

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 613 672**

51 Int. Cl.:

A61L 27/56 (2006.01)

A61L 27/24 (2006.01)

A61F 2/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.12.2015** **PCT/EP2015/079754**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.06.2016** **WO2016096831**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.12.2015** **E 15808663 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.12.2016** **EP 3055000**

54 Título: **Esponja de colágeno**

30 Prioridad:

15.12.2014 EP 14197987

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

25.05.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

IMHOF, CORNEL;
SCHLOESSER, LOTHAR;
STIEFEL, NIKLAUS y
WÜEST, MARTIN

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 613 672 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

Esponja de colágeno

- 5 La invención se refiere a una nueva esponja de colágeno químicamente reticulada resorbible elástica para promover el aumento de volumen de tejido blando en la región oral, un proceso de preparación de la esponja de colágeno químicamente reticulada resorbible elástica y el uso de la misma como un implante en la cavidad bucal para el aumento de volumen de tejido blando.
- 10 El aumento de volumen de tejido blando se ha convertido en uno de los mayores retos en la cirugía dental y craneo-maxilofacial. Con el fin de mejorar tanto los resultados funcionales como estéticos por el aumento de volumen de tejido blando, injertos de tejido autógeno, tales como el injerto gingival libre (FGG) o el injerto de tejido conjuntivo subepitelial (SCTG), a pesar de sus inconvenientes, todavía se usan ampliamente para diversas indicaciones y son considerados el método de referencia (F. Cairo et al., 2008, J. Clin. Peryodontol. 35 (Suppl. 8), 314-319; R. Jung et al., 2004, Int. J. Peryodontics Restorative Dent. 24(6), 545-553 y D. Thoma, 2009, Clin. Oral Implants Res. 20 (suppl. 4), 146-165). Sin embargo, el procedimiento de recogida de tejido autógeno en un segundo sitio quirúrgico normalmente en el paladar tiene inconvenientes para el paciente y limitaciones en cuanto a la calidad y cantidad de
- 15 tejido que puede recuperarse.
- 20 Así, es deseable un dispositivo regenerativo para promover el aumento de volumen de tejido blando en la región oral.
- Las células gingivales del tejido conjuntivo oral se exponen a complejas fuerzas mecánicas durante la masticación, tragado, movimiento de la lengua, habla, movimiento de los dientes y tratamiento ortodóncico. Especialmente
- 25 durante la cicatrización tras procedimientos quirúrgicos, pueden producirse fuerzas internas y externas, creando presión sobre el dispositivo regenerativo y el tejido recién formado.
- Un dispositivo regenerativo tiene que cumplir ciertos criterios antes de ser usado en la cavidad bucal para el aumento de volumen de tejido blando: Debe ser biocompatible, resorbible *in vivo*, permitir el crecimiento hacia
- 30 adentro gingival, mostrar un buen nivel de integración de tejido tal como para permitir la curación sin incidentes (sin excesiva inflamación o dehiscencia) y ser capaz de resistir a las fuerzas mecánicas que actúan como un armazón que mantiene el volumen de tejido durante un tiempo suficiente durante el proceso de cicatrización después de la implantación, generalmente al menos aproximadamente 3 meses.
- 35 Ninguno de tales dispositivos regenerativos ha sido desvelado hasta la fecha en el estado de la técnica.
- H. Mathes et al. en "A Bioreactor Test System to mimic the Biological and Mechanical Environment of Oral Soft Tissues and to Evaluate Substitutes for Connective Tissue Grafts", 2010, Biotechnology and Bioengineering, Vol. 107, No. 6, páginas 1029-39, desvelan que tales propiedades de un dispositivo regenerativo que consiste en una esponja
- 40 de colágeno podrían lograrse por la rigidización del cuerpo de matriz reticulando las fibras de colágeno con un grado que permitiera el equilibrio correcto entre la estabilidad mecánica (alto grado de reticulación) y la curación de tejido blando sin incidentes (bajo grado de reticulación), pero son totalmente silenciosos sobre cómo preparar una esponja de colágeno tal. Desvelan que tres prototipos diferentes de esponja de colágeno que consisten en colágeno porcino tipo I y III con un diámetro de poro promedio de 92 µm y 93 % de porosidad y que se diferencian en su grado de
- 45 reticulación (prototipos proporcionados por Geistlich Pharma, Wolhusen, Suiza) mostraron después del cultivo bajo estimulación mecánica durante 14 días una retención de volumen satisfactoria con una buena vitalidad de células de fibroblastos.
- DS Thoma et al. en "Soft tissue volume augmentation by the use of collagen-based matrixes: a volumetric analysis", 2010, J. of Clin. Periodontology 37, 659-666, y "Soft tissue volume augmentation by the use of collagen-based matrixes in a dog mandible - a histological analysis", 2011, J. Clin. Periodontol.: 38:1063-1070, desvelan que uno de
- 50 los prototipos de esponja de colágeno citados en la publicación anterior de H. Mathes et al. mostró después de un periodo de 28 o 84 días de implementación en un defecto crónico de la cresta de una mandíbula de perro la misma retención de volumen que el método de referencia, SCTG (injerto de tejido conjuntivo subendotelial).
- 55 B. Hafemann et al. en Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 12 (2001) 437-446, desvelan el uso de la carbodiimida 1-etil-3(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) junto con N-hidroxisuccinimida para aumentar la resistencia contra la degradación enzimática de una membrana xenógena que consiste en colágeno nativo procesado y elastina de origen porcino que se indicó que servía de molde para la formación de una neo-dermis.
- 60 El estado de la técnica no desvela ni sugiere cuáles de las características de un prototipo de esponja de colágeno químicamente reticulada tal, o de cualquier otro dispositivo de colágeno regenerativo que cumpla los criterios expuestos anteriormente para un uso en la cavidad bucal para el aumento de volumen de tejido blando, o cómo puede producirse un dispositivo tal.
- 65

El documento EP-1561480 desvela un dispositivo de colágeno resorbible para su uso como un sustituto de la duramadre para hacer crecer tejido meníngeo, que comprende una hoja de colágeno químicamente reticulado que tiene la mayoría de poros por debajo de 10 μm y un método de preparación de ese dispositivo de colágeno que comprende las etapas de mezclar el colágeno con agua bajo condiciones tales que la mezcla contenga colágeno sustancialmente solubilizado, liofilizar la mezcla en un dispositivo de colágeno y reticular químicamente el dispositivo de colágeno, usando como agente de reticulación formaldehído o glutaraldehído. Un sustituto de la duramadre no se expone, al igual que un dispositivo regenerativo para promover el aumento de volumen de tejido blando en la región oral, durante la cicatrización a la presión creada por las complejas fuerzas mecánicas anteriormente mencionadas.

El documento US-2004-0265785 describe un proceso de producción de una membrana de colágeno-elastina que contiene al menos 20 % (peso/peso) de elastina, que comprende las etapas de primero eliminar químicamente las sustancias acompañantes hidrófobas de un material de colágeno que contiene elastina de origen natural, luego eliminar químicamente sustancias no hidrófobas. El producto de colágeno-elastina no está químicamente reticulado.

