

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 754 025**

51 Int. Cl.:

A61F 2/02 (2006.01)

A61L 27/24 (2006.01)

A61L 27/14 (2006.01)

A61L 27/38 (2006.01)

A61C 8/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.06.2013 PCT/US2013/046950**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.12.2013 WO13192481**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.06.2013 E 13807263 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.09.2019 EP 2863838**

54 Título: **Implantes resistentes a la compresión y a la deformación**

30 Prioridad:

22.06.2012 US 201213530322

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

15.04.2020

73 Titular/es:

COLLAGEN MATRIX, INC. (100.0%)

15 Thornton Road

Oakland, NJ 07436, US

72 Inventor/es:

LI, SHU-TUNG y

YUEN, DEBBIE

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 754 025 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

Implantes resistentes a la compresión y a la deformación

Antecedentes

5 El objetivo clínico principal en la reparación de un nervio seccionado es restaurar la continuidad entre los muñones nerviosos proximal y distal, sin la cual la recuperación funcional es prácticamente imposible. Normalmente, cuando los muñones nerviosos distal y proximal pueden unirse sin mucha tensión, la sutura directa o la reparación por coaptación repetida es el tratamiento preferido. En los casos en que hay una distancia de separación nerviosa que se debe cerrar, hay que utilizar algún tipo de material intermedio. El material más utilizado es un autoinjerto de un nervio periférico obtenido del paciente, como un autoinjerto del nervio sural. Sin embargo, los resultados del autoinjerto nervioso no
10 suelen ser satisfactorios. El escape axónico en las suturas reduce el número de axones que alcanzan el órgano final. También puede derivar en la formación de neuromas dolorosos. Además, la obtención de un autoinjerto requiere una segunda cirugía y sus complicaciones asociadas. Los problemas adicionales del autoinjerto nervioso incluyen el fracaso de la supervivencia del injerto y de la vascularización y la discordancia de tamaño.

15 Se han desarrollado productos alternativos para el injerto nervioso que pueden mejorar los inconvenientes de un autoinjerto nervioso. Dichos productos incluyen tubos o conductos de la guía nerviosa para guiar la regeneración nerviosa periférica, denominada "reparación por entubado".

20 La patente estadounidense n.º 4.963.146 describe un conducto de guía nerviosa semipermeable multicapa que fomenta la regeneración *in vivo* de los nervios. Como el conducto de guía nerviosa está hecho como un tubo recto, no proporciona resistencia a la deformación, lo cual es importante para reparar los nervios en áreas que requieren plegar el implante para realizar una conexión adecuada (como los nervios en la muñeca y la mano). La deformación del tubo de guía nerviosa puede causar la compresión del nervio, la alteración axónica y la formación de neuromas.

25 En la patente estadounidense n.º 6.716.225 se describe un implante de reparación de nervios resistente a la deformación. En este implante, se crearon crestas a lo largo de la pared de la guía nerviosa para crear resistencia frente a la deformación. Sin embargo, las crestas de la pared, tras la hidratación, tienden a relajarse, haciendo que la longitud total de la guía nerviosa aumente hasta en un 30 % en comparación con su longitud en estado seco. Así, se reducirá el grado de resistencia a la deformación y se minimizará la efectividad del implante en áreas que requieren un alto grado de resistencia a la deformación. Además, las crestas no evitan que el implante se contraiga *in vivo*. De este modo, las fuerzas externas de los tejidos circundantes pueden comprimir la pared del implante y reducir el espacio de la luz requerido para el crecimiento axónico. Como resultado, la efectividad del mecanismo de la guía nerviosa se
30 ve significativamente comprometida. Además, este implante no es eficaz en reparar espacios más largos, p. ej., más largos que 2,5 cm. El documento US2011/288628 describe una prótesis tubular implantable que comprende una estructura de soporte envuelta helicoidalmente alrededor del cuerpo tubular para aumentar la resistencia a la deformación y al aplastamiento, El documento WO2010/117766 describe membranas de colágeno reabsorbibles para aumentar el hueso alveolar.

35 Para corregir las deficiencias de las guías nerviosas actuales y mejorar la reparación nerviosa periférica de los espacios largos, existe la necesidad de desarrollar una guía nerviosa reabsorbible que sea resistente a la compresión y a la deformación durante el período de regeneración nerviosa para evitar una alteración mecánica significativa de la luz del implante. Tal implante también se puede usar para reparar otros órganos tubulares, p. ej., tendones, tejido vascular y tejido urinario. También existe la necesidad de un implante resistente a la compresión para su uso en áreas
40 que requieren mantenimiento de espacio para el crecimiento de tejido, p. ej., aumento de cresta en cirugías dentales.

Compendio

El objetivo principal de esta invención es proporcionar implantes para la reparación y regeneración de tejidos, en particular, para la reparación de nervios y para el aumento de crestas en cirugía dental, que eliminan o reducen las desventajas y los problemas asociados con los implantes disponibles actualmente.

45 De este modo, un aspecto de esta invención se refiere a un implante resistente a la compresión y a la deformación para reparar nervios. El implante incluye una membrana tubular biopolimérica y un filamento polimérico según la reivindicación 1. La membrana biopolimérica tubular es biocompatible, reabsorbible y semipermeable. El filamento polimérico es generalmente helicoidal y está ubicado en la superficie externa de la membrana biopolimérica tubular. El implante es resistente a la compresión y a la deformación. El implante tiene una resistencia a la compresión de 1 N a 10 N y un ángulo de resistencia a la deformación de 40 grados a 150 grados.
50

Otro aspecto de esta invención se refiere a un implante conformado resistente a la compresión para el aumento de crestas en cirugía dental. El implante conformado contiene una membrana biopolimérica arqueada que incluye un filamento polimérico en su superficie según la reivindicación 9.

55 La membrana biopolimérica arqueada es biocompatible, reabsorbible y semipermeable. El implante conformado es resistente a la compresión y tiene una resistencia a la compresión de 1 N a 10 N. En una realización alternativa, el implante conformado resistente a la compresión puede tener dos capas biopoliméricas arqueadas que son

biocompatibles, reabsorbibles y semipermeables. Se incorpora un filamento polimérico entre las dos capas de la membrana biopolimérica arqueada. El implante de dos capas puede tener una resistencia a la compresión de 1 N a 10 N.

