



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 328 282**

51 Int. Cl.:
A61L 27/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06818566 .9**

96 Fecha de presentación : **16.11.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1948257**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **30.07.2008**

54 Título: **Cuerpos de moldeo basados en un material reticulado que contiene gelatina, procedimiento para su fabricación y su uso.**

30 Prioridad: **17.11.2005 DE 10 2005 054 938**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
11.11.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
11.11.2009

73 Titular/es: **GELITA AG.**
Uferstrasse 7
69412 Eberbach, DE

72 Inventor/es: **Ahlers, Michael y**
Rupp, Melanie

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

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

Cuerpos de moldeo basados en un material reticulado que contiene gelatina, procedimiento para su fabricación y su uso.

La presente invención se refiere a cuerpos de moldeo basados en un material reticulado que contiene gelatina. Además, la invención se refiere a un procedimiento para la fabricación de dichos cuerpos de moldeo.

La invención se refiere además al uso de estos cuerpos de moldeo en el campo de la medicina, particularmente para la fabricación de implantes.

En distintos campos de la medicina, se emplean cuerpos de moldeo de materiales reabsorbibles, por un lado para el recubrimiento de heridas o de hemorragias internas o externas, así como para la fabricación de implantes que satisfacen una función portadora, protectora o conductora. Son de especial importancia además los denominados implantes de tejidos, en los que se trata de construcciones de un material portador reabsorbible y células vivas (ingeniería de tejidos). Estos sirven para el tratamiento de tejidos y órganos dañados, particularmente para la regeneración de piel o cartílago.

Dichos materiales deben satisfacer una serie de propiedades para poder utilizarse exitosamente en el campo de la medicina. Por un lado, deben presentar una resistencia suficiente para posibilitar un manejo exento de daños y para proteger a las células en crecimiento del cuerpo ante tensiones mecánicas. Al mismo tiempo, sin embargo, el material debe ser suficientemente flexible para adaptarse a la forma de la parte del cuerpo a tratar.

Se ha encontrado que, para satisfacer los prerequisites citados, es bien adecuado como material básico la gelatina. La gelatina puede reabsorberse completamente por el cuerpo y presenta por tanto una ventaja frente a otros materiales como, por ejemplo, quitosano, alginato, agarosa y ácido hialurónico. En contraposición con el material relacionado colágeno, la gelatina es de mayor pureza y obtenible con una composición reproducible, y está exento de telopéptidos inmunogénicos que pueden desencadenar la reacción de defensa del cuerpo.

Para conseguir una estabilidad suficientemente larga del cuerpo de moldeo en condiciones fisiológicas, generalmente la gelatina debe reticularse química o enzimáticamente. La reabsorbibilidad exenta de residuos no se afecta así, pero el tiempo de reabsorción respectivo puede ajustarse individualmente mediante el grado de reticulación.

Se describe un procedimiento para la fabricación de dichos cuerpos de moldeo basados en gelatina reticulada en la solicitud de patente alemana de número de referencia DE 10 2004 024 635.

Para determinadas aplicaciones, es sin embargo deseable una muy alta resistencia del cuerpo de moldeo, que no puede conseguirse sólo mediante una elevación del grado de reticulación.

Se ha descrito que la resistencia a la rotura de láminas de gelatina puede elevarse mediante estiramiento de las láminas (Bigi *et al.* (1998) *Biomaterials* 19, 2335-2340). No obstante, las láminas descritas en esta publicación, que se reticularon con glutaraldehído después del estiramiento, presentaban un alargamiento de rotura inferior al 11%. Dichas láminas no están dotadas de la flexibilidad deseable para una aplicación médica.

El objetivo de la presente invención consiste en poner a disposición cuerpos de moldeo basados en gelatina que presenten tanto una alta resistencia mecánica como una flexibilidad suficiente.