Boekema B.K.L.H. et al., 2014, Journal of Material Sciences: Materials in Medicine, February 2014 25: 423-433, describen el efecto sobre la cicatrización del tamaño de poro y la reticulación sobre armazones de colágeno-elastina usados como sustitutos dérmicos. Los armazones químicamente reticulados de EDC-NHS desvelados contienen 10-15 % de elastina, tienen un tamaño de poro de 80 a 120 μm y una temperatura de desnaturalización de 64 a 69 $^{\circ}\text{C}$ (véase la Tabla 1, página 425). Se esterilizan por tratamiento con gas de óxido de etileno. Los autores llegan a la conclusión de que la reticulación afecta negativamente la cicatrización en varios parámetros importantes, en particular reduciendo la capacidad de fibroblastos para proliferar y sustituir el sustituto dérmico por tejido nuevo. Un sustituto dérmico no se expone, al igual que un dispositivo regenerativo para promover el aumento de volumen de tejido blando en la región oral, durante la cicatrización a la presión creada por las complejas fuerzas mecánicas anteriormente mencionadas.

El problema u objetivo de la invención es encontrar un dispositivo de colágeno regenerativo para promover el aumento de volumen de tejido blando en la región oral que sea biocompatible, resorbible *in vivo*, permita el crecimiento hacia adentro gingival, muestre un buen nivel de integración de tejido tal como para permitir la curación sin incidentes (sin excesiva inflamación o dehiscencia) y sea capaz de resistir a las fuerzas mecánicas actuando como un armazón que mantiene el volumen de tejido durante un tiempo suficiente durante el proceso de cicatrización después de la implantación, generalmente al menos aproximadamente 3 meses.

El problema anterior se resuelve por la invención como se define en las reivindicaciones adjuntas.

La invención se refiere a una esponja de colágeno químicamente reticulada resorbible elástica para promover el aumento de volumen de tejido blando en la región oral, que comprende 60-96 % (peso/peso) de colágeno y 4-40 % (peso/peso) de elastina, que muestra por porosimetría de intrusión de mercurio poros interconectados con una mediana del diámetro de poro entre 50 y 90 μm y al menos el 80 % de porosidad con un diámetro de poro superior a 10 μm , una temperatura de aparición de 45 a 57 $^{\circ}\text{C}$ y una densidad en estado seco de 50 a 65 mg/cm^3 .

La esponja de colágeno químicamente reticulada comprende 60-96 % (peso/peso) de colágeno y 4-40 % (peso/peso) de elastina. El contenido de elastina se mide aquí por la determinación de desmosina/isodesmosina según una modificación de un método conocido que implica la hidrólisis y RP-HPLC (véase, por ejemplo, Guida E. et al. 1990 Development and validation of a high performance chromatography method for the determination of desmosines in tissues in Journal of Chromatography o Rodrigue P 2008 Quantification of Mouse Lung Elastin During Prenatal Development in The Open Respiratory Medicine Journal). Para determinar el contenido de desmosina/isodesmosina de la elastina seca, la elastina de la esponja se somete a procedimientos de aislamiento de elastina como se describe por Starcher and Galione 1976 Purification and Comparison of Elastin from Different Animal Species in Analytical Biochemistry.

Esa esponja se deriva adecuadamente de tejidos de origen natural que contienen tales proporciones de colágeno y elastina. Ejemplos de tales tejidos incluyen membrana de peritoneo o de pericardio de mamífero (por ejemplo, porcina o bovina), membrana de placenta, submucosa de intestino delgado (SIS) y dermis. Normalmente, el colágeno es predominantemente colágeno tipo I, colágeno tipo III o una mezcla de los mismos. El colágeno también puede incluir una proporción de en particular colágeno tipo II, tipo IV, tipo VI o tipo VIII, o cualquier combinación de aquellos o cualquier tipo de colágeno.

El término "colágeno" usado en la presente solicitud normalmente se refiere a aquella combinación de 60-96 % (peso/peso) de colágeno y 4-40 % (peso/peso) de elastina.

Preferentemente, la esponja de colágeno químicamente reticulada comprende 70-90 % (peso/peso) de colágeno y 10-30 % (peso/peso) de elastina.

Un ejemplo de un material de partida adecuado para preparar una esponja de colágeno químicamente reticulada tal es una suspensión de fibras de colágeno de la membrana preparada a partir de peritoneo porcino o bovino por un proceso similar al descrito en "Ejemplo" del documento EP-B1-1676592 o a partir de la membrana Geistlich Bio-

Gide® (obtenible de Geistlich Pharma A.G., Suiza) preparada a partir de peritoneo porcino por un proceso muy similar y/o una suspensión de fibras de colágeno preparada a partir de dermis porcina por un proceso similar al descrito en el Ejemplo 7 del documento WO 2012/084214.

- 5 La esponja de colágeno químicamente reticulada resorbible elástica anterior promueve el aumento de tejido blando en la región oral promoviendo el crecimiento hacia adentro de células gingivales mientras que se mantiene el volumen después de la carga y descarga de estreses mecánicos.

10 Para promover el crecimiento hacia adentro de células gingivales, la esponja de colágeno químicamente reticulada debe tener una alta porosidad (fracción de volumen de poros) en un intervalo de diámetro apropiado para que los fibroblastos gingivales crezcan. Se ha encontrado que este crecimiento hacia adentro se promueve adecuadamente cuando la esponja muestra por porosimetría de intrusión de mercurio poros interconectados con una mediana del diámetro de poro entre 50 y 90 μm y al menos el 80 %, preferentemente al menos el 90 %, de porosidad con un diámetro de poro superior a 10 μm . La esponja químicamente reticulada con una distribución de poros tal se prepara
15 adecuadamente por un proceso que comprende mezclar antes de la reticulación en proporciones apropiadas una suspensión de fibras de colágeno de la membrana preparada a partir de peritoneo porcino o bovino como se desveló en el párrafo previo y una suspensión de fibras de colágeno preparada a partir de dermis porcina como se desveló en el párrafo previo.

- 20 El término "elástico" significa aquí que la esponja de colágeno químicamente reticulada es resistente a la presión, es decir, capaz de recuperar una gran parte de su volumen original después de ser sometida a presión *in vitro* o *in vivo*.

25 Para mantener el volumen en la región oral, la esponja químicamente reticulada resorbible elástica debe ser capaz resistir a las complejas fuerzas mecánicas inducidas por la masticación, movimiento de la lengua, habla y movimiento de los dientes que actúan como un armazón que mantiene el volumen de tejido durante un tiempo suficiente durante el proceso de curación después de la implantación, generalmente aproximadamente 3 meses. Se ha encontrado que este comportamiento elástico *in vivo* del implante se obtiene cuando, en una prueba mecánica *in vitro* de compresión cíclica a una temperatura de 37 °C de la esponja de colágeno humedecida por una solución salina de tampón fosfato (PBS) diseñada para imitar los líquidos corporales, la retención de espesor con respecto al
30 espesor inicial es al menos del 70 %, preferentemente al menos del 80 %, más preferentemente al menos del 85 %, o la retención de histéresis con respecto a la primera carga es inferior al 55 %, preferentemente inferior al 45 %, después de 49 ciclos de compresión a una presión de 12,1 kPa.