5 También se proporciona un método para preparar un implante tubular resistente a la compresión y a la deformación según la reivindicación 13. El método incluye los pasos de dispersar fibras biopoliméricas purificadas, hidratar las fibras de colágeno purificadas dispersas para formar fibras de colágeno reconstituidas, enrollar las fibras de colágeno reconstituidas en un mandril giratorio para formar un tubo de colágeno, enrollar un filamento de polímero sintético sobre la superficie del tubo de colágeno, deshidratar parcialmente el tubo de colágeno, liofilizar el tubo de colágeno parcialmente deshidratado y reticular el tubo de colágeno parcialmente deshidratado liofilizado para formar el implante tubular resistente a la compresión y a la deformación.

10 Además, se proporciona un método para preparar un implante resistente a la compresión. El método incluye los pasos en los que se dispersan las fibras de colágeno purificadas, las fibras de colágeno purificadas dispersadas se hidratan para formar fibras de colágeno reconstituidas, Una primera porción de las fibras de colágeno reconstituidas se enrolla en un mandril giratorio para formar un tubo de colágeno, se enrolla un filamento de polímero sintético sobre la superficie del tubo de colágeno, una segunda porción de las fibras de colágeno reconstituidas se enrolla sobre la superficie del tubo de colágeno para formar una capa de colágeno que recubre el filamento de polímero sintético y el tubo de colágeno, el tubo de colágeno recubierto se deshidrata, liofiliza y corta parcialmente a lo largo de un eje longitudinal, para conformar una lámina. La lámina así formada se humedece, moldea con forma arqueada y se reticula para formar el implante resistente a la compresión. En una realización alternativa, se omite el paso de enrollar una segunda porción de fibras de colágeno alrededor del tubo de colágeno. Este método forma un implante resistente a la compresión que tiene una sola capa de colágeno con un filamento de polímero sintético en su superficie.

Los detalles de una o más realizaciones de la invención se exponen en los dibujos adjuntos y en la descripción a continuación. Otras características, objetos y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la descripción y el dibujo y a partir de las reivindicaciones.

25 Breve descripción de los dibujos

La figura 1A es una representación esquemática de un implante resistente a la compresión y a la deformación, en el que un filamento de polímero se enrolla helicoidalmente alrededor de una matriz tubular. La figura 1B representa una realización alternativa de un implante que tiene una envoltura entrecruzada del filamento.

30 La figura 2 muestra la flexión del implante representado en la figura 1A, demostrando el aspecto resistente a la deformación de la invención.

La figura 3A muestra la resistencia a la compresión superior del implante representado en la figura 1A en comparación con la figura 3B, que muestra una matriz tubular no reforzada que tiene baja resistencia a la compresión.

La figura 4 muestra un implante resistente a la compresión para el aumento de la cresta dental.

35 La figura 5 es un gráfico de resistencia a la compresión frente al tiempo para implantes de guía nerviosa de control o reforzados con fibra de polímero.

La figura 6 es un gráfico del número de axones mielinizados frente al área de la luz del implante.

Descripción detallada

40 Esta invención se refiere a un implante tubular de matriz biopolimérica, biocompatible, reabsorbible, semipermeable resistente a la compresión y a la deformación, soportada circunferencialmente por un filamento polimérico sintético enrollado alrededor de la superficie de su pared externa.

El implante tubular de matriz biopolimérica de la presente invención es biocompatible, reabsorbible y semipermeable. Es decir, el implante tubular es reabsorbido lentamente *in vivo* por enzimas endógenas. La matriz biopolimérica tubular puede fabricarse a partir de materiales biológicos que incluyen, pero no se limitan a: colágeno, elastina, polisacáridos como el ácido alginico, quitosano y celulosa, y a partir de materiales biológicos genéticamente modificados. Se prefieren los materiales a base de colágeno, particularmente los materiales a base de colágeno tipo I. El implante puede tener un diámetro interno de 1,0 mm a 10 mm, preferiblemente de 1,5 mm a 8 mm, y más preferiblemente de 1,5 mm a 6 mm. La longitud del implante puede ser de 0,5 cm a 15 cm, preferiblemente de 1,0 cm a 10 cm, y más preferiblemente de 1,5 cm a 8 cm. Por ejemplo, un implante tubular de matriz biopolimérica para reparación nerviosa puede tener un diámetro interno de 1,5 mm a 6,0 mm.

50 El implante es resistente a la compresión. Esta propiedad la otorga un filamento polimérico que se enrolla alrededor del exterior de la matriz biopolimérica tubular en una trayectoria helicoidal. El grado de resistencia a la compresión es una función del paso del enrollamiento del filamento. Por ejemplo, un implante que tiene un filamento polimérico enrollado con un pequeño paso, es decir, un enrollamiento apretado, tiene una mayor resistencia a la compresión en comparación con un implante similar que tenga un enrollamiento con un paso mayor. El implante tiene una densidad

