedades físicas, especialmente la resistencia a la tensión, no mejoran de manera significativa. Por lo tanto, aunque el colágeno se someta a un tratamiento de procesamiento, es imposible utilizarlo como material biomédico, precisando sutura.

[0010] Además, un agente reticulante, como glutaraldehído o epoxi, cuando se utiliza solo, puede no solo ejercer toxicidad en el organismo, sino también degradar las propiedades bioquímicas inherentes del colágeno, especialmente los efectos de promoción sobre el crecimiento celular.
35

[0011] La reticulación física no garantiza suficientes propiedades físicas para el injerto de colágeno. Con la reticulación física, resulta también difícil dotar al colágeno de una tasa de absorción adecuada *in vivo*.

40 [0012] Tras realizar una operación quirúrgica en diversos órganos, incluyendo el cerebro, para tratar distintas enfermedades o lesiones, el sitio quirúrgico, p. ej., duramadre, pericardio, pleura, peritoneo, o serosa, deben o pueden sellarse mediante sutura. Debido a que se produce contracción en el sitio de sutura o la membrana se disecciona al menos parcialmente, el sitio quirúrgico no se puede sellar por completo y la membrana, en su mayor parte, se ve afectada.

[0013] Si se ignora el defecto, el órgano, tal como el cerebro, el corazón, el pulmón, el intestino, etc., puede sobrepasar el defecto, produciendo complicaciones más serias, o bien el órgano o su área circundante se expone al agua o al aire, lo cual afecta a la cicatrización del sitio quirúrgico.
45

[0014] Con el fin de solventar estos problemas, de manera conveniente, se utiliza duramadre liofilizada de cadáver humano, o una película de politetrafluoroetileno (EPTFE) expandido, una malla de polipropileno, una lámina de teflón o una lámina de Dacron como complemento para el defecto.

50 [0015] Sin embargo, cuando se utilizan estas biomembranas artificiales convencionales, por ejemplo, en duramadre humana, se puede provocar su adhesión al parénquima cerebral, lo cual puede dar como resultado la aparición de epilepsia postoperatoria. En concreto, las películas de EPTFE no se degradan, sino que permanecen como materiales extraños que probablemente median en la infección. Además, cuando los tejidos están en contacto con las películas de EPTFE, las células experimentan una degradación grasa. Como tales, las biomembranas artificiales convencionales son propensas a provocar complicaciones postoperatorias.

[0016] Actualmente, las investigaciones se han dirigido al desarrollo de materiales para biomembranas que se pueden suturar al mismo tiempo que se mantienen las propiedades bioquímicas y que pueden mantener formas previstas durante un período predeterminado de tiempo tras la aplicación *in vivo*.

5 [0017] En lo que respecta a la técnica relacionada, se puede hacer referencia a la solicitud de publicación de patente coreana no examinada n.º 10-2002-0036225 (presentada el 16 de mayo de 2002, titulada «Biomembrane Dressing for Healing Dermal Wound and Infection») publicada como KR20020036225 y la patente coreana n.º 10-1280722 (presentada el 25 de junio de 2013, titulada «Thin film multilocular structure made of collagen, member for tissue regeneration containing the same, and method for producing the same»).

10 [0018] En el documento JP H06 166850 se describe un método para formar una película fina, homogénea, transparente, práctica e inocua a partir de una solución de capullo. El método comprende disolver capullo de gusano de seda en un ácido haloacético. Se desprende una membrana fibrosa con múltiples capas que forma un capullo, se disuelve con el ácido y a continuación se solidifica hasta formar una capa fina.

Descripción de la invención

Problema técnico

15 [0019] Un objeto de la presente invención es proporcionar una biomembrana biocompatible a base de capullo de gusano de seda que pueda fabricarse simple y relativamente de una manera más rentable que las biomembranas artificiales convencionales, y que presente un excelente potencial de crecimiento celular, y un método para la fabricación de la misma.

20 [0020] Otro objeto de la presente invención es proporcionar una biomembrana artificial a base de capullo de gusano de seda que presente una excelente resistencia a la tensión y elongación, y un método para la fabricación de la misma.

25 [0021] A continuación, se describirán con más detalle formas de realización de la presente invención con referencia a los dibujos adjuntos. Estas formas de realización se describirán con más detalle para permitir que los expertos en la materia pongan en práctica la presente invención. Se ha de tener en cuenta que varias formas de realización de la presente invención son diferentes, pero no son necesariamente exclusivas.

Solución al problema

30 [0022] Para lograr los objetivos anteriores, un aspecto de la presente invención proporciona una biomembrana artificial a base de capullo de gusano de seda según se describe en las reivindicaciones 1-9. La biomembrana artificial a base de capullo de gusano de seda se prepara dividiendo un capullo que presenta un primer grosor de cáscara en dos o más fragmentos con una forma predeterminada.