- 35 Se ha encontrado que la retención de espesor *in vitro* anterior de al menos el 70 % y la retención de histéresis inferior al 55% combinadas con la curación *in vivo* sin excesiva inflamación o dehiscencia se obtiene cuando la esponja muestra una temperatura de aparición de 45 a 57 °C y una densidad en estado seco de 50 a 65 mg/cm^3 .

40 La temperatura de aparición se mide por DSC en la esponja de colágeno humedecida con una solución de tampón según la norma de la Farmacopea estadounidense: Ph. Eur. 2.2.34, USP <891> (composición de tampón para 1 litro de agua: 8 g de cloruro sódico, 0,2 g de fosfato de potasio, 1,15 g de fosfato de sodio y 0,2 g de cloruro de potasio; temperatura inicial 15 °C, temperatura final 90 °C, velocidad de calentamiento 5 °C/min). Este parámetro refleja el grado de reticulación de la esponja. La temperatura de aparición está estrechamente asociada a la resistencia *in vitro* de la esponja a compresión cíclica (retención de espesor o retención de histéresis en la prueba mecánica de compresión cíclica), resiliencia *in vivo* (mantenimiento del volumen de tejido durante un tiempo suficiente durante el
45 proceso de curación después de la implantación) y buena integración en los tejidos circundantes (sin excesiva inflamación o dehiscencia).

- 50 La resistencia *in vitro* requerida a la compresión cíclica y la resiliencia *in vivo* combinadas con la curación *in vivo* sin excesiva inflamación o dehiscencia pueden obtenerse cuando la temperatura de aparición es de 45 a 57 °C, preferentemente de 46 a 53 °C. Cuando la temperatura de aparición está por debajo de 46 °C, la resistencia *in vitro* a la compresión cíclica y la resiliencia *in vivo* pueden ser no suficientes. Cuando la temperatura de aparición es superior a 57 °C, hay un riesgo sustancial de acontecimientos adversos tales como excesiva inflamación y/o dehiscencia que aparecen después de la implantación.

- 55 La densidad en estado seco, medida pesando y midiendo el volumen de la esponja de colágeno después de una amplia liofilización (como se describe en detalle más adelante), es otro parámetro esencial o crítico para alcanzar la resistencia *in vitro* requerida a la compresión cíclica y la resiliencia *in vivo* combinadas con la curación *in vivo* sin excesiva inflamación o dehiscencia. Aquellas características pueden obtenerse cuando la densidad en estado seco es de 50 a 65, preferentemente de 50 a 60 mg/cm^3 . Cuando la densidad en estado seco está por debajo de
60 50 mg/cm^3 , la resistencia *in vitro* a la compresión cíclica y la resiliencia *in vivo* pueden no ser suficientes. Cuando la densidad en estado seco es superior a 65 mg/cm^3 , hay un riesgo de acontecimientos adversos tales como excesiva inflamación y/o dehiscencia que aparecen después de la implantación.

- 65 El término "resorbible" significa aquí que la esponja de colágeno químicamente reticulada es capaz de ser resorbida *in vivo*, en particular mediante la acción de colagenasas y elastasas. Una resorbibilidad *in vivo* controlada de la esponja de colágeno químicamente reticulada es esencial para curar sin excesiva inflamación o dehiscencia. La

prueba de degradación enzimática usando collagenasa de *Clostridium histolyticum* descrita en detalle más adelante da una predicción excelente de la resorbibilidad *in vivo*.

5 En esa prueba, para todas las muestras de la esponja de colágeno químicamente reticulada resorbible elástica estéril según la invención que mostraron *in vivo* una interesante retención de volumen y curación sin acontecimientos adversos tales como excesiva inflamación o dehiscencia, el colágeno se degradó completamente en 3 a 5 horas.

10 La esponja de colágeno químicamente reticulada resorbible elástica anterior se prepara adecuadamente a partir de tejidos de origen natural por un proceso que comprende liofilización y reticulación química. Tejidos apropiados de origen natural incluyen membranas de peritoneo o pericardio porcino o bovino, membrana de placenta porcina o bovina y SIS o dermis porcina o bovina. Preferentemente, los tejidos de origen natural incluyen membrana de peritoneo porcino o bovino y dermis porcina. El proceso anterior que comprende liofilización y reticulación química va generalmente seguido de una etapa de esterilización, que es adecuadamente esterilización por irradiación y o
15 irradiación con rayos X.

La reticulación química puede realizarse usando cualquier agente de reticulación farmacéuticamente aceptable capaz de dar a la esponja de colágeno químicamente reticulada resorbible elástica la retención de espesor requerida con respecto al espesor inicial o retención de histéresis con respecto a la primera carga en la prueba de compresión
20 cíclica. Agentes de reticulación adecuados tales incluyen glutaraldehído, formaldehído, acetaldehído, 1,4-butano diglicidil éter (BDDGE), N-sulfosuccinimidil-6-(4'-azido-2'-nitrofenilamino)hexanoato, diisocianato de hexametileno (HMDI), cinamida, difenilfosforilazida, genipina, EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida) y una mezcla de EDC y NHS (N-hidroxisuccinimida). Pequeñas cantidades o trazas del agente de reticulación sin reaccionar o productos de reacción directa típicos del mismo pueden normalmente detectarse en la esponja de colágeno
25 químicamente reticulada resorbible elástica.

Preferentemente, la reticulación química se realiza usando un agente de reticulación seleccionado de glutaraldehído, EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida) y una mezcla de EDC y NHS (N-hidroxisuccinimida). Prototipos interesantes de esponjas de colágeno químicamente reticuladas resorbibles elásticas según la invención han sido de
30 hecho preparadas usando cada uno de aquellos agentes de reticulación.

Se han preparado más de 1000 prototipos diferentes de esponjas de colágeno usando como agente de reticulación EDC o una mezcla de EDC y NHS y probado en diversas pruebas *in vitro* y/o pruebas en animales *in vivo*, en particular en ratones, ratas, conejos y perros. Preferentemente, la reticulación química se realiza usando uno de
35 aquellos dos agentes de reticulación.

La esponja de colágeno resorbible elástica de la invención ha sido probada en particular en:

- 40 - un estudio en animales que implica la medición del aumento de volumen de mucosa por implantación en defectos crónicos de mandíbulas de perros en comparación con el método de referencia SCTG (injerto de tejido conjuntivo subepitelial), y
- 45 - un estudio clínico para investigar su rendimiento y seguridad en los procedimientos de aumento de tejido para obtener espesor de mucosa alrededor de implantes dentales en la cavidad bucal en comparación con el método de referencia para el aumento de volumen de tejido blando SCTG (injerto de tejido conjuntivo subepitelial).