- de enrollamiento tal que su resistencia a la compresión está entre 1 N y 10 N. La densidad del enrollamiento se selecciona preferiblemente para ejercer una resistencia a la compresión de 2 N a 5 N. La relación entre el paso del filamento polimérico y la resistencia a la compresión se muestra en la figura 5. Por ejemplo, un implante que tiene un diámetro interno de 1,5 mm, que está reforzado con una fibra polimérica enrollada con un paso de 1 mm, tiene una resistencia a la compresión de 4 N. Un implante similar en el que la fibra polimérica está enrollada con un paso de 2 mm tiene una resistencia a la compresión de 2,5 N. En una realización alternativa, la fibra polimérica se enrolla en un patrón entrecruzado con un filamento de diámetro pequeño, de modo que el grosor de la pared del implante no aumenta significativamente. La resistencia a la compresión ejercida por una fibra polimérica entrecruzada es mayor que la de una fibra helicoidal con el mismo paso de enrollamiento.
- El implante también es resistente a la deformación. La resistencia a la deformación, similar a la resistencia a la compresión descrita anteriormente, se logra mediante un enrollamiento helicoidal o entrecruzado del filamento de polímero sobre la matriz de colágeno tubular. El grado de resistencia a la deformación se define como el ángulo en el que se deforma el implante. Una deformación se define como una flexión cerrada que causa una oclusión de la luz del implante tubular. El implante tiene un ángulo de resistencia a la deformación de aproximadamente 40 grados a aproximadamente 150 grados, preferiblemente de aproximadamente 50 grados a aproximadamente 90 grados.
- El implante con soporte de polímero, en uso, mantendrá ventajosamente su longitud total, una mejora significativa con respecto al implante descrito en la patente estadounidense n.º 6.716.225.
- El filamento polimérico es biodegradable y se construye a partir de polímeros sintéticos seleccionados del ácido poliglicólico, ácido poliláctico, copolímeros de ácido poliglicólico y ácido poliláctico, policaprolactona, copolímeros de ácido poliláctico y policaprolactona y copolímeros de ácido poliglicólico y policaprolactona. El filamento polimérico se biodegrada a través de la hidrólisis del polímero.
- El filamento polimérico puede incorporarse en la superficie de la pared tubular o puede incorporarse dentro del espacio de la pared. Cuando el filamento se enrolla fuera de la pared, el diámetro del filamento puede ser mayor que si el filamento se enrolla dentro del espacio de la pared.
- Dependiendo de la longitud del nervio a reparar, la velocidad de degradación del implante se puede programar para cumplir con la necesidad funcional del implante *in vivo*. Por ejemplo, en el caso de reparaciones de nervios, un axón crece a una velocidad de aproximadamente 1 mm por día. Para reparar un defecto nervioso de 3-5 cm, el implante debe tener una estabilidad *in vivo* de aproximadamente 2-4 meses. El control de la estabilidad *in vivo* se puede lograr mediante el uso de agentes de reticulación químicos que forman enlaces covalentes intermoleculares entre las moléculas biopoliméricas. La reticulación puede llevarse a cabo por medios bien conocidos en la técnica, tales como los descritos en la patente estadounidense n.º 6.090.996. En resumen, la reticulación puede realizarse en una cámara con una humedad relativa en el intervalo del 80 % al 100 % en presencia de una cantidad excesiva de vapor de formaldehído a una temperatura de 25 °C durante un período de 1 hora a 10 horas. Por ejemplo, la reticulación se puede lograr exponiendo la matriz biopolimérica tubular a una solución de formaldehído al 0,5 % durante 5 horas a temperatura ambiente.
- La estabilidad *in vivo* también se puede controlar seleccionando el filamento de polímero apropiado que complementa la característica de reabsorción del implante tubular de matriz de colágeno.
- El implante puede contener un sistema de microguía para facilitar la adhesión y migración celular, como el descrito en la patente estadounidense n.º 6.716.225.
- El implante también puede contener moléculas bioactivas para fomentar el crecimiento del axón o la adhesión y migración celular. Las moléculas bioactivas para fomentar el crecimiento del axón incluyen factores de crecimiento nervioso, factores de crecimiento de fibroblastos ácidos y básicos y factores de crecimiento similares a la insulina. Estos factores de crecimiento fomentan la mitogénesis de las células dentro de la luz del implante, como las células de Schwann o las células madre.
- Las moléculas bioactivas para fomentar la adhesión y migración celular incluyen moléculas bioadhesivas como lamininas, fibronectinas, glicoproteínas y glicosaminoglicanos. Las moléculas bioactivas se pueden incorporar en la pared del implante nervioso o se pueden incorporar a través de un vehículo de administración, que se puede insertar en la luz del implante. Los factores de crecimiento y las moléculas adhesivas pueden incorporarse al implante mediante interacciones electrostáticas, interacciones físicas y mecánicas, interacciones covalentes usando un agente de reticulación, o mediante una matriz de administración (p. ej., una esponja de colágeno porosa) que son bien conocidas en la técnica.
- Las células que tienen una indicación terapéutica pueden incorporarse al implante. Estas células incluyen, pero no se limitan a, células de Schwann y células madre.
- Otra propiedad del implante es la permeabilidad selectiva. El implante es permeable a moléculas de hasta 500.000 dalton. Preferiblemente, el implante es permeable a moléculas de 5.000 a 100.000 dalton. La mayoría de las moléculas bioactivas y las moléculas de nutrientes tienen un peso molecular incluido en este intervalo.

En otra realización, se proporciona un implante conformado resistente a la compresión según la reivindicación 9. Este implante es especialmente útil para aplicaciones quirúrgicas en las que debe mantenerse el espacio para el crecimiento óseo, como para la cirugía de aumento de crestas dentales. Un implante tubular resistente a la compresión y a la deformación, que tiene las propiedades descritas anteriormente, se corta a lo largo de una dirección longitudinal para formar una lámina. Así, la membrana laminar reforzada con fibra de polímero se forma mecánicamente sobre un molde y se reticula para fijar su forma. La membrana conformada mantendrá la resistencia a la compresión para la aplicación quirúrgica médica o dental en particular.

Los siguientes ejemplos específicos deben interpretarse como meramente ilustrativos y de ninguna manera como limitativos del resto de la descripción. Sin más desarrollo, se cree que un experto en la técnica puede utilizar la presente invención en toda su extensión, basándose en la descripción del presente documento.

Ejemplo 1: Preparación de un implante tubular de reparación de nervios resistente a la compresión y a la deformación.
Preparación de fibras de colágeno insolubles

El tendón flexor bovino se limpió eliminando la grasa y la fascia y lavando con agua. El tendón limpio se congeló y se trituró en fracciones de 0,5 mm con una cortadora de carne. Posteriormente, se extrajo un kilogramo del tendón húmedo en fracciones con 5 l de agua destilada, seguido de 5 l de 0,2 N de HCl/0,5 M de Na₂SO₄ a temperatura ambiente durante 24 horas. La solución de extracción se desechó.

El ácido residual en el tendón extraído se eliminó lavando con 5 l de una solución de 0,5 M de Na₂SO₄. Luego se extrajo el tendón con 5 l de una solución de 1,0 M de NaOH/0,75 M de Na₂SO₄ a temperatura ambiente durante 24 horas. La solución de extracción se volvió a desechar. Cualquier base residual se neutralizó agregando una solución de 0,1 N de HCl para lograr un pH de 5, seguido de varios lavados con agua destilada para eliminar las sales residuales en el tendón purificado. Después, el tendón se desgrasó durante 8 horas con 5 volúmenes de isopropanol a temperatura ambiente con agitación constante, seguido de un tratamiento nocturno con un volumen igual de isopropanol. La preparación resultante de fibra de colágeno insoluble se secó al aire y se almacenó a temperatura ambiente hasta su posterior procesamiento.