Este objetivo se consigue según la invención mediante un cuerpo de moldeo basado en un material reticulado que contiene gelatina, en el que el cuerpo de moldeo está estirado de modo que las moléculas de gelatina están orientadas al menos parcialmente en una dirección preferente y en el que el material comprende un plastificante.

Sorprendentemente, los cuerpos de moldeo basados en gelatina que comprenden por un lado un plastificante y por otro lado están reticulados, pueden estirarse especialmente bien. Mediante el estiramiento, pueden mejorarse notablemente las propiedades mecánicas de los cuerpos de moldeo, particularmente su resistencia a la rotura y alargamiento de rotura.

Preferiblemente, el material que contiene gelatina con el que se fabrican los cuerpos de moldeo está mayoritariamente formado por gelatina. Se incluyen particularmente proporciones de gelatina de 60% en peso o más, preferiblemente de 75% en peso o más. Además de gelatina, el material puede contener, por ejemplo, otros biopolímeros como algo de alginatos o ácido hialurónico, para adaptar el perfil de propiedades de los cuerpos de moldeo más específicamente a una aplicación determinada.

Para garantizar una biodisponibilidad óptima de los cuerpos de moldeo según la invención en la aplicación médica, se utiliza como material de partida preferiblemente una gelatina con un contenido especialmente bajo de endotoxinas. En las endotoxinas, se trata de productos metabólicos o fragmentos de microorganismos que aparecen en el material bruto animal. El contenido de endotoxinas de la gelatina se da en unidades internacionales por gramo (UI/g) y se determina según el ensayo LAL, cuya práctica se describe en la 4ª edición de la Farmacopea Europea (Ph. Eur. 4).

Para mantener lo más bajo posible el contenido de endotoxinas, es ventajoso eliminar los microorganismos lo antes posible en el transcurso de la fabricación de gelatina. Además, deben observarse los patrones de higiene correspondientes en el proceso de fabricación.

Por tanto, el contenido de endotoxinas de la gelatina puede reducirse drásticamente mediante determinadas medidas en el proceso de fabricación. Se cuentan entre estas medidas en primer lugar el uso de materiales brutos recientes (por ejemplo, pieles de cerdo) que evita tiempos de almacenamiento, la purificación concienzuda de todas las instalaciones de producción inmediatamente antes del inicio de la fabricación de gelatina, así como eventualmente el cambio de los intercambiadores iónicos y los sistemas de filtro en las instalaciones de producción.

La gelatina utilizada en el marco de la presente invención presenta preferiblemente un contenido de endotoxinas de 1.200 UI/g o menos, aún más preferiblemente de 200 UI/g o menos. De forma óptima, el contenido de endotoxinas se encuentra a 50 UI/g o menos, respectivamente determinado según el ensayo LAL. En comparación, varias gelatinas comerciales contienen contenidos de endotoxinas superiores a 20.000 UI/g.

Según la invención, el material comprende, además de gelatina, al menos un plastificante mediante el que se eleva la flexibilidad del cuerpo de moldeo y se mejora claramente su estirabilidad. Son adecuados como plastificantes, por ejemplo, glicerina, oligoglicerinas, oligoglicoles y sorbita, siendo el más preferido la glicerina.

La flexibilidad deseada del cuerpo de moldeo puede controlarse mediante la cantidad de plastificante. Preferiblemente, la proporción de plastificante en el material se encuentra de 12 a 40% en peso. Se prefieren ventajosamente además proporciones de 16 a 25% en peso.

El cuerpo de moldeo estirado está estirado preferiblemente de modo monoaxial. De este modo, se define una dirección preferente a lo largo de la cual están orientadas al menos parcialmente las moléculas de gelatina.

Los cuerpos de moldeo según la invención presentan una alta resistencia mecánica, particularmente resistencia a la rotura. Preferiblemente, los cuerpos de moldeo según la invención tienen una resistencia a la rotura de 40 N/mm² o más, más preferiblemente de 60 N/mm² o más, medida respectivamente en la dirección de estiramiento.