[0023] En un ejemplo de forma de realización de la presente invención, cada uno de los fragmentos se delamina en un fragmento laminar con un segundo grosor, siendo el segundo grosor más pequeño que el primer grosor.

[0024] En otro ejemplo de forma de realización de la presente invención, el fragmento laminar con un segundo grosor es un estrato interno, medio o externo del capullo.

35 [0025] En otro ejemplo de forma de realización de la presente invención, el fragmento laminar está esterilizado o compactado.

40 [0026] De acuerdo con otro aspecto de la misma, la presente invención proporciona un método según la reivindicación 10 para fabricar una biomembrana artificial a base de capullo de gusano de seda que comprende un fragmento de un capullo de gusano de seda, comprendiendo una primera etapa de división de un capullo en dos o más fragmentos de una forma predeterminada, presentando el capullo una cáscara con un primer grosor.

[0027] En un ejemplo de forma de realización de la presente invención, el método puede comprender, además, una segunda etapa de delaminación de cada uno de los fragmentos en un fragmento laminar con un segundo grosor, siendo el segundo grosor más pequeño que el primer grosor.

45 [0028] En otro ejemplo de forma de realización de la presente invención, el método puede comprender, además, una tercera etapa de compactación de los fragmentos del segundo grosor preparados en la segunda etapa.

[0029] En otro ejemplo de forma de realización de la presente invención, el método puede comprender, además, llevar a cabo la esterilización antes o después de cada etapa.

[0030] En otro ejemplo de forma de realización de la presente invención, el fragmento laminar con un segundo grosor es una capa interna, media o externa del capullo.

50 Efectos ventajosos de la invención

[0031] La biomembrana artificial de la presente invención es biocompatible, no solo porque presenta una elevada resistencia a la tensión y elongación, que son necesarias para las biomembranas, sino también porque muestra un excelente potencial de crecimiento celular. Además, la biomembrana artificial se puede preparar fácilmente y, por lo tanto, de manera rentable en comparación con las biomembranas artificiales convencionales.

Breve descripción de los dibujos

[0032]

La figura 1 es una vista esquemática que ilustra un proceso de fabricación de una biomembrana artificial a base de capullo según una forma de realización de la presente invención;

5 La figura 2 es una vista esquemática que ilustra el proceso de fabricación de una biomembrana artificial a base de capullo según una forma de realización modificada de la presente invención;

La figura 3 muestra morfologías de fragmentos de capullo utilizadas en las biomembranas artificiales de la presente invención;

10 La figura 4 es un gráfico que muestra una propiedad mecánica (resistencia a la tensión) de la biomembrana artificial a base de capullo de la presente invención; y

La figura 5 es un gráfico que muestra los potenciales de crecimiento celular de las biomembranas artificiales a base de capullo de la presente invención.

Mejor modo para llevar a cabo la invención

15 **[0033]** A no ser que se especifique lo contrario, los términos y las técnicas utilizados en la memoria descriptiva se deberían definir para tener los mismos significados aceptados generalmente en la técnica a la que pertenece la presente invención.

20 **[0034]** A menos que se defina otra cosa, todos los términos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el que entiende normalmente un experto en la materia a la que pertenecen los ejemplos de formas de realización. Se entenderá además que los términos, p. ej., los que se definen en diccionarios de uso general, se deben interpretar con un significado que sea coherente con su significado en el contexto de la técnica pertinente y no se interpretarán en un sentido demasiado formal o idealizado a menos que se defina expresamente de este modo en el presente documento.

25 **[0035]** El término «biomembrana» o «membrana biológica», según se utiliza en el presente documento, hace referencia a una membrana de cierre o de separación entre organismos vivos, como membranas celulares, y membranas de orgánulos. Es decir, al servir como una barrera permeable de manera selectiva para un entorno exterior, una biomembrana actúa para impedir la liberación externa de ácidos nucleicos, proteínas y otras biomoléculas y para construir un espacio independiente en el que se produzcan diversas actividades biológicas. Además, una membrana celular protege a la célula frente a factores externos, y actúa como paso para el transporte de material entre el citoplasma y el entorno exterior.

30 **[0036]** Para su uso como una alternativa a una biomembrana, una biomembrana artificial debe mantener la forma prevista de la misma durante un período predeterminado de tiempo tras la aplicación al organismo. Es importante que la biomembrana artificial debe evitar la adhesión a tejidos que rodeen el sitio quirúrgico tras la operación quirúrgica, mediación de infección y degeneración tisular, y debe potenciar la regeneración.