Preparación de una dispersión de fibra de colágeno

Se pesó una parte alícuota de las fibras de colágeno insolubles y se dispersó en 0,07 M de ácido láctico, se homogeneizó con un homogeneizador Silverson (East Longmeadow, MA) y se filtró con un filtro de malla de acero inoxidable de calibre Mesh 30 para obtener una dispersión que contenía 0,7 % (p/v) de colágeno. La dispersión se desaireó al vacío para eliminar el aire atrapado en la dispersión y se almacenó a 4 °C hasta su uso.

Preparación de una matriz de colágeno tubular reforzada con fibra de polímero

Una parte alícuota de fibras de colágeno dispersadas en ácido preparadas como se describió anteriormente se reconstituyó agregando 0,3 % de NH₄OH para ajustar el pH de la dispersión al punto isoeléctrico del colágeno, es decir, pH de 4,5-5,0. Las fibras reconstituidas se vertieron en un dispositivo de fabricación que se configuró con la inserción de un mandril de 1,5 mm de diámetro. Las fibras se distribuyeron uniformemente a lo largo del mandril. Después, el mandril se hizo girar lentamente a aproximadamente 40-50 rpm para enrollar firmemente las fibras a su alrededor, formando así una matriz de colágeno tubular.

Un filamento de copolímero de polilactida-policaprolactona (PCL) se enrolló lentamente con un paso de 2 mm sobre la superficie de la matriz de colágeno tubular. Las fibras de colágeno en la matriz de colágeno tubular se deshidrataron parcialmente eliminando el exceso de solución al comprimir la matriz de colágeno tubular en el mandril giratorio contra dos placas, para así controlar con precisión el grosor de la pared de la matriz de colágeno tubular.

Liofilización y reticulación de la matriz de colágeno tubular reforzada con fibra de polímero

Las fibras de colágeno parcialmente deshidratadas en la matriz de colágeno tubular reforzada con fibra polimérica se liofilizaron a -10 °C durante 24 horas y a 20 °C durante 16 horas a una presión inferior a 200 millitorr usando un liofilizador Virtis Freeze Dryer (Gardiner, NY). La matriz tubular reforzada con fibra de polímero liofilizada se retiró del mandril y se reticuló con vapor de formaldehído generado a partir de una solución de formaldehído al 3 % a temperatura ambiente durante aproximadamente 7 horas. La matriz tubular reforzada con fibra de polímero reticulada se enjuagó en agua para eliminar el formaldehído residual y se liofilizó nuevamente.

Ejemplo 2: Preparación de un implante tubular comparativo

Se preparó un implante tubular comparativo como el descrito anteriormente en el ejemplo 1 para el implante de reparación de nervios tubular resistente a la compresión y a la deformación, excepto por que se omitió el filamento de polímero de PCL.

Ejemplo 3: Preparación de un implante conformado resistente a la compresión y a la deformación

Se preparó una matriz de colágeno tubular reforzada con fibra de polímero, como se describe en el ejemplo 1 anterior, excepto por que el mandril usado tenía un diámetro de 10 mm. Después de la liofilización de la matriz de colágeno

5 tubular reforzada con fibra de polímero, el tubo se cortó longitudinalmente y se retira del mandril. Después, la lámina resultante de matriz de colágeno reforzada con polímero se humedeció en una cámara cerrada que tenía una humedad relativa del 90 % al 100 % a temperatura ambiente durante 2 a 4 horas. Después de la humidificación, la lámina se prensó sobre un molde para darle forma de arco. A continuación, la lámina de matriz se reticuló mientras se mantenía en forma de arco, se enjuagó y liofilizó de nuevo como se describe en el ejemplo 1.

Ejemplo 4: Preparación de una realización alternativa de un implante conformado resistente a la compresión y a la deformación

10 Se preparó una matriz de colágeno tubular reforzada con fibra polimérica como se describe en el ejemplo 1 anterior. Luego se distribuyó uniformemente una segunda capa de fibras de colágeno reconstituidas a lo largo de la matriz de colágeno tubular reforzada con fibras de polímero. Después, el mandril se hizo girar lentamente a aproximadamente 40-50 rpm para enrollar firmemente las fibras a su alrededor, formando así una segunda capa de matriz de colágeno.

Las fibras de colágeno de las dos capas de la matriz de colágeno tubular se deshidrataron parcialmente eliminando el exceso de solución al comprimir la matriz de colágeno tubular en el mandril giratorio contra dos placas, para así controlar con precisión el grosor de la pared de la matriz de colágeno tubular.

15 El tubo de doble capa resultante se liofilizó y se cortó longitudinalmente para retirarlo del mandril. Después, la lámina resultante de la matriz de colágeno de doble capa reforzada con polímero se humedeció, como se describe en el ejemplo 3 anterior, y luego se prensó sobre un molde para formar la lámina en forma de arco. La lámina de matriz de doble capa se reticuló mientras se mantenía en forma de arco, se enjuagó y liofilizó de nuevo como se describe en el ejemplo 1.

20 Ejemplo 5: Caracterización de los implantes

Permeabilidad

25 Los implantes tubulares que tenían un diámetro interior (DI) de 1,5 mm y una longitud de 5-6 cm se hidrataron primero en tampón fosfato de 0,01 M, con pH 7,0, y luego se introdujeron 50 µl de una solución de 5 mg/ml que contenía una molécula sonda. Las moléculas sonda incluían glucosa (PM de 180 Dal), mioglobina (PM de 16.000 Dal), anhidrasa carbónica (PM de 29.000 Dal), albúmina de suero bovino (BSA: PM de 67.000 Dal), β-galactosidasa (PM de 456.000 Dal) y dextrano azul (PM de 2×10^6 Dal). Después de cerrar los extremos de los implantes de reparación nerviosa, se colocaron en una cámara que contenía 10 ml de tampón fosfato 0,01 M, pH 7,0, y se dejó equilibrar durante 24 horas a temperatura ambiente. Las moléculas sonda que penetraron a través de la membrana del implante nervioso se midieron mediante el ensayo de Bradford para las proteínas y el ensayo con Antrona para los carbohidratos.