Además, los cuerpos de moldeo presentan sorprendentemente también un alto alargamiento de rotura (límite elástico convencional), particularmente en la dirección de estiramiento. Preferiblemente, el alargamiento de rotura del cuerpo de moldeo se encuentra a este respecto al 30% o más, más preferiblemente al 50% o más, medido respectivamente en la dirección de estiramiento.

Básicamente, pueden estar reticulados tanto la gelatina como otros componentes adecuados del material en el cuerpo de moldeo. Sin embargo, se prefiere que esté reticulada particularmente la gelatina.

En la reticulación, puede tratarse de una reticulación química. Para ello, es adecuado en principio cualquier agente reticulante que efectúe una conexión de las moléculas de gelatina individuales entre sí. Son agentes reticulantes preferidos aldehídos, dialdehídos, isocianatos, diisocianatos, carbodiimidas y dihalogenuros de alquilo. Se prefiere especialmente formaldehído, que efectúa al mismo tiempo una esterilización del cuerpo de moldeo.

En una forma de realización adicional del cuerpo de moldeo según la invención, el material está reticulado enzimáticamente. Se utiliza como agente reticulante preferiblemente además la enzima transglutaminasa, que efectúa una conexión de las cadenas de glutamina y lisina de proteínas, particularmente también de gelatina.

Los cuerpos de moldeo según la invención pueden presentar en cierta medida vidas útiles asombrosamente largas en condiciones fisiológicas, pudiendo ajustarse éstas muy selectivamente mediante el grado de reticulación. Así, pueden permanecer estables cuerpos de moldeo según la invención en condiciones fisiológicas estándar, por ejemplo, más de una semana, más de dos semanas o más de cuatro semanas.

Por el concepto de estabilidad ha de entenderse aquí a ese respecto que el cuerpo de moldeo mantiene esencialmente su forma original tanto en el almacenamiento en estado seco como durante el periodo dado en condiciones fisiológicas estándar y sólo se degrada hidrolíticamente en gran medida en su estructura a continuación.

Las condiciones fisiológicas a las que se exponen los cuerpos de moldeo en una aplicación para la fabricación de implantes se caracterizan en primer lugar por temperatura, valor de pH y fuerza iónica. Pueden simularse *in vitro* las correspondientes condiciones mediante una incubación en tampón PBS (pH 7,2, 37°C) para ensayar distintos cuerpos de moldeo respecto a su comportamiento de estabilidad dependiente del tiempo y para comparar (en las condiciones fisiológicas estándar citadas a continuación).

La resistencia mecánica de los cuerpos de moldeo según la invención puede elevarse adicionalmente mediante la adición de un reforzante. Los reforzantes deben ser fisiológicamente compatibles y lo mejor igualmente reabsorbibles.

Según la elección del reforzante, puede influirse en cierta medida, además de en la influencia de las propiedades mecánicas, también en la estabilidad de los cuerpos de moldeo frente a mecanismos de reabsorción. Particularmente, puede elegirse la estabilidad a la reabsorción de los reforzantes independientemente de los componentes del material que contiene gelatina.

ES 2 328 282 T3

Los reforzantes muestran ya a proporciones de 5% en peso (referidas a la masa total de cuerpo de moldeo) una mejora notable de las propiedades mecánicas de los cuerpos de moldeo.

5 Por encima de 60% en peso, no puede alcanzarse ya generalmente una mejora significativa y/o las propiedades de reabsorción deseadas o también la flexibilidad necesaria del cuerpo de moldeo pueden exhibirse sólo difícilmente.

Los reforzantes pueden elegirse de reforzantes particulados y moleculares, así como mezclas de las mismas.

10 En los reforzantes particulados, se recomienda particularmente el uso de fibras reforzantes. Las fibras se seleccionan preferiblemente de fibras de polisacárido y proteína, particularmente fibras de colágeno, seda y algodón, así como fibras de polilactida y mezclas de las mismas.