En ambos de aquellos estudios, la esponja de colágeno químicamente reticulada resorbible elástica de la invención mostró después de la implantación de 3 meses una integración excelente en los tejidos circundantes sin excesiva inflamación o dehiscencia, la misma seguridad y la misma retención de volumen de tejido blando (es decir, no estadísticamente diferentes) que SCTG.
50

La esponja de colágeno químicamente reticulada resorbible elástica anterior puede prepararse por un proceso que comprende las etapas de:

- 55 (a) Someter una membrana de peritoneo o pericardio porcino o bovino a un tratamiento básico en una solución de hidróxido sódico a un pH superior a 12, un tratamiento ácido en una solución de clorhídrico de pH de 1 a 3, un tratamiento deshidratante con un disolvente orgánico soluble en agua y un tratamiento desengrasante con un disolvente orgánico,
60 moler la membrana seca obtenida con un molino de corte, tamizar a través de un tamiz de 0,5-2 mm y suspender el polvo obtenido en una solución acuosa acidificada de pH de 2,5 a 3,5, tal como para obtener una suspensión de fibras de colágeno,
- (b) Someter dermis bovina o porcina picada a un tratamiento deshidratante con un disolvente orgánico soluble en agua, un tratamiento desengrasante con un disolvente orgánico, un tratamiento básico en una base inorgánica fuerte a un pH superior a 12, un tratamiento ácido en un ácido inorgánico fuerte a un pH de 0 a 1, aclarar con
65 agua y suspender las fibras de colágeno, liofilizar, limpiar las fibras de colágeno secadas con un disolvente orgánico y picar las fibras secadas limpias en una solución acidificada de pH de 3 a 4, tal como para obtener una

suspensión de fibras de colágeno,

(c) Mezclar 3,5 a 4,5 partes de la suspensión de fibras de colágeno obtenida en (a) con 0,5 a 1,5 partes de la suspensión de fibras de colágeno obtenida en (b), tal como para obtener una suspensión resultante,

(d) Liofilizar la suspensión resultante obtenida en (c) y reticular el producto liofilizado en una solución que contiene un agente de reticulación, lavar con agua y liofilizar, y

(e) Opcionalmente esterilizar el producto liofilizado obtenido en (d) por irradiación y o irradiación por rayos X.

La etapa (a) puede realizarse similarmente al proceso descrito en "Ejemplo" del documento EP-B1-1676592 sometiendo las membranas peritoneales de terneros jóvenes o cerdos jóvenes a lavado con agua, un tratamiento básico con solución al 2 % de hidróxido sódico, lavado con agua, un tratamiento ácido en una solución al 0,5 % de clorhídrico, lavado con agua hasta que se obtiene un pH de 3,5, encogimiento del material con 7 % de solución salina, lavado con agua, deshidratación con acetona y desengrasado con n-hexano, molienda de la membrana seca obtenida con un molino de corte, tamizado a través de un tamiz de 0,5-2 mm y suspensión del polvo obtenido en una solución acuosa acidificada de pH de 2,5 a 3,5, tal como para obtener una suspensión de fibras de colágeno de peritoneo porcino o bovino.

La etapa (a) se realiza convenientemente moliendo la membrana estéril Geistlich Bio-Gide® (obtenible de Geistlich Pharma A.G., Suiza) con un molino de corte, tamizando a través de un tamiz de 0,5-2 mm y suspendiendo el polvo obtenido en una solución acuosa acidificada de pH de 2,5 a 3,5, tal como para obtener una suspensión de fibras de colágeno de peritoneo porcino.

Preferentemente, el polvo obtenido después de moler con un molino de corte se tamiza a través de un tamiz de 0,5-1 mm.

La etapa (b) puede realizarse similarmente al proceso desvelado en el Ejemplo 7 del documento WO 2012/084214 sometiendo la piel porcina picada a un tratamiento deshidratante con un disolvente orgánico soluble en agua tal como un alcohol o una cetona, un tratamiento desengrasante con un disolvente orgánico tal como dicloroetano o cloruro de metileno, un tratamiento básico en una base inorgánica fuerte a un pH superior a 12 durante un periodo de 6 a 24 horas, un tratamiento ácido en un ácido inorgánico fuerte a un pH de 0 a 1 durante un periodo de 1 a 12 horas, aclarando con agua y suspendiendo las fibras de colágeno en presencia de un regulador del hinchamiento, liofilizando, limpiando las fibras de colágeno secadas con diferentes disolventes orgánicos tales como alcoholes, éteres, cetonas e hidrocarburos clorados y picando en un molino coloidal las fibra secadas limpias en una solución acidificada de pH de 3 a 4, tal como para obtener una suspensión de fibras de colágeno de dermis porcina.

El % (peso/peso) de colágeno en la suspensión de fibras de colágeno preparada en la etapa (a) y el % (peso/peso) de colágeno en la suspensión de fibras de colágeno preparada en la etapa (b) desempeñan una función en establecer la densidad en estado seco de la esponja de colágeno químicamente reticulada resorbible elástica. De hecho, la última depende principalmente, por una parte, del % (peso/peso) de colágeno de la suspensión resultante de fibras de colágeno obtenida en la etapa (c) mezclando 1,5 a 4,5 partes de la suspensión de fibras de colágeno obtenida en (a) con 0,5 a 1,5 partes de la suspensión de fibras de colágeno obtenida en (b) y, por otra parte, de las condiciones de la reacción de reticulación en la etapa (d).

Para lograr para la esponja de colágeno químicamente reticulada resorbible elástica la densidad requerida en estado seco de 50 a 65 mg/cm³, la suspensión de fibras de colágeno preparada en la etapa (a) contiene generalmente del 2,0 al 4,5, preferentemente 2,5 al 3,75 % (peso/peso) de colágeno y la suspensión de fibras de colágeno preparada en la etapa (b) contiene generalmente del 3,0 al 7,0, preferentemente 4,0 al 6,0 % (peso/peso) de colágeno.

La etapa (c) comprende mezclar 3,5 a 4,5 partes en peso de la suspensión de fibras de colágeno obtenida en (a) con 0,5 a 1,5 partes en peso de la suspensión de fibras de colágeno obtenida en (b), tal como para obtener una suspensión resultante.

Esta etapa de mezcla de proporciones apropiadas de dos suspensiones diferentes de fibras de colágeno procedentes de diferentes tejidos porcinos o bovinos y que han sido sometidas a diferentes tratamientos que incluyen diferentes procedimientos de picado (usando un molino de corte para la etapa (a) y un molino coloidal para la etapa (b)) dando partículas de fibra de colágeno de diferentes tamaños, es un método conveniente para obtener la distribución de porosidad deseada o el espectro de la esponja de colágeno químicamente reticulada resorbible elástica, concretamente poros interconectados con una mediana del diámetro de poro entre 50 y 90 µm y al menos el 80 %, preferentemente al menos el 90 %, de porosidad con un diámetro de poro superior a 10 µm como se ha determinado por porosimetría de intrusión de mercurio.

La suspensión resultante generalmente contiene 3,0 al 6,5 % (peso/peso), preferentemente 3,5 al 6,0 % (peso/peso) de colágeno.

La etapa (d) comprende liofilizar la suspensión resultante obtenida en (c), reticular el producto liofilizado en una solución que contiene un agente de reticulación, lavar con agua y liofilizar.

La liofilización antes y después de la etapa de reticulación se realiza generalmente a una temperatura inferior a -10 °C.