La permeabilidad de un implante conformado se midió en una cámara de dos compartimientos en la que el implante conformado separaba las dos cámaras. Las moléculas sonda se introdujeron en una de las cámaras y se dejaron difundir a través del implante conformado durante 24 horas. Luego, se midió la cantidad de moléculas sonda en la otra cámara tras 24 horas, como se describió anteriormente.

Densidad

35 Los implantes tubulares se secaron en un desecador sobre P_2O_5 durante 24 horas y su peso en seco se determinó utilizando una balanza analítica (modelo Mettler AE240). La longitud, el DI y el diámetro exterior (DE) se midieron utilizando un calibrador (Mitutoyo). La densidad se calculó como el peso en seco dividido por el volumen $[(\pi r_{DE}^2 L) - (\pi r_{DI}^2 L)]$, donde r_{DE} = radio del DE, r_{DI} = radio del DI y L = longitud del implante. Para muestras no tubulares, se midieron el grosor, el área y el peso del implante y la densidad se calculó en consecuencia.

Resistencia a la deformación

45 Los implantes tubulares se hidrataron en agua destilada durante 5 minutos. Los implantes se alinearon a lo largo del borde inferior de un transportador y ambos extremos del implante se plegaron para formar un ángulo. El grado de resistencia a la deformación se definió como el ángulo en el que el implante se deforma. Una deformación se define como una flexión cerrada que causa una oclusión de la luz del implante tubular.

Resistencia a la extracción de la sutura

50 Los implantes tubulares se abrieron a lo largo de su longitud y se hidrataron en agua durante 5 minutos. Se colocó una sutura de seda 3-0 a aproximadamente 3 mm del borde del tubo a lo largo de la orientación longitudinal y se unió a un banco de pruebas con plataforma mecánica (Chatillon TCD-200, Greensboro, NC). La muestra se separó lentamente a una velocidad de 2,54 cm/min y la tensión a la que se extrajo la sutura se midió con un medidor digital de fuerza Chatillon DFGS2.

Resistencia a la compresión

5 Los implantes tubulares se hidrataron en agua durante 5 minutos. Las muestras se colocaron en un banco de pruebas Chatillon TCD-200. Las muestras se comprimieron lentamente a una velocidad de 1,27 cm/min hasta que las paredes del tubo entraron en contacto entre sí. La fuerza de compresión requerida se midió con un medidor digital de fuerza Chatillon DFGS2.

La resistencia a la compresión de un implante conformado se midió de manera similar, excepto por que la muestra se comprimió hasta que la pared del implante entró en contacto con la base del banco de pruebas.

Temperatura de transición hidrotérmica (T_s)

10 Las temperaturas de transición hidrotérmica se midieron usando un calorímetro diferencial de barrido (Mettler/Toledo DSC882). Se troqueló una muestra de un implante y se colocó en una bandeja de aluminio de 40 µl con 20 µl de solución salina tamponada con fosfato 0,01 M, pH 7,0 y se selló. La T_s se midió a una velocidad de calentamiento de 5 °C/min y se adoptó como lectura máxima.

La siguiente tabla 1 resume los resultados de la caracterización *in vitro* de implantes tubulares.

TABLA 1. Caracterización de implantes tubulares*

Características	Comparativa (sin refuerzo de polímero)	Refuerzo de fibra de polímero
Grosor de pared (mm)	0,41±0,02 [4]	0,41±0,02 [4]
Resistencia a la deformación (grados)	46±5 [4]	80±4 [4]
Resistencia a la extracción de la sutura (kg)	0,13±0,031 [4]	0,25±0,059 [4]
Resistencia a la compresión (N)	0,19±0,04 [4]	3,4±0,43 [4]
Temperatura de transición hidrotérmica (°C)	61±2,1 [4]	64±0,7 [3]
Permeabilidad (%)		
Mioglobina (PM de 16.000)	81±9,3 [6]	67±7,9 [6]
Anhidrasa carbónica (PM de 29.000)	53±19 [6]	41±8,0 [6]
BSA (PM de 67.000)	36±10 [6]	22±6 [6]
β-galactosidasa (PM de 456.000)	24±5 [6]	16±3 [6]

15 *Datos indicados como media±desviación estándar. El número en [] indica el número de muestras analizadas.

20 Los resultados de los estudios de caracterización mostraron que el implante tubular reforzado con fibra de polímero es resistente a la compresión y a la deformación. La membrana del implante es permeable a las moléculas hasta el tamaño de la BSA, un tamaño comparable a muchas moléculas de nutrientes y factores de crecimiento. La temperatura de transición hidrotérmica indicó que el implante tenía un tiempo de reabsorción *in vivo* de aproximadamente 6-12 meses según estudios previos. Véase Yuen D., Ulreich J.B. Zuclich G., Lin H.B. y Li S.T., 2000 "*Prediction of in vivo stability of a resorbable, reconstituted type I collagen membrane by in vitro methods*", Trans. Sixth World Biomaterials Congress, pág. 222.

Además, como se muestra en la figura 5, El implante tubular reforzado con fibra de polímero sigue siendo resistente a la deformación incluso después de su incubación en solución salina a 37 °C durante 4 semanas.

25 Ejemplo 6: Estudios en animales

El nervio ciático de la rata se utilizó como modelo para evaluar los implantes de reparación nerviosa. Se anestesiaron ratas Lewis hembra (250-300 g) con pentobarbital sódico, y después se afeitó y limpió el sitio de la incisión antes de exponer el nervio ciático.

30 En un grupo de autoinjerto de control, se extirpó una sección de 10 mm del nervio ciático, se invirtió, se giró 180° y se volvió a suturar en su lugar con sutura de nailon 10-0. En un segundo grupo de control y el grupo experimental, se extirpó un segmento de 5 mm del nervio, creando un espacio de 10 mm después de la retracción del nervio cortado transversalmente. Se insertaron dos milímetros de cada muñón de nervio en cada extremo de un implante tubular de 14 mm que carecía de refuerzo de fibra de polímero (segundo grupo de control) o en un implante tubular de reparación nerviosa resistente a la compresión y deformación de 14 mm de la presente invención (grupo experimental) y se suturó en su lugar con sutura de nailon 10-0, creando un espacio de 10 mm. La reparación del nervio ciático se observó durante 12 y 24 semanas.