15 Por otro lado, son igualmente adecuadas sustancias reforzantes moleculares para mejorar las propiedades mecánicas y, si se desea, también la estabilidad a la reabsorción del cuerpo de moldeo.

Son reforzantes moleculares preferidos particularmente polímeros de polilactida y sus derivados, derivados de celulosa y quitosano y sus derivados. Pueden utilizarse también reforzantes moleculares en forma de mezclas.

20 En una forma de realización preferida del cuerpo de moldeo según la invención, se presenta éste en forma de lámina. Dichas láminas basadas en un material que contiene gelatina reticulada pueden utilizarse variadamente para el recubrimiento y/o soporte de tejidos dañados, para la colonización de células, así como para la fabricación de materiales de combinación junto con cuerpos de moldeo con estructura celular, por ejemplo espumas.

25 El grosor de las láminas según la invención asciende preferiblemente a 20 a 500 μm , lo más preferiblemente de 50 a 250 μm .

30 Otra forma de realización adicional del cuerpo de moldeo según la invención se refiere a un cilindro hueco. Dichos cilindros huecos pueden utilizarse entre otros como guías nerviosas. A este respecto, se trata de implantes que permiten la regeneración de troncos nerviosos seccionados haciendo crecer respectivamente una célula nerviosa individual a lo largo de la cavidad de las guías nerviosas.

Los cilindros huecos según la invención pueden estirarse tanto en la dirección longitudinal como en la dirección periférica. Se entra en detalles más adelante sobre la fabricación respectiva de dichos cilindros huecos.

35 En el caso de cilindros huecos que están estirados en la dirección longitudinal, no sólo se mejoran mediante el estiramiento sus propiedades mecánicas, sino que al mismo tiempo se ponen a disposición cilindros huecos con un diámetro interno menor en comparación con cilindros huecos no estirados. Por tanto, el diámetro interno puede adaptarse a los requisitos respectivos, por ejemplo, a las dimensiones de las células nerviosas en un uso del cilindro hueco como guía nerviosa.

40 Según la aplicación, el cilindro hueco puede presentar un diámetro interno de 300 a 1.500 μm , preferiblemente de 900 a 1.200 μm . El grosor de pared medio del cilindro hueco se encuentra preferiblemente en el intervalo de 140 a 250 μm .

45 El objetivo de la presente invención consiste además en poner a disposición un procedimiento con el que puedan fabricarse cuerpos de moldeo basados en gelatina con propiedades mecánicas mejoradas.

Este objetivo se consigue según la invención mediante un procedimiento que comprende las siguientes etapas:

- 50 a) fabricación de una solución acuosa de un material que contiene gelatina;
- b) reticulación parcial del material que contiene gelatina disuelto;
- 55 c) fabricación de un cuerpo de moldeo a partir de la solución que contiene el material parcialmente reticulado; y
- d) estiramiento del cuerpo de moldeo.

60 Como ya se ha indicado con respecto a los cuerpos de moldeo según la invención, mediante el estiramiento puede elevarse claramente su resistencia mecánica. Según la invención, se realiza a este respecto el estiramiento después de haber reticulado al menos parcialmente el material que contiene gelatina. Esta secuencia conduce a mejores resultados que un estiramiento del cuerpo de moldeo antes de la reticulación según el estado de la técnica (Bigi *et al.* (1998) *Biomaterials* 19, 2335-2340; véase anteriormente).

65 El material que contiene gelatina usado en la etapa a) está preferiblemente formado por una proporción mayoritaria de gelatina. Se incluyen particularmente proporciones de gelatina de 60% en peso o más, preferiblemente de 75% en peso o más. Además, el material puede contener otros componentes como se describe anteriormente.

ES 2 328 282 T3

Como material de partida para el procedimiento, pueden utilizarse básicamente gelatinas de distintos orígenes y calidades, con respecto a una aplicación médica, se prefiere sin embargo el empleo de gelatina pobre en endotoxinas, como se describe anteriormente. La concentración de gelatina en la solución de la etapa a) puede ascender a este respecto a 5 a 45% en peso, preferiblemente a 10 a 30% en peso.