El agente de reticulación se selecciona adecuadamente del grupo que consiste en glutaraldehído, EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida) y una mezcla de EDC y NHS (N-hidroxisuccinimida). También pueden usarse otros agentes de reticulación conocidos para la reticulación de colágeno tales como formaldehído, acetaldehído, 1,4-butano diglicidil éter (BDDGE), N-sulfosuccinimidil-6-(4'-azido-2'-nitrofenilamino)hexanoato, diisocianato de hexametileno (HMDC), cinamida, difenilfosforilazida o genipina.

Cuando el agente de reticulación es glutaraldehído, la esponja obtenida después de la liofilización se reticula adecuadamente químicamente en una solución de tampón fosfato de pH 7,0 a 7,5 que contiene 0,01 al 0,10 %, preferentemente 0,04 al 0,06 % de glutaraldehído. La esponja químicamente reticulada puede lavarse sucesivamente con agua, solución 1-3 M de NaCl, solución 0,05-0,15 M de Na_2HPO_4 y agua, antes de liofilizarse.

Cuando el agente de reticulación es EDC, la esponja obtenida después de la liofilización se somete primero adecuadamente a un tratamiento deshidrotérmico a una temperatura superior a 110 °C, luego se reticula químicamente en una solución de tampón que contiene MES 0,05-0,15 M (ácido 2-(N-morfolino)-etanosulfónico) o ácido acético 0,05-0,15 M y 2-20 % (peso/peso) de un alcohol seleccionado del grupo que consiste en metanol, etanol, n-propanol, isopropanol y butanol, con 0,03-0,80, preferentemente 0,2-0,4 g de EDC por g de colágeno, durante un periodo de 1 a 8 horas. La relación (peso/peso) de colágeno con respecto al medio de reacción (la solución de tampón anterior) es generalmente de 1/10 a 1/100, preferentemente de 1/20 a 1/50. Cuando el alcohol es etanol, está adecuadamente presente al 3-7 % (peso/peso) en la solución de tampón. La esponja de colágeno químicamente reticulada puede lavarse primero con solución 0,05-0,15 M de Na_2HPO_4 , una solución 0,5-3 M de NaCl, luego con agua antes de ser liofilizada.

Cuando el agente de reticulación es una mezcla de EDC y NHS, la esponja obtenida después de la liofilización se reticula adecuadamente químicamente en una solución de tampón que contiene MES 0,1-0,3 M (ácido 2-(N-morfolino)-etanosulfónico) o ácido acético 0,1-0,3 M y 10-70 % (peso/peso) de alcohol seleccionado del grupo que consiste en metanol, etanol, n-propanol, isopropanol y butanol, con 0,01-0,60, preferentemente 0,05-0,2 g de EDC y 0,01-0,6, preferentemente 0,05-0,2 g de NHS, por g de colágeno, durante un periodo de 1 a 8 horas. La relación molar de EDC con respecto a NHS es generalmente de 4 a 0,5, preferentemente de 2 a 1. La relación (peso/peso) de colágeno con respecto al medio de reacción (la solución de tampón anterior) es generalmente de 1/10 a 1/100, preferentemente de 1/20 a 1/50. Cuando el alcohol es etanol, está adecuadamente presente al 40-60 % (peso/peso) en la solución de tampón. La esponja de colágeno químicamente reticulada puede lavarse primero con solución 0,05-0,15 M de Na_2HPO_4 , luego con agua antes de ser liofilizada.

Para cada mezcla de suspensiones de fibras de colágeno obtenidas en (c) el experto estará en una posición basada en la enseñanza de la presente solicitud, usando solo conocimiento general común de la materia y experimentación rutinaria, para encontrar el agente de reticulación y condiciones de reticulación tales como para obtener una esponja de colágeno químicamente reticulada resorbible elástica según la invención que tenga la temperatura de aparición especificada y densidad en estado seco.

Así, lo siguiente ha sido, por ejemplo, encontrado por experimentación rutinaria para las suspensiones de colágeno que contienen 3,0 al 6,5 % (peso/peso) de colágeno:

- Cuando el agente de reticulación es EDC:
 - la temperatura de aparición aumenta, para un aumento de la concentración de EDC en la solución de tampón, la relación de EDC con respecto a colágeno, la relación (peso/peso) del medio de reacción con respecto al colágeno o el % de alcohol en la solución de tampón.
 - la densidad en estado seco disminuye (más encogimiento de colágeno) para un aumento del % de alcohol en la solución de tampón.
- Cuando el agente de reticulación es una mezcla EDC y NHS:
 - la temperatura de aparición aumenta, para un aumento en la concentración de agente de reticulación en la solución de tampón, la relación (peso/peso) de agente de reticulación (EDC + NHS) con respecto a colágeno, la relación de EDC con respecto a NHS, la relación (peso/peso) de medio de reacción con respecto a colágeno o el % de alcohol en la solución de tampón.
 - la densidad en estado seco disminuye (más encogimiento de colágeno) para un aumento del % de alcohol en la solución de tampón.

La esponja de colágeno químicamente reticulada resorbible elástica liofilizada obtenida al final de la etapa (d) generalmente se someterá a la etapa (e) de esterilización por irradiación y o irradiación de rayos X. Esa etapa puede no ser necesaria si la mezcla de suspensiones de colágeno obtenidas en la etapa (c) ya es aséptica y la etapa (d) se

realiza bajo condiciones asépticas.

La prueba de compresión cíclica *in vitro* y la prueba de degradación enzimática usando colagenasa de *Clostridium histolyticum*, que se describen en detalle más adelante, son muy útiles en predecir el comportamiento *in vivo* de la esponja químicamente reticulada después de la implantación en la cavidad bucal, en particular su capacidad de mantener el volumen y la curación sin acontecimientos adversos tales como excesiva inflamación o dehiscencia.

La invención también se refiere al proceso anterior para preparar la esponja de colágeno químicamente reticulada resorbible elástica.

La invención también se refiere a la esponja de colágeno químicamente reticulada resorbible elástica anterior para su uso como un implante para la cavidad bucal, el uso de esa esponja de colágeno químicamente reticulada resorbible elástica para preparar un implante para la cavidad bucal y un método de aumento de volumen de tejido blando en la región oral, en particular fomentando el crecimiento hacia adentro de células gingivales mientras que se mantiene el volumen bajo estreses mecánicos, que comprende implantar en la cavidad bucal la esponja de colágeno químicamente reticulada resorbible elástica anterior.

Los siguientes métodos experimentales, pruebas y ejemplos ilustran la invención sin limitar su alcance.

Prueba para la determinación de la densidad de la esponja de colágeno químicamente reticulada resorbible elástica en estado seco

Se introdujeron muestras de esponja de colágeno químicamente reticulada resorbible elástica en tubos de plástico tarados que se secan en un liofilizador durante al menos 2 horas a una temperatura de 20 °C y una presión por debajo de 0,5 mbar. Se pesaron los tubos con muestras secadas y se calcularon los pesos netos de las muestras en estado seco. Se midieron la longitud, anchura y altura de las muestras de esponja de colágeno químicamente reticulada resorbible elástica usando un pie de rey eléctrico, aplicando presión de contacto suficiente de forma que las muestras se fijaran sin apretar (es decir, fijadas para resistir la fuerza producida por su peso, pero aptas para moverse cuando la fuerza se aumenta aproximadamente 10 veces). Se calcularon los volúmenes de las muestras en estado seco.