35 **[0037]** Las biomembranas artificiales se pueden utilizar en diversos campos, incluyendo tubos neurales artificiales, columnas cervicales de médula artificiales, esófago artificial, bronquios artificiales, vasos artificiales, válvulas artificiales, duramadre artificial y tímpanos artificiales.

40 **[0038]** Para obtener estas propiedades, las biomembranas artificiales utilizadas hasta ahora requieren procesos de pretratamiento, como la reticulación física, etc. Sin embargo, tales biomembranas artificiales pretratadas pueden ser tóxicas para el cuerpo y permanecer como material extraño tras su uso a largo plazo *in vivo*. Además, otro inconveniente es que los procesos de pretratamiento y las sustancias químicas utilizadas para ello incrementan el coste de producción de las biomembranas artificiales.

45 **[0039]** En cuanto a la presente invención, una investigación intensa y exhaustiva en una biomembrana artificial, llevada a cabo por el presente inventor, dio como resultado el descubrimiento de que un fragmento preparado a partir de un capullo es biocompatible y resulta útil como una biomembrana no solo porque presente una elevada resistencia a la tensión y elongación, sino porque también muestra un excelente potencial de crecimiento celular, y que el fragmento se puede producir con un coste significativamente menor, en comparación con las biomembranas artificiales convencionales.

[0040] Con referencia a la figura 1, se explica a continuación un método para fabricar una biomembrana artificial a base de capullo según la presente invención.

50 1. Etapa 1: Preparación de fragmento de capullo con primer grosor

[0041] Como se muestra en la figura 1A, se prepara un capullo 10, cuya cáscara presenta un primer grosor.

[0042] Un capullo es una pieza fundida por centrifugación de seda por medio de gusanos de seda y se utiliza como un material de fibras de seda. En la presente invención, los capullos, que pueden ser recursos sin utilizar,

se reciclan para utilizarse en un nuevo producto con alto valor añadido, implicando así beneficios económicos para los criadores de gusanos de seda.

[0043] Los capullos, contruidos de manera natural por gusanos de seda que comen hojas de morera limpias, no presentan toxicidad y resultan adecuados para su uso como material ecológico.

5 **[0044]** Por lo tanto, la presente invención emplea un capullo 10 como un material para una biomembrana artificial. El capullo 10 se procesa, según se muestra en las figuras 1B a 1E, en dos o más fragmentos planos, presentando cada uno un primer grosor.

10 **[0045]** De forma más detallada, el capullo ovalado 10 se disecciona a lo largo de una línea de corte 11 en dos mitades, como se muestra en la figura 1B. Las mitades diseccionadas tienen formas semiovaladas, y se abren para exponer la superficie interior 13 del capullo, como se muestra en la figura. 1C.

[0046] A continuación, las mitades del capullo con superficies interiores curvas 13 se aplanan en cierta medida cortando muchos sitios a lo largo del borde, según se muestra en la figura 1D, y las regiones planas se cortan para obtener fragmentos de capullo con un primer grosor, como se muestra en la figura 1E.

15 **[0047]** No es necesario que la biomembrana artificial preparada en la presente invención tenga una superficie plana. Debido a que un capullo presenta inicialmente una forma de bola elíptica, la forma curvada del capullo diseccionado se puede utilizar para dar lugar a biomembranas artificiales curvadas si fuera necesario. Para utilizarse como una pequeña biomembrana artificial, un fragmento de capullo con un área pequeña puede ser relativamente plano. En cambio, cuando se toma un área relativamente grande de las mitades del capullo diseccionado, las biomembranas artificiales pueden presentar superficies curvas.

20 **[0048]** Con referencia a la figura 2, se describe un método modificado para preparar un fragmento de capullo con un primer grosor. En concreto, se corta un capullo de forma ovalada 10 a lo largo de líneas de corte 15 y 17 para exponer el interior 13 del capullo 10, tal y como se muestra en las figuras 2B y 2C. A continuación, el capullo diseccionado con una superficie curva se extiende tal y como se muestra en la figura 2D, y después se obtienen fragmentos de capullo 20 con un primer grosor, como se muestra en la figura 2E.

25 **[0049]** Los métodos de preparación de fragmentos de capullo descritos en las figuras 1 y 2 son únicamente de carácter ilustrativo, aunque no se pretende que limiten el método de fabricación de biomembranas artificiales de acuerdo con la presente invención. Un fragmento de capullo con un primer grosor se puede preparar cortando un capullo conforme a los modos que se muestran en las figuras 1 y 2, aunque se pueden utilizar otros métodos de corte.