Preferiblemente, el material de la etapa a) comprende adicionalmente un plastificante. Mediante éste, se mejora esencialmente la estirabilidad del cuerpo de moldeo, como ya se había descrito con respecto a los cuerpos de moldeo según la invención.

Son plastificantes adecuados, por ejemplo, glicerina, oligoglicerinas, oligoglicoles y sorbita, siendo el más preferido la glicerina. Ventajosamente, la proporción de plastificante en el material asciende a 12 a 40% en peso. Son las más preferidas a este respecto proporciones de 16 a 25% en peso.

El cuerpo de moldeo formado en la etapa c) se seca preferiblemente al menos parcialmente antes del estiramiento (etapa d), preferiblemente hasta un contenido de humedad residual menor de 20% en peso, particularmente 15% en peso o menor.

Preferiblemente, se transfiere a un estado termoplástico el cuerpo de moldeo inmediatamente antes del estiramiento (etapa d)) mediante una elevación de la temperatura y/o del contenido de agua. Esto puede realizarse, por ejemplo, exponiendo el cuerpo de moldeo a vapor de agua caliente. Se lleva a cabo el estiramiento del cuerpo de moldeo ventajosamente con una relación de estiramiento de 1,4 a 1,8, prefiriéndose una relación de estiramiento de hasta 4.

En una forma de realización especial del procedimiento según la invención, se lleva a cabo la etapa d) hasta 4 semanas después de la etapa c). Mediante el almacenamiento del cuerpo de moldeo antes del estiramiento, almacenándose preferiblemente a temperatura ambiente, puede elevarse claramente en cierta medida la resistencia del cuerpo de moldeo fabricado según la invención. Preferiblemente, se lleva a cabo a este respecto al etapa d) de 3 a 7 días después de la etapa c).

Otra forma de realización del procedimiento según la invención comprende una etapa adicional e) en la que el material contenido en el cuerpo de moldeo estirado se reticula adicionalmente.

Tanto en la etapa b) como en la etapa opcional e), puede reticularse la gelatina y/u otro componente adecuado del material. Se prefiere reticular en ambos casos particularmente la gelatina.

La ventaja de una reticulación en dos etapas consiste básicamente en que puede alcanzarse un grado de reticulación mayor y por tanto tiempos de degradación largos adjuntos. Esto no puede materializarse en igual medida con un procedimiento de una etapa con elevación de la concentración del agente reticulante, ya que mediante una reticulación fuerte del material disuelto, este ya no puede trabajarse ni conformarse.

Por otro lado, tampoco es adecuada una reticulación del material exclusivamente después de la fabricación del cuerpo de moldeo, ya que éste se reticula a este respecto más fuertemente en las superficies límite accesibles al exterior que en las zonas internas del cuerpo de moldeo, lo que se refleja en un comportamiento de degradación heterogéneo.

El estiramiento según la invención del cuerpo de moldeo entre ambas etapas de reticulación es especialmente ventajoso, porque así las moléculas disponen en el material parcialmente reticulado de una libertad de movimientos suficiente y pueden orientarse así al menos parcialmente a lo largo de una dirección preferente.

La segunda reticulación (etapa e)) puede llevarse a cabo mediante la acción de una solución acuosa de un agente reticulante, pero se prefiere la acción de un agente reticulante en forma de gas.

En las etapas b) y eventualmente e), pueden utilizarse agentes reticulantes iguales o distintos, habiéndose descrito ya los agentes reticulantes químicos o enzimáticos preferidos con respecto a los cuerpos de moldeo según la invención. Se prefiere especialmente el formaldehído, particularmente para la eventual segunda etapa de reticulación en fase gaseosa, ya que el cuerpo de moldeo puede esterilizarse al mismo tiempo mediante el formaldehído. Así, puede realizarse la acción del formaldehído sobre el cuerpo de moldeo auxiliada por una atmósfera de vapor de agua.