Entonces se calculó la densidad de la esponja de colágeno químicamente reticulada resorbible elástica en estado seco (peso con respecto al volumen) para cada muestra.

Prueba de compresión cíclica

Se midieron el % de espesor inicial y la histéresis con respecto a la primera carga después de 49 ciclos de compresión a una presión de 12,1 kPa usando una máquina de compresión mecánica, concretamente la máquina de compresión de material Z2.5 fabricada por Zwick Roell, usando el programa Test Expert II.

Las mediciones se realizaron sumergidas en PBS a 37 °C sobre muestras de esponja de colágeno químicamente reticulada resorbible elástica estéril que se habían incubado durante 2 horas a 37 °C en una solución de PBS de pH 7,4 (preparada disolviendo 80,0 g de NaCl, 2,0 g de KCl, 17,7 g de Na₂HPO₄ y 2,4 g de KH₂PO₄ en 1000 ml de agua, diluyendo diez veces la solución en agua y ajustando el pH con HCl a 7,4).

Las muestras se sometieron a un total de 49 ciclos de carga entre 0,5 y 12,1 kPa a una tasa de deformación del 33 % de la altura inicial por min, empezando el análisis a una pre-presión de 0,25 kPa.

Se usó la altura inicial a 0,5 kPa de presión para calcular la retención de altura inicial después de 49 ciclos de carga y descarga. La "histéresis respecto a la primera carga" es el porcentaje de trabajo que se disipó durante la descarga usando el trabajo ($W_{1, \text{carga}}$ en Nm) entre 0,5 y 12,1 kPa de la primera carga y el trabajo del 49º ciclo de descarga ($W_{49, \text{descarga}}$ en Nm) según la ecuación XY:

$$Ec \text{ XY : "Histéresis con respecto a la primera carga" [\%]} = \frac{100 * (W_{1, \text{carga}} - W_{49, \text{descarga}})}{W_{1, \text{carga}}}$$

El programa Test Expert o Excel calcula el % de retención de espesor inicial y el % de retención de histéresis inicial después de 49 ciclos de compresión a una presión de 12,1 kPa.

La Figura 1 muestra el resultado típico de una prueba de compresión cíclica.

Para muestras de la esponja de colágeno químicamente reticulada resorbible elástica según la invención que *in vivo* mostraron una interesante retención de volumen y curación sin excesiva inflamación o dehiscencia:

- la altura o retención de espesor con respecto a la altura inicial fue al menos el 70 %, preferentemente al menos el 80 %, más preferentemente al menos el 85 %, después de 49 ciclos de compresión a 12,1 kPa, y
- la retención de histéresis con respecto a la primera carga después de 49 ciclos de compresión a 12,1 kPa fue inferior al 55 %, preferentemente inferior al 45 %.

5

Prueba de degradación enzimática usando collagenasa de *Clostridium histolyticum*

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

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

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

En esta prueba, los productos de colágeno (muestras de esponja de colágeno químicamente reticulada resorbible elástica según la invención se incubaron a 37 °C con 50 unidades/ml de *Clostridium histolyticum* (definiéndose una unidad como péptidos que se liberan de colágeno del tendón de Aquiles bovino equivalentes en color de ninhidrina a 1,0 micromol de leucina en 5 horas a pH 7,4 a 37 °C en presencia de iones calcio) en un tampón Tris que contiene calcio y la degradación de matriz de colágeno se midió visualmente y con el "ensayo DC Protein" de Bio-Rad Laboratories (Hercules, EE.UU., N.º de pedido 500-0116) usando colágeno de tipo I como material de referencia. La concentración de colágeno se determinó usando un espectrómetro de placas de micropocillos (Infinite M200, disponible de Tecan).

Para muestras de la esponja de colágeno químicamente reticulada resorbible elástica según la invención que *in vivo* mostraron curación sin excesiva inflamación o dehiscencia, el colágeno se degradó completamente (sin fibra de colágeno detectable por inspección visual) en el plazo de 3 a 5 horas.

Ejemplo 1 Preparación de una suspensión de fibras de colágeno derivada de peritoneo porcino

Las membranas peritoneales de cerdos jóvenes se liberaron completamente de carne y grasa por medios mecánicos, se lavaron bajo agua corriente y se trataron con solución al 2 % de NaOH durante 12 horas. Las membranas se lavaron entonces bajo agua corriente y se acidificaron con 0,5 % de HCl. Después de haberse acidificado el material a través de su espesor entero (aproximadamente 15 min), el material se lavó hasta que se obtuvo un pH de 3,5. El material se encogió entonces con 7 % de solución salina, se neutralizó con solución al 1 % de NaHCO₃ y se lavó bajo agua corriente. Entonces, el material se deshidrató con acetona y se desengrasó con n-hexano.

El material se secó usando etanol-éter y se molió con un molino de corte (por ejemplo, Pulverisette 25 de Fritsch: véase www.fritsch.de/produkte/mahlen/schneidmuehlen/pulverisette-25 o SM300 de Retsch: www.retsch.de/de/produkte/zerkleinern/schneidmuehlen.html) que incluye un tamiz trapezoidal de 0,5 a 1,0 mm.

Se prepararon una suspensión al 4 % (peso/peso) de fibras de colágeno y una suspensión al 6 % (peso/peso) de fibras de colágeno suspendiendo cantidades adecuadas del polvo secado en agua y ajustando el pH a 2,6 con ácido clorhídrico 10 mM.

Ejemplo 2 Preparación de una suspensión de fibras de colágeno derivada de una membrana Geistlich Bio-Gide® estéril

Se secó una membrana Geistlich Bio-Gide® (disponible de Geistlich Pharma AG, CH-6110, Suiza) y se molió con un molino de corte que incluía un tamiz trapezoidal de 0,5 a 1,0 mm. Se prepararon una suspensión al 4 % (peso/peso) de colágeno de fibras de colágeno y una suspensión al 6 % (peso/peso) de colágeno de fibras de colágeno suspendiendo cantidades adecuadas del polvo secado en agua y ajustando el pH a 2,6 con ácido clorhídrico 10 mM.

Ejemplo 3 Preparación de una suspensión de fibras de colágeno derivada de dermis de cerdo.

Se picaron pellejos porcinos en una picadora de carne a trozos de 1 a 20 mm. El agua se eliminó usando un disolvente soluble en agua tal como un alcohol o una cetona. Las fibras de colágeno se desengrasaron usando un

hidrocarburo clorado tal como dicloroetano o cloruro de metileno o un hidrocarburo no clorado tal como hexano o tolueno. Después de eliminar el disolvente, el colágeno se trató con una base inorgánica fuerte a un pH superior a 12 durante un periodo de 6 a 24 horas y se trató con un ácido inorgánico fuerte a un pH de 0 a 1 durante un periodo de 1 a 12 horas. El exceso de ácido se eliminó aclarando con agua y la suspensión se homogeneizó por molienda con coloides dando una suspensión homogénea del 0,5 al 2 % de fibras de colágeno en presencia de un regulador del hinchamiento tal como una sal inorgánica. La suspensión se secó por liofilización y las fibras de colágeno secas se limpiaron sucesivamente con diferentes disolventes orgánicos tales como alcoholes, éteres, cetonas e hidrocarburos clorados, siendo entonces los disolventes evaporados a vacío dando un residuo de disolvente inferior al 1 % (peso/peso).