30 2. Etapa 2: Preparación de fragmento de capullo con segundo grosor (biomembrana artificial)

[0050] Debido a que los fragmentos de capullo 20 con un primer grosor, preparados en la etapa 1, presentan una estructura de múltiples capas idéntica a la de la cáscara del capullo, la estructura de múltiples capas se puede dividir en capas más finas para usarse como una biomembrana artificial.

35 **[0051]** Aunque es posible utilizar el propio fragmento de capullo 20 con un primer grosor, preparado en la etapa 1, como una biomembrana artificial, este se somete a una división de grosor para proporcionar fragmentos de capullo 30 con un segundo grosor. En este sentido, el segundo grosor es más pequeño que el primer grosor.

[0052] Tal y como son, los fragmentos de capullo 30 se pueden aplicar para cualquier propósito de biomembranas artificiales. En caso de que sea necesario, se pueden esterilizar o tratar químicamente.

40 **[0053]** En concreto, el grosor (primer grosor) de una cáscara de capullo varía entre 0,3 y 1,0 mm en función de la especie de gusano de seda.

45 **[0054]** En principio, se puede utilizar cualquier tipo de capullo en la presente invención. A efectos de la presente invención, se emplea un capullo con un grosor de cáscara de 0,5 ~ 0,8 mm. En la presente invención, la cáscara de capullo se divide en los estratos interno, medio y externo. En primer lugar, el estrato externo se define como una capa que presenta una profundidad desde la superficie exterior hasta un punto correspondiente al 25 % del grosor total del capullo. El estrato interno se define como una capa que presenta una profundidad desde la superficie interior hasta un punto correspondiente al 15 % del grosor total del capullo. La otra parte correspondiente al 60 % del grosor total del capullo, es decir, el resto de la cáscara intermedia del capullo excepto la capa exterior y la capa interior, compone el estrato medio. Los valores numéricos de las fronteras entre las capas se determinan según las características de los estratos individuales (interno, medio y externo), como se muestra en la figura 3. Es decir, el estrato externo que presenta una profundidad desde la superficie exterior hasta un punto correspondiente al 25 % del grosor total del capullo se puede utilizar como un fragmento de capullo caracterizado por su alta elongación. El estrato medio que presenta un grosor correspondiente al 60 % del grosor total del capullo muestra un elevado potencial de crecimiento celular gracias a su elevada porosidad. El estrato interno que corresponde al 15 % restante del grosor total de la cáscara presenta una superficie lisa y una elevada resistencia a la tensión.

[0055] Un fragmento de capullo se puede delaminar fácilmente en hasta 16 láminas, aunque el número de delaminaciones depende del grosor de la cáscara. El grosor de las láminas se puede determinar según la

resistencia y elongación necesarias para el tipo y uso de la membrana artificial. A partir de un capullo con un grosor de cáscara de 0,5 ~ 0,8 mm, se puede preparar una biomembrana artificial de 0,01 mm ~ 0,7 mm de grosor mediante delaminación. En función del uso de la biomembrana artificial, se pueden seleccionar los fragmentos de capullo 30 con diversos grosores.

5 **[0056]** Como se puede observar en la figura 4, el estrato externo 35 resulta adecuado como una biomembrana elástica debido a que presenta una tasa de elongación más alta que el estrato interno 31 y el estrato medio 33. La tasa de elongación más elevada se mide desde el estrato externo, con la tasa de elongación más baja desde el estrato interno.

10 **[0057]** El estrato interno 31 presenta una superficie lisa para que sea poco probable que se adhiera. Además, el estrato interno presenta una elevada resistencia a la tensión para que resulte adecuado para su uso como biomembrana cuando se requiera resistencia. La resistencia a la tensión más elevada se mide en el estrato interno, con la resistencia a la tensión más baja en el estrato externo.

15 **[0058]** Además, el estrato medio 33 presenta un excelente potencial de crecimiento celular debido a su gran porosidad. Por consiguiente, se aplica de manera adecuada como una biomembrana para una lesión de defecto que precisa una rápida curación.

Modo para la invención

[0059] Se puede obtener una mejor comprensión de la presente invención a través de los siguientes ejemplos que se exponen para ilustrarla, aunque no han de interpretarse como limitativos de la presente invención.

<EJEMPLO 1> Preparación de biomembrana artificial 1

20 **[0060]** Se preparó un capullo 10, y se cortó en un sitio apropiado para exponer el interior del mismo.

[0061] A continuación, se procesó entonces el capullo cortado para hacer que el interior curvo fuera plano.

[0062] El capullo aplanado se cortó en fragmentos rectangulares 20.

[0063] A partir de los fragmentos de capullo 20, se delaminó una capa que contenía la superficie más interior 13, es decir, un estrato interno, con un grosor de 0,07 mm.

25 **[0064]** El estrato interno delaminado se esterilizó y se utilizó como una biomembrana artificial 1.