Preferiblemente, se añade a la solución el agente reticulante en la etapa b) en una cantidad de 600 a 5.000 ppm, preferiblemente de 2.000 a 4.000 ppm, referida a la gelatina.

Mediante la variación de la concentración de agente reticulante en la solución, pero también mediante distintos grados de alta reticulación en la segunda etapa de reticulación, pueden ajustarse tanto la resistencia mecánica del cuerpo de moldeo fabricado como su vida útil en condiciones fisiológicas de modo sencillo. Así, pueden obtenerse sorprendentemente cuerpos de moldeo que, por una parte, permanecen estables en condiciones fisiológicas, por ejemplo, más de una semana, más de dos semanas o más de cuatro semanas, y por otra parte, satisfacen los requisitos referentes a compatibilidad celular y resorbabilidad.

En una forma de realización especial del procedimiento según la invención, el cuerpo de moldeo es una lámina. Las láminas pueden fabricarse particularmente mediante colada o extrusión de la solución de la etapa c).

En otra forma de realización del procedimiento según la invención, el cuerpo de moldeo es un cilindro hueco. Los cilindros huecos pueden fabricarse también mediante extrusión de la solución de la etapa c). Se prefiere, sin embargo, la fabricación de cilindros huecos mediante una aplicación homogénea de la solución de la etapa c) sobre la superficie de un cilindro, particularmente mediante una inmersión momentánea del cilindro en la solución. Al secar la solución, se genera un cilindro hueco que puede retirarse del cilindro.

Otro procedimiento de fabricación preferido para cilindros huecos comprende el arrollamiento de una lámina en un cilindro hueco mono- o multicapa. La unión de la lámina a un cilindro hueco cerrado puede realizarse, por ejemplo, de modo que la lámina en el arrollamiento esté húmeda y se adhiera. Como alternativa, la lámina puede adherirse mediante un adhesivo, por ejemplo, gelatina.

En una forma de realización del procedimiento, se forma en primer lugar el cilindro hueco mediante arrollamiento de una lámina no estirada (etapas a) a c)) y a continuación se estira en la dirección longitudinal (etapa d)), reduciéndose el diámetro interno (véase anteriormente). De este modo, pueden estirarse también cilindros huecos fabricados mediante inmersión.

En una forma de realización alternativa del procedimiento, se fabrica en primer lugar una lámina y se estira (etapas a) a d)) y sólo después se arrolla en un cilindro hueco. Además, el arrollamiento puede realizarse paralela o perpendicularmente a la dirección de estiramiento, obteniéndose el cilindro hueco con una elevada resistencia a la rotura en la dirección longitudinal o en la dirección periférica. Según el campo de aplicación, puede preferirse una u otra variante.

Un arrollamiento de láminas perpendicular a la dirección de estiramiento es particularmente ventajoso en láminas reforzadas con fibras, ya que en este caso las fibras se orientan al menos parcialmente a lo largo de la dirección periférica del cilindro hueco. En un uso como guías nerviosas que frecuentemente se suturan quirúrgicamente en sus extremos, dicha orientación de fibras puede contrarrestar un descosido del hilo de sutura.

El procedimiento según la invención es particularmente adecuado para la fabricación de los cuerpos de moldeo según la invención descritos anteriormente. Resultan por tanto otras ventajas del procedimiento de fabricación de la descripción de los cuerpos de moldeo según la invención.

La invención se refiere además al uso de los cuerpos de moldeo descritos para empleo en el campo de medicina humana y veterinaria y para la fabricación de implantes.

Un uso según la invención se refiere por un lado a la fabricación de apósitos a partir de los cuerpos de moldeo anteriormente descritos. Estos pueden utilizarse en el tratamiento de heridas o de hemorragias internas o externas, por ejemplo, en operaciones. La reabsorción del cuerpo de moldeo se realiza además después de un tiempo individualmente ajustable, preferiblemente mediante la elección de las condiciones de fabricación.