Se prepararon una suspensión al 2,5 % (peso/peso) de colágeno de fibras de colágeno y una suspensión al 3,75 % (peso/peso) de colágeno de fibras de colágeno picando finamente por molienda con coloides cantidades adecuadas de las fibras limpias y secas obtenidas anteriormente con agua a un pH de 3,4.

Ejemplo 4 Preparación de una esponja de colágeno resorbible elástica químicamente reticulada con EDC.

Se mezclaron 4 partes de la suspensión al 4 % (peso/peso) de colágeno de fibras de colágeno obtenida en el Ejemplo 1 o Ejemplo 2 con 1 parte de la suspensión al 2,5 % (peso/peso) de colágeno de fibras de colágeno obtenida en el Ejemplo 3 y se vertió en moldes de 8 X 25 X 25 mm. La suspensión al 3,7 % de fibras de colágeno resultante se secó por liofilización a -45 °C.

Las esponjas de colágeno secadas se trataron entonces deshidrotérmicamente a 120 °C durante 24 horas a presión reducida (inferior a 200 mbar).

Las esponjas de colágeno se reticularon entonces químicamente en una solución de tampón que contenía MES 0,1 M (ácido 2-(N-morfolino)-etanosulfónico) y 5 % de etanol a un pH de 5,5 con 0,3 g de EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida) por g de colágeno, bajo agitación a temperatura ambiente durante un periodo de 120 min.

Las esponjas de colágeno químicamente reticuladas se lavaron primero con solución 0,10 M de Na₂HPO₄, solución 1 M de NaCl, solución 2 M de NaCl, luego con agua y se liofilizaron a -45 °C.

Las esponjas de colágeno químicamente reticuladas secadas se esterilizaron por gamma a 30 kGy. La temperatura de aparición y la densidad en estado seco medidas de las esponjas de colágeno químicamente reticuladas esterilizadas fueron 47 °C y 64 mg/cm³, respectivamente.

Después de 49 ciclos de compresión a una presión de 12,1 kPa en PBS a 37 °C, las esponjas de colágeno químicamente reticuladas esterilizadas mostraron una retención del 87 % de su espesor inicial y 41 % de la histéresis inicial.

La porosimetría de intrusión de mercurio mostró para las esponjas de colágeno químicamente reticuladas esterilizadas una mediana del diámetro de poro de 88 µm y 95 % de porosidad con un diámetro de poro superior a 10 µm.

La prueba de degradación enzimática usando colagenasa de *Clostridium histolyticum* mostró una degradación completa de colágeno en el plazo de 3,25 horas.

Ejemplo 5 Preparación de una esponja de colágeno resorbible elástica químicamente reticulada con una mezcla de EDC y NHS.

Se mezclaron cuatro partes de la suspensión al 6 % (peso/peso) de fibras de colágeno obtenida en el Ejemplo 1 o Ejemplo 2 con una parte de la suspensión al 3,75 % (peso/peso) de fibras de colágeno obtenida en el Ejemplo 3 y se vertió en moldes de una altura de 6 mm. La suspensión al 5,55 % (peso/peso) de colágeno de fibras de colágeno resultante se secó por liofilización a -10 °C. Estas esponjas se reticularon químicamente en una solución que contenía MES 0,2 M (ácido 2-(N-morfolino)-etanosulfónico) y 50 % peso/peso de etanol a un pH de 5,5 con 0,1 g de EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida) por gramo de colágeno y 0,1 g de NHS (N-hidroxisuccinimida) por gramo de colágeno, bajo agitación a temperatura ambiente durante un periodo de 120 min. Las esponjas químicamente reticuladas se lavaron primero con solución 0,1 M de Na₂HPO₄, solución 1 M de NaCl, solución 2 M de NaCl, luego con agua y se liofilizaron a -10°C.

Las esponjas de colágeno químicamente reticuladas secadas se esterilizaron por irradiación y a 26 kGy.

La temperatura de aparición y la densidad en estado seco medidas de las esponjas de colágeno químicamente reticuladas esterilizadas fueron 52 °C y 59 mg/cm³, respectivamente.

Después de 49 ciclos de compresión a una presión de 12,1 kPa en PBS a 37 °C, las esponjas de colágeno químicamente reticuladas esterilizadas mostraron una retención del 90 % de su espesor inicial y 38 % de la histéresis con respecto a la primera carga.

5 La porosimetría de intrusión de mercurio mostró para las esponjas de colágeno químicamente reticuladas esterilizadas una mediana del diámetro de poro de 69,1 µm y 93,1 % de porosidad con un diámetro de poro superior a 10 µm.

10 La prueba de degradación enzimática usando colagenasa de *Clostridium histolyticum* mostró una degradación de colágeno completa en el plazo de 3,5 horas.

Ejemplo 6 Preparación de una esponja de colágeno resorbible elástica químicamente reticulada con una mezcla de EDC y NHS (sin una etapa de esterilización)

15 Se mezclaron cuatro partes de la suspensión al 6 % (peso/peso) de fibras de colágeno obtenida en el Ejemplo 2 con una parte de la suspensión al 3,75 % (peso/peso) de fibras de colágeno obtenida en el Ejemplo 3 y se vertió en moldes de una altura de 6 mm. La suspensión al 5,55 % (peso/peso) de colágeno resultante de fibras de colágeno se secó por liofilización a -10°C.

20 Estas esponjas se reticularon químicamente en una solución que contenía MES 0,2 M (ácido 2-(N-morfolino)-etanosulfónico) y 50 % en peso/peso de etanol a un pH de 5,5 con 0,01 g de EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida) por gramo de colágeno y 0,01 g de NHS (N-hidroxisuccinimida) por gramo de colágeno, bajo agitación a temperatura ambiente durante un periodo de 120 min. Las esponjas químicamente reticuladas se lavaron primero con solución 0,1 M de Na₂HPO₄, solución 1 M de NaCl, solución 2 M de NaCl, luego con agua y se liofilizaron a -10 °C.

La temperatura de aparición y la densidad en estado seco medidas de las esponjas de colágeno químicamente reticuladas fueron 57 °C y 57 mg/cm³, respectivamente.

30 Después de 49 ciclos de compresión a una presión de 12,1 kPa en PBS a 37 °C, las esponjas de colágeno químicamente reticuladas mostraron una retención del 80 % de su espesor inicial.

La porosimetría de intrusión de mercurio mostró para las esponjas de colágeno químicamente reticuladas una mediana del diámetro de poro de 71,0 µm y 94,0 % de porosidad con un diámetro de poro superior a 10 µm.