<EJEMPLO 2> Preparación de biomembrana artificial 2

[0065] A partir del resto de capullo tras haber delaminado el estrato interno en el Ejemplo 1, se delaminó una capa que contenía la superficie más exterior, es decir, un estrato externo opuesto al estrato interno, con un grosor de 0,07 mm.

30 **[0066]** El estrato externo delaminado se esterilizó y se utilizó como una biomembrana artificial 2.

<EJEMPLO 3> Preparación de biomembrana artificial 3

[0067] La parte restante tras el estrato interno y el estrato externo se delaminó en estrato medio, cada uno con un grosor de 0,07 mm, y a continuación se esterilizó para proporcionar una biomembrana artificial 3.

<EJEMPLO DE PRUEBA 1> Morfología de biomembranas artificiales a partir de capullo

35 1. Método de prueba

[0068] Se observaron morfologías de las biomembranas artificiales preparadas en los Ejemplos 1 a 3 mediante microscopía electrónica de barrido (SEM, por sus siglas en inglés) y a simple vista. Los resultados se muestran en la figura 3.

2. Resultados de prueba

40 **[0069]** Como se puede observar en la figura 3, el estrato interno (A, Ejemplo 1), el estrato medio (B, Ejemplo 3) y el estrato externo (C, Ejemplo 2) diferían entre sí en cuanto a sus propiedades morfológicas, como el grosor de fibra, la forma de poro, etc. A simple vista, se observó que el estrato medio presentaba una superficie lisa. Por lo tanto, los resultados morfológicos indican que el estrato interno, el estrato medio y el estrato externo se pueden utilizar cuando se necesiten sus características únicas.

45 **[0070]** Por ejemplo, como se muestra en la figura 3, el estrato interno presenta una superficie lisa y es resistente al agua, por lo que se utiliza de manera adecuada como una biomembrana artificial cuando se necesita una propiedad no adhesiva. Al presentar un gran potencial de crecimiento celular gracias a la elevada porosidad del mismo, el estrato medio se puede utilizar de manera adecuada como una biomembrana en una región de defecto que necesite una curación rápida.

50 <EJEMPLO DE PRUEBA 2> Propiedades físicas de biomembrana artificial a base de capullo según el estrato de capullo

1. Método de prueba

[0071] Se midieron las propiedades físicas de las biomembranas artificiales a base de capullo preparadas en los Ejemplos 1 a 3 a partir de estrato de capullo. En este sentido, se llevó a cabo un ensayo de tracción utilizando una máquina de pruebas universal (DAEYEONG, Corea).

5 **[0072]** Se utilizaron muestras de prueba con tamaños de 2,5 x 0,07 (ancho x largo) mm. Las muestras se extendieron a una tasa de 10 mm/min, con una longitud de referencia inicial configurada para ser de 10 mm.

[0073] Los resultados se proporcionan en la figura 4 (deformación (mm) frente a esfuerzo (MPa)) y en la tabla 1, que se indica a continuación.

2. Resultados de prueba – Tabla 1

10 **[0074]**

[Tabla 1]

	Resistencia a la tensión (MPa)	Elongación (%)
Estrato interno (Ej. 1)	60,20 ± 5,3	12,45 ± 1,5
Estrato medio (Ej. 3)	46,19 ± 2,2	15,05 ± 1,7
Estrato externo (Ej. 2)	29,36 ± 3,1	18,93 ± 1,3

15 **[0075]** Como se comprende a partir de los datos de la figura 4 y de la tabla 1, las biomembranas artificiales a base de capullo diferían entre sí en cuanto a la resistencia a la tensión y a la elongación por estrato. La resistencia a la tensión más elevada se detectó en el estrato interno, mientras que la elongación más elevada se midió a partir del estrato externo.

[0076] En otras palabras, el estrato interno resulta adecuado para su uso como una biomembrana artificial en un sitio en el que la resistencia es importante, mientras que el estrato externo se aplica preferiblemente a un sitio que requiere elasticidad.

20 <EJEMPLO DE PRUEBA 3> Propiedades físicas de biomembrana artificial a base de estrato medio de capullo según el grosor

1. Método de prueba

25 **[0077]** Las propiedades físicas de las biomembranas artificiales a base de estrato medio se midieron según el grosor. En este sentido, se llevó a cabo un ensayo de tracción utilizando una máquina de pruebas universal (DAEYEONG, Corea). Se utilizaron muestras de prueba con tamaños de 20 x 2,5 (ancho x largo) mm en un estado seco o en un estado húmedo. En este último caso, las muestras se sumergieron en suero fisiológico durante 1 hora. Para un control, se empleó una membrana de colágeno disponible comercialmente. Las muestras se extendieron a una tasa de 10 mm/min, con una longitud de referencia inicial configurada para ser de 10 mm. Los resultados se proporcionan en la tabla 2 que se muestra a continuación.