Se ha mostrado que los cuerpos de moldeo según la invención son notablemente adecuados para la colonización con células de mamífero, es decir, con células humanas o animales. Además, se trata un cuerpo de moldeo con un medio nutritivo adecuado y a continuación se siembran sobre él las células, por ejemplo, fibroblastos o condrocitos. Debido a la estabilidad del material, las células pueden crecer y proliferar *in vitro* varias semanas.

La invención se refiere además a implantes, particularmente a implantes de tejido que comprenden un cuerpo de moldeo según la invención y las células aplicadas o cultivadas sobre éste, como se describe anteriormente.

Los implantes según la invención se usan para el tratamiento de defectos de tejidos, por ejemplo defectos cutáneos o cartilaginosos, en los que las células sembradas pueden extraerse, por ejemplo antes, de los pacientes. Durante la fase de crecimiento de las células, el cuerpo de moldeo confiere al tejido en formación protección ante tensiones mecánicas, y posibilita la construcción de la matriz extracelular endógena. Tanto la alta resistencia mecánica como el tiempo de reabsorción ajustable del cuerpo de moldeo se demuestran además como especialmente ventajosos. Con la ayuda de materiales de larga duración, que presentan un tiempo de reabsorción de más de 4 semanas, pueden tratarse también defectos a gran escala o defectos del tipo de tejido de crecimiento celular lento.

La invención se refiere finalmente una guía nerviosa que comprende un cuerpo de moldeo según la invención en forma de un cilindro hueco. Se han descrito ya anteriormente con detalle las ventajas especiales y las formas de realización de dichas guías nerviosas.

Se ilustran detalladamente estas y otras ventajas de la invención mediante los siguientes ejemplos con referencia a las figuras. Se muestran detalladamente:

Figura 1: Diagrama de tracción/alargamiento de cuerpos de moldeo según la invención en forma de láminas de distinto grado de reticulación en el estiramiento después de un tiempo de almacenamiento de tres días.

Figura 2: Diagrama de tracción/alargamiento de cuerpos de moldeo según la invención en forma de láminas de distinto grado de reticulación en el estiramiento después de un tiempo de almacenamiento de 7 días.

ES 2 328 282 T3

Figura 3: Diagrama de tracción/alargamiento de cuerpos de moldeo según la invención en forma de láminas de distinto grado de reticulación en el estiramiento después de un tiempo de almacenamiento de 28 días.

Figura 4: Diagrama de tracción/alargamiento de cuerpos de moldeo según la invención en forma de láminas de distinta proporción de plastificante en el estiramiento después de un tiempo de almacenamiento de 3 días.

Figura 5: Diagrama de tracción/alargamiento de cuerpos de moldeo según la invención en forma de láminas de distinta proporción de plastificante en el estiramiento después de un tiempo de almacenamiento de 7 días.

Figura 6: Diagrama de tracción/alargamiento de cuerpos de moldeo según la invención en forma de láminas de distinta proporción de plastificante en el estiramiento después de un tiempo de almacenamiento de 28 días.

Figura 7: Representación fotográfica de cilindros huecos según la invención; y

Figura 8: Fotografía de microscopía óptica de un cilindro hueco según la invención en sección transversal.

Ejemplo 1

Fabricación y propiedades de láminas estiradas y no estiradas con distinto grado de reticulación

Para este ejemplo, se fabricaron distintas láminas basadas en un material que contenía respectivamente proporciones constantes de aprox. 71% en peso de gelatina y aprox. 29% en peso de plastificante. Las distintas cantidades de agente reticulante se encuentran entre 1.000 y 4.000 ppm (referidas respectivamente a la cantidad de gelatina).