Los análisis histológicos e histomorfométricos se realizaron utilizando la vista en sección transversal de micrografías de luz en la sección media del nervio regenerado.

40 En el grupo experimental, todos los implantes tubulares de reparación nerviosa resistentes a la compresión y deformación conservaron su área en sección transversal circular con una alteración geométrica mínima. La regeneración nerviosa fue sólida tras 12 semanas de cirugía. En este momento, la mayor parte del espacio de la luz

de los implantes se había llenado de axones regenerados, y las fibras de colágeno, aunque estaban parcialmente degradadas, aún conservaban intacto su aspecto.

5 A las 24 semanas después de la cirugía, la luz estaba completamente llena de axones regenerados. El núcleo nervioso regenerado era redondo y, en la mayoría de las muestras, el implante original se había degradado y reabsorbido por completo. En algunas de las muestras, no se pudo identificar el margen entre el tejido del núcleo nervioso y el implante.

10 En el grupo de control que recibió el implante sin refuerzo de fibra de polímero, la regeneración del nervio también fue bastante sólida en ambos puntos temporales. Debido a la baja resistencia a la compresión del implante nervioso de control, algunas secciones transversales de los implantes nerviosos mostraron una forma alargada. Además, el tamaño y la forma general del nervio regenerado en sección transversal a las 12 y 24 semanas variaron entre los animales, lo que reflejó una variación en el grado de contracción del implante individual. La mayoría de las fibras de colágeno de los implantes de control se reabsorbieron a las 12 semanas después de la cirugía.

15 En el grupo de control de autoinjerto, la regeneración nerviosa a las 12 y 24 semanas fue sólida. La regeneración apareció en gran medida dentro del dominio de la vaina epineural del autoinjerto. Sin embargo, el tamaño y la forma general del nervio regenerado en sección transversal en ambos puntos temporales variaron de un animal a otro, lo que reflejó una variabilidad intrínseca en el tamaño del autoinjerto.

20 La tabla 2 de más abajo resume los resultados de los estudios histomorfométricos descritos anteriormente. En todos los grupos de reparación, se observó un aumento en el número de axones mielinizados desde la semana 12 hasta la semana 24. El uso del implante inventivo, en comparación con el implante de control no reforzado, produjo inesperadamente un mayor número de axones mielinizados en ambos puntos temporales. Los animales que recibieron el implante de la invención presentaron, a las 12 semanas, un número de axones mielinizados parecido al de los animales del grupo de autoinjerto, y un número mayor al de los animales del grupo de autoinjerto a las 24 semanas. Cuando se compara con el grupo de autoinjerto, el implante de la invención obtuvo los resultados más similares en términos de número de axones mielinizados, tamaño de los axones mielinizados, área ocupada por el nervio regenerado y área ocupada por los axones mielinizados. Este hallazgo indica que la regeneración nerviosa mediante el uso del implante de la invención se puede comparar con la obtenida usando un autoinjerto, criterio de referencia para la reparación y regeneración de nervios.

TABLA 2. Resumen del análisis histomorfométrico

Tiempo (semanas)	Tipo de reparación	Número total de axones mielinizados	Diámetro promedio del axón (µm)	Área de tejido nervioso (mm ²)	% de área ocupada por axones
12	Sin refuerzo	3567±717 [10]	3,61±0,47 [10]	0,58±0,108 [10]	12,54±3,257 [10]
	Presente invención	5556±1254 [9]	3,95±0,54 [9]	0,80±0,09 [9]	7,96±1,084 [9]
	Autoinjerto	5424±1203 [8]	3,56±0,56 [8]	1,25±0,280 [8]	6,38±1,558 [8]
	Normal	5598±480 [8]	9,18±1,17 [8]	0,62±0,032 [8]	55,65±9,005 [8]
24	Sin refuerzo	5413±1441 [8]	3,99±0,67 [7]	0,53±0,131 [8]	14,18±3,183 [8]
	Presente invención	8621±1849 [10]	4,20±0,58 [10]	0,65±0,127 [10]	17,60±2,763 [10]
	Autoinjerto	5692±590 [8]	4,59±0,76 [8]	1,25±0,28 [8]	10,27±2,170 [8]
	Normal	6298±171 [9]	9,40±1,21 [8]	0,62±0,03 [9]	71,4±5,57 [9]

*Datos indicados como media±error estándar de la media

El número en [] representa el número de animales incluidos en el análisis de datos

30 La regeneración nerviosa facilitada por la implantación de la presente invención se caracterizó por una correlación lineal entre el número de axones mielinizados frente al área en sección transversal de la luz del implante. Como se muestra en la figura 6, el coeficiente de correlación de una gráfica de estos dos parámetros medidos a las 12 y 24 semanas fue de 0,61 y 0,71, respectivamente. Este hallazgo fue consecuente con la distribución axónica dentro del espacio de la luz. El coeficiente de correlación aumentó con el aumento del tiempo de implantación, lo que indicó que los axones mielinizados se distribuyeron más uniformemente en el espacio luminal a las 24 semanas en comparación con las 12 semanas. El implante de control no reforzado no mostró tal correlación.

40 Este hallazgo confirma la capacidad del implante tubular de reparación de nervios resistente a la compresión y a la deformación para mantener ventajosamente su integridad estructural durante todo el proceso de regeneración del nervio periférico. Actualmente se recomiendan productos comercialmente disponibles de reparación nerviosa basados en colágeno para la reparación de brechas cortas, es decir, de <2,5 cm. Las características físicas y fisicoquímicas del implante nervioso resistente a la compresión y deformación de la presente invención, tomadas en conjunto con los resultados del estudio en animales presentado anteriormente, indican que el presente implante puede usarse para cerrar separaciones nerviosas de más de 2,5 cm en humanos.