2. Resultados de prueba – Tabla 2

30 **[0078]**

[Tabla 2]

Tipo	Grosor (mm)	Carga máx. (N)		Resistencia a la tensión (MPa)		Elongación (%)	
		Seco	Húmedo	Seco	Húmedo	Seco	Húmedo
Estrato medio	0,01	6	3	2	13	2	23
	0,02	9	8	2	20	1,4	29,4
	0,04	17	11	4	14	1,8	23
	0,06	16	16	4	13	1,6	31,8
	0,08	33	15	8	9	2,4	25,2

Tipo	Grosor (mm)	Carga máx. (N)		Resistencia a la tensión (MPa)		Elongación (%)	
		Seco	Húmedo	Seco	Húmedo	Seco	Húmedo
	0,1	37	20	9	10	2	30,2
	0,2	88	62	22	16	2,8	26,6
	0,4	113	80	28	10	2,8	31,6
Colágeno	0,2	3,3	0,25	0,8	0,05	7,8	18,8

[0079] Como se comprende a partir de los datos de la tabla 2, la biomembrana artificial a base de capullo difiere en cuanto a la resistencia a la tensión y a la elongación por grosor. Tanto la resistencia a la tensión como la elongación aumentaron con el incremento del grosor, y eran mejores en un estado húmedo que en un estado seco. En cambio, la resistencia a la tensión de la membrana de colágeno disponible comercialmente se redujo 16 veces cuando estaba en un estado húmedo en comparación con cuando se encontraba en un estado seco. En conjunto, los datos indican que las propiedades físicas de las biomembranas a base de capullo se pueden mantener durante un período de tiempo más largo que las de la membrana de colágeno húmeda.

<EJEMPLO DE PRUEBA 4> Potencial de crecimiento celular de biomembrana artificial

1. Método de prueba

[0080] Para analizar el potencial de crecimiento celular de las biomembranas artificiales, se cultivó la línea celular de fibroblastos de ratón L929 en las biomembranas artificiales a 37 °C en una condición de CO₂ al 5 %. Para ello, se utilizó DMEM (glucosa media-alta de águila modificada de Dulbecco, WelGENE, Corea) complementado con FBS (suero fetal bovino, GIBCO) al 10 % (v/v), y 100 U de estreptomicina y 100 µg/ml de penicilina (GIBCO). Se analizó el potencial de crecimiento celular de la biomembrana artificial mediante MTT.

[0081] Los resultados se representan en la figura 5, donde el potencial de crecimiento celular (actividad relativa) se proporciona según el estrato de capullo.

2. Resultado de prueba

[0082] Como se puede observar en la figura 5, todas las biomembranas artificiales a base de capullo mostraron un buen potencial de crecimiento celular, con un crecimiento celular 4 veces más elevado en el estrato medio que en el estrato interno.

[0083] En otras palabras, el estrato medio resulta más adecuado que el estrato interno para su uso en un sitio que requiera crecimiento celular. Además, se observó que las biomembranas artificiales a base de capullo de la presente invención hacían crecer las células de manera más eficiente en comparación con la membrana de colágeno.

<Descripción de referencias numéricas en los dibujos>

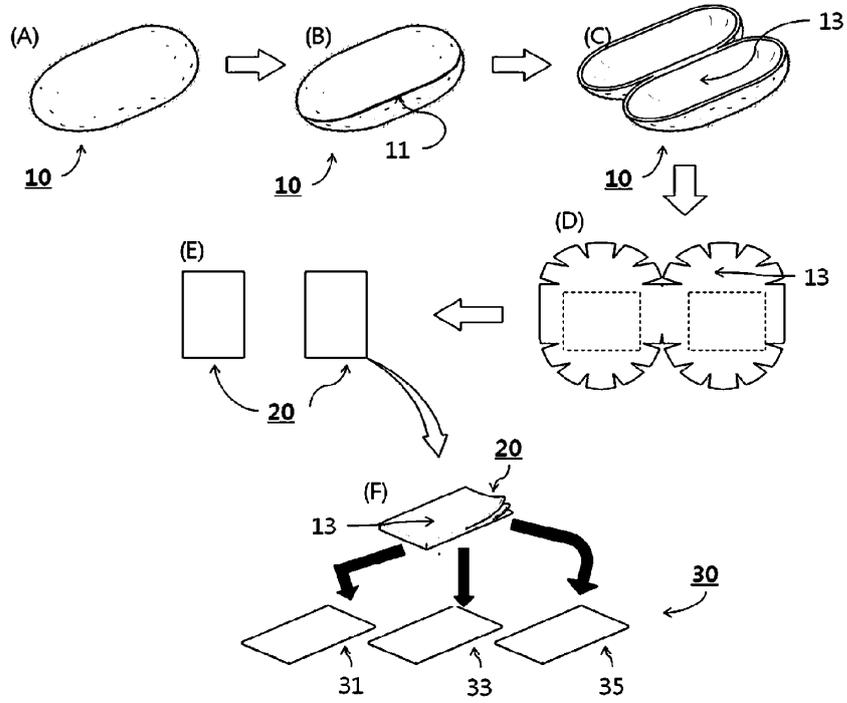
[0084]