35 Ejemplo 7 Preparación de una esponja de colágeno resorbible elástica químicamente reticulada con glutaraldehído.

40 Se mezclaron cuatro partes de la suspensión de fibras de colágeno obtenida en el Ejemplo 1 con una parte de la suspensión de fibras de colágeno obtenida en el Ejemplo 3 y se vertió en moldes de una altura de 6 mm. La suspensión de colágeno se secó por liofilización a menos 45 °C. Estas esponjas se reticularon químicamente en un tampón fosfato de sodio (pH 7,0 - 7,5) que contenía 0,05 % (peso/peso) de glutaraldehído a 10 °C durante 60 min. Las esponjas de colágeno químicamente reticuladas se lavaron sucesivamente con agua, solución 2 M de NaCl y solución 0,1 M de Na₂HPO₄. Después del aclarado final con agua, las esponjas se liofilizaron a -45 °C.

45 Las esponjas de colágeno químicamente reticuladas se esterilizaron por irradiación y a 25 kGy.

La temperatura de aparición y la densidad en estado seco medidas de las esponjas de colágeno químicamente reticuladas esterilizadas fueron respectivamente 51 °C y 52 mg/cm³.

50 Después de 49 ciclos de compresión a una presión de 12,1 kPa a 37 °C, las esponjas de colágeno químicamente reticuladas esterilizadas en PBS mostraron una retención del 74 % de su espesor inicial y 48 % de histéresis con respecto a la primera carga.

55 La porosimetría de intrusión de mercurio mostró para las esponjas de colágeno químicamente reticuladas esterilizadas una mediana del diámetro de poro de 63,7 µm y 92,7 % de porosidad con un diámetro de poro superior a 10 µm.

La prueba de degradación enzimática usando colagenasa de *Clostridium histolyticum* mostró una degradación de colágeno completa en el plazo de 4,5 horas.

60

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una esponja de colágeno químicamente reticulada resorbible elástica para promover el aumento de volumen de tejido blando en la región oral, que comprende 60-96 % (peso/peso) de colágeno y 4-40 % (peso/peso) de elastina, que muestra por porosimetría de intrusión de mercurio poros interconectados con una mediana del diámetro de poro entre 50 y 90 μm y al menos el 80 % de porosidad con un diámetro de poro superior a 10 μm , una temperatura de aparición de 45 a 57 $^{\circ}\text{C}$ y una densidad en estado seco de 50 a 65 mg/cm^3 .
- 10 2. Una esponja de colágeno químicamente reticulada resorbible elástica según la reivindicación 1, que muestra una temperatura de aparición de 46 a 53 $^{\circ}\text{C}$.
3. Una esponja de colágeno químicamente reticulada resorbible elástica según la reivindicación 1 o 2, que muestra una densidad en estado seco de 50 a 60 mg/cm^3 .
- 15 4. Una esponja químicamente reticulada resorbible elástica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende 70-90 % (peso/peso) de colágeno y 10-30 % (peso/peso) de elastina.
- 20 5. Una esponja químicamente reticulada resorbible elástica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que muestra al menos 90 % de porosidad con un diámetro de poro superior a 10 μm .
- 25 6. Una esponja químicamente reticulada resorbible elástica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que se obtuvo usando un agente de reticulación seleccionado del grupo que consiste en glutaraldehído, EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida) y una mezcla de EDC y NHS (N-hidroxisuccinimida).
- 30 7. Una esponja químicamente reticulada de colágeno resorbible elástica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que se derivó de tejidos de origen natural por un proceso que comprende liofilización y reticulación química, opcionalmente seguido de esterilización por γ y o esterilización por rayos X.
8. Una esponja de colágeno químicamente reticulada resorbible elástica de la reivindicación 6 o 7, en la que los tejidos de origen natural incluyen membranas de peritoneo o pericardio porcino o bovino, membrana de placenta porcina o bovina, o SIS o dermis porcina o bovina.
- 35 9. Una esponja de colágeno químicamente reticulada resorbible elástica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que humedecida por una solución de PBS retiene al menos el 70 % de espesor inicial después de 49 ciclos de compresión a una presión de 12,1 kPa.
- 40 10. Una esponja de colágeno químicamente reticulada resorbible elástica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que humedecida por una solución de PBS retiene menos del 55 % de histéresis con respecto a la primera carga después de 49 ciclos de compresión a una presión de 12,1 kPa.
11. Una esponja de colágeno químicamente reticulada resorbible elástica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que muestra después de la implantación en la región oral, la misma retención de volumen que SCTG (injerto de tejido conjuntivo subepitelial).
- 45 12. Un proceso de preparación de una esponja de colágeno químicamente reticulada resorbible elástica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, que comprende las siguientes etapas:
 - 50 (a) Someter una membrana de peritoneo o pericardio porcino o bovino a un tratamiento básico en una solución de hidróxido sódico a un pH superior a 12, un tratamiento ácido en una solución de clorhídrico de pH de 1 a 3, un tratamiento deshidratante con un disolvente orgánico soluble en agua y un tratamiento desengrasante con un disolvente orgánico, moler la membrana seca obtenida con un molino de corte, tamizar a través de un tamiz de 0,5-2 mm y suspender el polvo obtenido en una solución acuosa acidificada de pH de 2,5 a 3,5, tal como para obtener una suspensión de fibras de colágeno,
 - 55 (b) Someter dermis bovina o porcina picada a un tratamiento deshidratante con un disolvente orgánico soluble en agua, un tratamiento desengrasante con un disolvente orgánico, un tratamiento básico en una base inorgánica fuerte a un pH superior a 12, un tratamiento ácido en un ácido inorgánico fuerte a un pH de 0 a 1, aclarar con agua y suspender las fibras de colágeno, liofilizar, limpiar las fibras de colágeno secadas con un disolvente orgánico y picar las fibras secadas limpias en una solución acidificada de pH de 3 a 4, tal como para obtener una suspensión de fibras de colágeno,
 - 60 (c) Mezclar 3,5 a 4,5 partes de la suspensión de fibras de colágeno obtenida en (a) con 0,5 a 1,5 partes de la suspensión de fibras de colágeno obtenida en (b), tal como para obtener una suspensión resultante,
 - (d) Liofilizar la suspensión resultante obtenida en (c) y reticular el producto liofilizado en una solución que contiene un agente de reticulación, lavar con agua y liofilizar, y
 - 65 (e) Opcionalmente esterilizar el producto liofilizado obtenido en (e) por irradiación γ y o irradiación de rayos X.

13. Un proceso según la reivindicación 12, en el que el agente de reticulación está seleccionado del grupo que consiste en glutaraldehído, EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida) y una mezcla de EDC y NHS (N-hidroxisuccinimida).
- 5 14. Un proceso según la reivindicación 12 o 13, en el que la suspensión de fibras de colágeno preparada en la etapa (a) contiene 2,5 al 3,75 % (peso/peso) de colágeno y la suspensión de fibras de colágeno preparada en la etapa (b) contiene del 4,0 al 6,0 % (peso/peso) de colágeno.
- 10 15. Una esponja de colágeno químicamente reticulada resorbible elástica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 para su uso como un implante en la cavidad bucal.

Fig. 1