REIVINDICACIONES

1. Un implante resistente a la compresión y a la deformación para la reparación de nervios, que comprende una membrana tubular biopolimérica fabricada con materiales a base de colágeno y un filamento polimérico sintético biodegradable, teniendo la membrana tubular biopolimérica una superficie externa y siendo biocompatible, reabsorbible y semipermeable, siendo helicoidal el filamento polimérico sintético biodegradable y estando ubicado en la superficie externa de la membrana biopolimérica tubular, en donde el implante tiene una resistencia a la compresión de 1 N a 10 N y un ángulo de resistencia a la deformación de 40 grados a 150 grados, y en donde el filamento polimérico sintético biodegradable está formado por un polímero seleccionado del grupo que consiste en ácido poliglicólico, ácido poliláctico, copolímeros de ácido poliglicólico y ácido poliláctico, policaprolactona, copolímeros de ácido poliláctico y policaprolactona y copolímeros de ácido poliglicólico y policaprolactona.
2. El implante de la reivindicación 1, en donde la membrana biopolimérica tubular incluye colágeno tipo I.
3. El implante de la reivindicación 1, en donde el implante tiene un diámetro interno de 1,0 mm a 10 mm.
4. El implante de la reivindicación 1, en donde el implante tiene una longitud de 0,5 cm a 15 cm.
5. El implante de la reivindicación 1, en donde la membrana biopolimérica tubular tiene un grosor de 0,1 mm a 1 mm.
6. El implante de la reivindicación 1, en donde el filamento polimérico sintético biodegradable tiene un paso helicoidal de 1 mm a 2 mm.
7. El implante de la reivindicación 1, en donde el filamento polimérico sintético biodegradable está presente en una disposición entrecruzada.
8. El implante de la reivindicación 1, en donde la membrana tubular biopolimérica es permeable a las moléculas que tienen un peso molecular de <500.000 dalton, preferiblemente <100.000 dalton.
9. Un implante conformado resistente a la compresión para el aumento de crestas en cirugía dental, que comprende una membrana biopolimérica arqueada fabricada con materiales a base de colágeno y un filamento polimérico sintético biodegradable, teniendo la membrana biopolimérica arqueada una superficie externa y siendo biocompatible, reabsorbible y semipermeable, y ubicándose el filamento polimérico sintético biodegradable en la superficie externa de la membrana biopolimérica arqueada, en donde el implante tiene una resistencia a la compresión de 1 N a 10 N, y en donde el filamento polimérico sintético biodegradable está formado por un polímero seleccionado del grupo que consiste en ácido poliglicólico, ácido poliláctico, copolímeros de ácido poliglicólico y ácido poliláctico, policaprolactona, copolímeros de ácido poliláctico y policaprolactona y copolímeros de ácido poliglicólico y policaprolactona.
10. El implante de la reivindicación 9, en donde la membrana biopolimérica arqueada incluye colágeno tipo I.
11. El implante de la reivindicación 9, que comprende además una segunda membrana biopolimérica arqueada, en donde el filamento polimérico sintético biodegradable se incorpora entre la membrana biopolimérica arqueada y la segunda membrana biopolimérica arqueada, y en donde el implante tiene una resistencia a la compresión de 1 N a 10 N.
12. El implante de la reivindicación 11, en donde la segunda membrana biopolimérica arqueada incluye colágeno tipo I.
13. Un método para preparar un implante tubular resistente a la compresión y a la deformación, que comprende dispersar las fibras de colágeno purificadas, coacervar las fibras de colágeno purificadas dispersadas para formar fibras de colágeno reconstituidas, enrollar las fibras de colágeno reconstituidas en un mandril giratorio para formar un tubo de colágeno, enrollar un filamento de polímero sintético biodegradable en la superficie del tubo de colágeno, deshidratar parcialmente el tubo de colágeno, liofilizar el tubo de colágeno parcialmente deshidratado y reticular el tubo de colágeno parcialmente deshidratado liofilizado para formar un implante tubular resistente a la compresión y a la deformación, en donde el filamento de polímero sintético biodegradable se enrolla preferiblemente en un patrón entrecruzado, y en donde el filamento de polímero sintético biodegradable está formado por un polímero seleccionado del grupo que consiste en ácido poliglicólico, ácido poliláctico, copolímeros de ácido poliglicólico y ácido poliláctico, policaprolactona, copolímeros de ácido poliláctico y policaprolactona y copolímeros de ácido poliglicólico y policaprolactona.
14. Un método para preparar un implante resistente a la compresión, que comprende dispersar las fibras de colágeno purificadas, coacervar las fibras de colágeno purificadas dispersadas para formar fibras de colágeno reconstituidas, enrollar una primera porción de las fibras de colágeno reconstituidas en un mandril giratorio para formar un tubo de colágeno, enrollar un filamento de polímero sintético biodegradable en la superficie del tubo de colágeno, enrollar una segunda porción de las fibras de colágeno reconstituidas sobre la superficie del tubo de colágeno para formar una capa de colágeno que recubre el filamento de polímero sintético biodegradable y el tubo de colágeno, deshidratar parcialmente el tubo de colágeno recubierto, liofilizar el tubo de colágeno recubierto parcialmente deshidratado, cortar el tubo de colágeno recubierto liofilizado a lo largo de un eje longitudinal para formar una lámina, humedecer la lámina, moldearla con una forma arqueada y reticular la lámina moldeada para formar un implante resistente a la compresión,

en donde el filamento de polímero sintético biodegradable se enrolla preferiblemente en un patrón entrecruzado, y en donde el filamento polimérico sintético biodegradable está formado por un polímero seleccionado del grupo que consiste en ácido poliglicólico, ácido poliláctico, copolímeros de ácido poliglicólico y ácido poliláctico, policaprolactona, copolímeros de ácido poliláctico y policaprolactona y copolímeros de ácido poliglicólico y policaprolactona.