- 10: Capullo
- 11: Línea de corte 1
- 13: Superficie interior
- 15: Línea de corte 2
- 17: Línea de corte 3
- 20: Fragmento de capullo con un primer grosor
- 30: Fragmento de capullo con un segundo grosor
- 31: Estrato interno
- 33: Estrato medio
- 35: Estrato externo

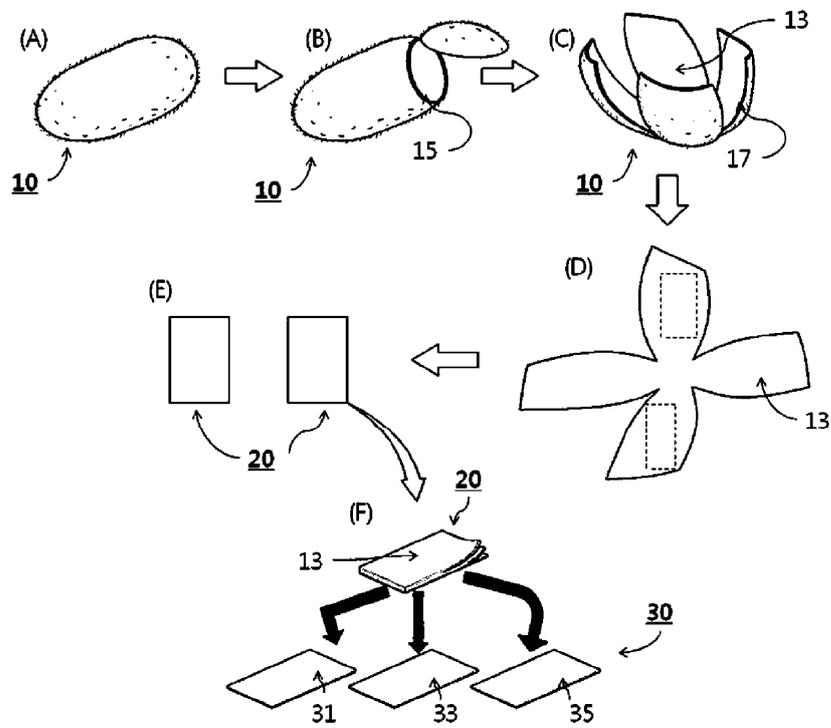
REIVINDICACIONES

1. Biomembrana artificial a base de capullo de gusano de seda comprendiendo un fragmento (20) de un capullo de gusano de seda (10), preparada mediante la división de un capullo de gusano de seda (10) en dos o más fragmentos (20) en una forma predeterminada, presentando el capullo una cáscara con un primer grosor.
- 5 2. Biomembrana artificial a base de capullo de gusano de seda según la reivindicación 1, donde cada uno de los fragmentos (20) está delaminado en un fragmento laminar (30) con un segundo grosor, siendo el segundo grosor más pequeño que el primer grosor.
3. Biomembrana artificial a base de capullo de gusano de seda según la reivindicación 2, donde el fragmento laminar (30) con un segundo grosor es un estrato interno del capullo.
- 10 4. Biomembrana artificial a base de capullo de gusano de seda según la reivindicación 2, donde el fragmento laminar con un segundo grosor es un estrato medio del capullo.
5. Biomembrana artificial a base de capullo de gusano de seda según la reivindicación 2, donde el fragmento laminar con un segundo grosor es un estrato externo del capullo.
- 15 6. Biomembrana artificial a base de capullo de gusano de seda según la reivindicación 3, donde el fragmento laminar está esterilizado.
7. Biomembrana artificial a base de capullo de gusano de seda según la reivindicación 4, donde el fragmento laminar está esterilizado.
8. Biomembrana artificial a base de capullo de gusano de seda según la reivindicación 5, donde el fragmento laminar está esterilizado.
- 20 9. Biomembrana artificial a base de capullo de gusano de seda según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, donde el fragmento laminar es compacto.
10. Método para fabricar una biomembrana artificial a base de capullo de gusano de seda comprendiendo un fragmento de un capullo de gusano de seda, donde el método comprende una primera etapa de división de un capullo de gusano de seda en dos o más fragmentos en una forma predeterminada, presentando el capullo de gusano de seda una cáscara con un primer grosor.
- 25 11. Método según la reivindicación 10, comprendiendo, además, una segunda etapa de delaminación de cada uno de los fragmentos en un fragmento laminar con un segundo grosor, siendo el segundo grosor inferior al primer grosor.
- 30 12. Método según la reivindicación 11, comprendiendo, además, una tercera etapa de compactación de los fragmentos del segundo grosor preparados en la segunda etapa.
13. Método según la reivindicación 10 o 11, comprendiendo, además, la realización de la esterilización antes o después de cada etapa.
14. Método según la reivindicación 11 o 12, donde el fragmento laminar con un segundo grosor es un estrato interno del capullo de gusano de seda.
- 35 15. Método según la reivindicación 11 o 12, donde el fragmento laminar con un segundo grosor es un estrato medio del capullo de gusano de seda.
16. Método según la reivindicación 11 o 12, donde el fragmento laminar con un segundo grosor es un estrato externo del capullo de gusano de seda.
- 40 17. Biomembrana artificial a base de capullo de gusano de seda de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9, para su uso en el crecimiento celular.