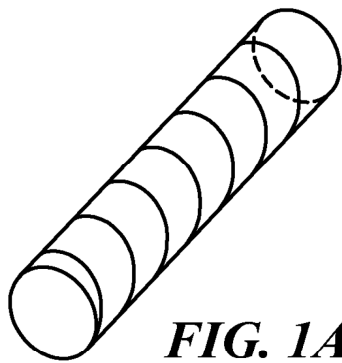


FIG. 1A

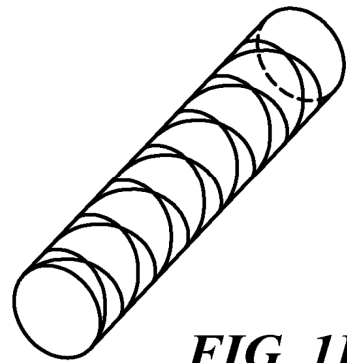


FIG. 1B

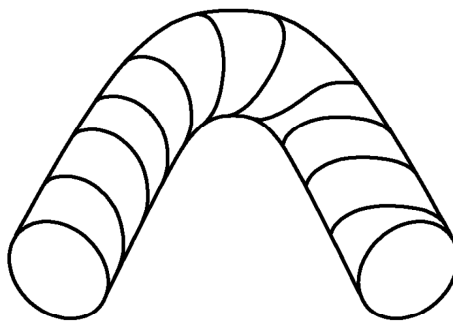


FIG. 2

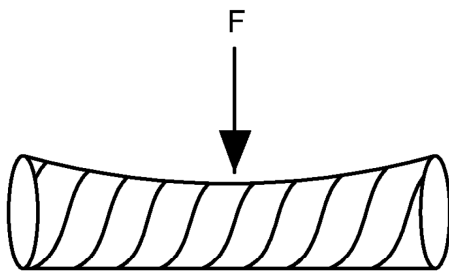


FIG. 3A

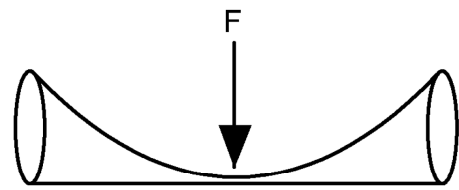


FIG. 3B

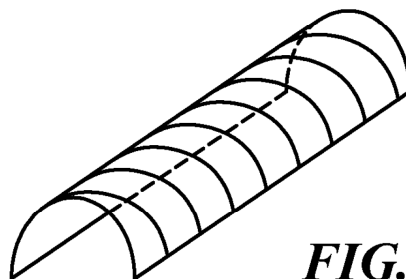


FIG. 4

Resistencia a la compresión o guía nerviosa a lo largo del tiempo en una solución salina a 37°C

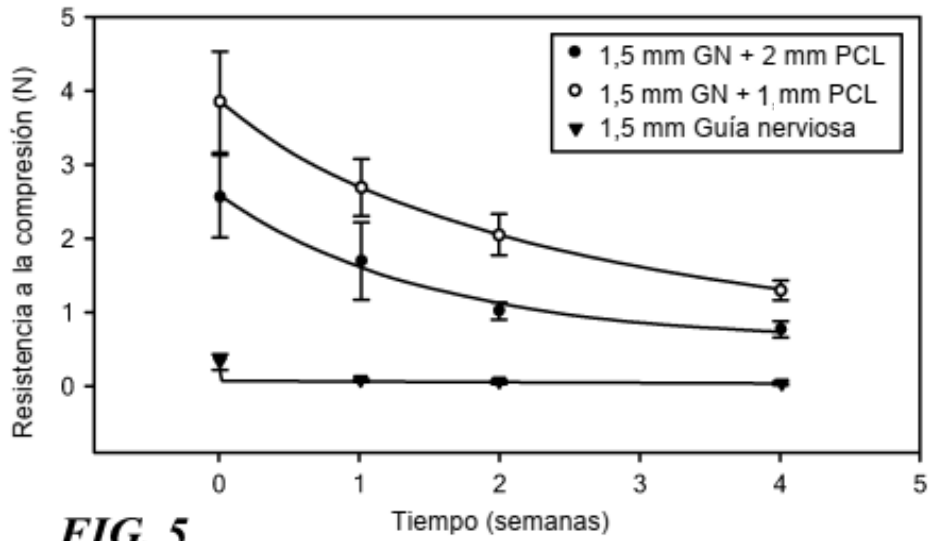


FIG. 5

Gráfica del número de axones mielinizados frente al área en sección transversal de la luz del implante

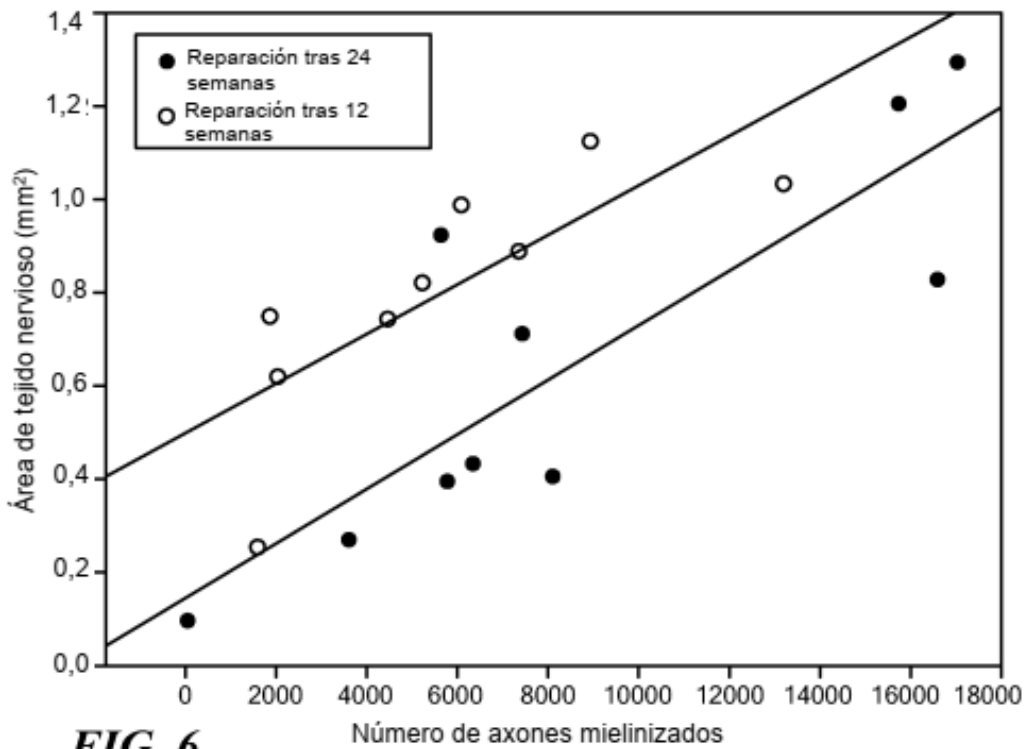


FIG. 6