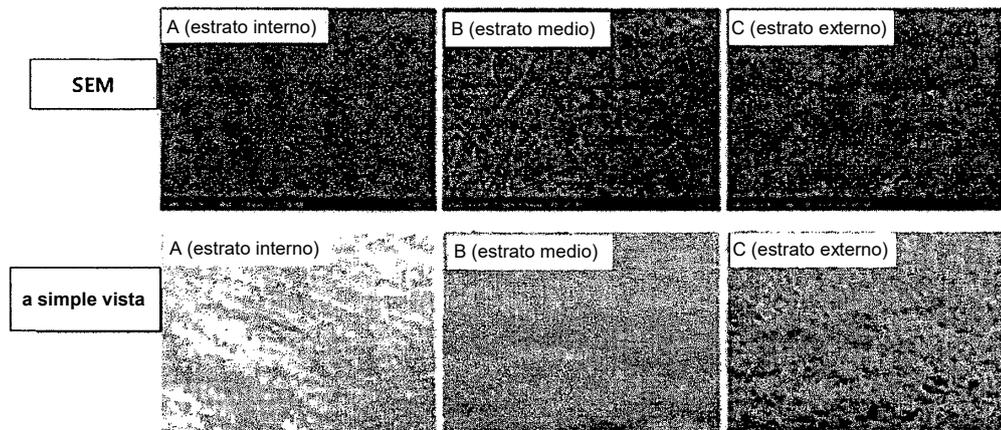
[Fig. 1]



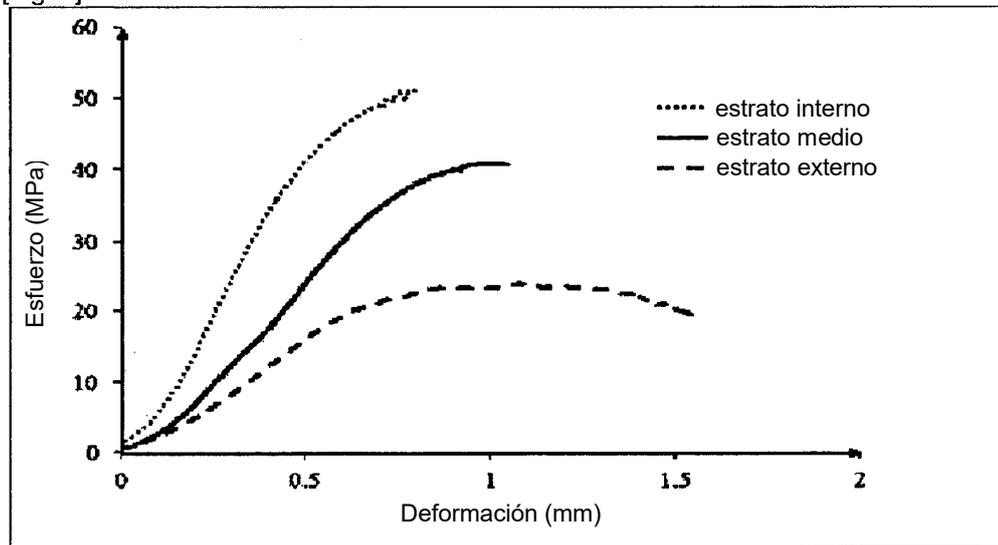
[Fig. 2]



[Fig. 3]



[Fig. 4]



[Fig. 5]