Para ello, se disolvieron respectivamente por preparación 20 g de gelatina de piel de cerdo con un valor de Bloom de 300 g en una mezcla de 72 g de agua y 8 g de glicerina como plastificante a 60°C. Después de desgasificar las soluciones mediante ultrasonidos, se añadieron respectivamente a las cantidades designadas en la Tabla 1 una solución acuosa de formaldehído (al 2,0% en peso a temperatura ambiente), se homogeneizó la mezcla y se aplicó con rasqueta aproximadamente a 60°C con un grosor de 1 mm sobre un soporte de poliuretano.

TABLA 1

Preparación	1-1	1-2	1-3	1-4
Solución de formaldehído	1 h	2 g	3 g	4 g
Contenido de formaldehído respecto a la gelatina	1.000 ppm	2.000 ppm	3.000 ppm	4.000 ppm

Después de secar a 25°C y una humedad relativa del 30%, se retiraron durante aproximadamente 2 días las láminas fabricadas del soporte de PE. El grosor de las láminas ascendía a aprox. 220 μ m.

Antes del estiramiento, se almacenaron distintas láminas fabricadas según las preparaciones anteriores 1-1 a 1-4 durante 3, 7 y 28 días a una temperatura de 23°C y una humedad relativa del 45%. Se trataron respectivamente del mismo modo láminas comparativas correspondientes que no se estiraron.

Para el estiramiento, se ablandaron las láminas mediante exposición a vapor de agua caliente, se extendieron en este estado termoplástico en una dirección hasta el límite de estiramiento y se fijaron durante una noche a una temperatura de 23°C y una humedad relativa del 45%. Las relaciones de estiramiento se encuentran así en el intervalo de aprox. 2 a 4.

A continuación, se tomaron los diagramas de tracción/alargamiento de las láminas estiradas (en la dirección del estiramiento) y de las láminas no estiradas correspondientes. Estas se representan en las Figuras 1 a 3.

En las leyendas de las curvas individuales de las gráficas, las dos primeras cifras representan respectivamente la preparación de la que se ha fabricado la lámina, mientras que la tercera cifra representa el tiempo de almacenamiento antes del estiramiento (3, 7 ó 28 días). Las láminas estiradas se caracterizan por la letra V antes de la última cifra.

La Figura 1 muestra el diagrama de tracción/alargamiento de las láminas estiradas después de 3 días, y de las láminas comparativas no estiradas que se han almacenado 3 días en las mismas condiciones. Una comparación de las curvas entre sí muestra en primer lugar que la resistencia a la rotura de las láminas estiradas según la invención aumenta claramente con la elevación del contenido de agente reticulante.

ES 2 328 282 T3

Los efectos del estiramiento dependen también del contenido de agente reticulante. A un contenido relativamente bajo de formaldehído de 1.000 ppm, la resistencia a la rotura de la lámina estirada 1-1-V3 frente a la lámina no estirada 1-1-3 permanece constante en gran medida, mientras que el alargamiento de rotura de aprox. 60% se eleva claramente a casi 100%. A concentraciones de formaldehído de 2.000 ppm y más, el estiramiento conduce a láminas con una resistencia a la rotura claramente elevada, en el caso de 4.000 ppm de formaldehído, incluso a más del doble (lámina 1-4-V3 frente a lámina 1-4-3).

Estos resultados muestran que, mediante el estiramiento de láminas basadas en gelatina reticulada, pueden mejorarse sus propiedades mecánicas de modo variado. Según el grado de reticulación, resulta además una influencia positiva sobre el alargamiento de rotura, la resistencia a la rotura o ambos parámetros (por ejemplo, lámina 1-2-V3 frente a lámina 1-2-3).

La Figura 2 muestra el diagrama de tracción/alargamiento de láminas estiradas después de 7 días y de las láminas comparativas correspondientes. La mayor resistencia a la rotura conseguida mediante el estiramiento de las láminas es también aquí claramente observable.

Una comparación con la Figura 1 muestra además que, mediante el mayor tiempo de almacenamiento antes del estiramiento, pueden conseguirse ya a contenidos de reticulante menores resistencias a la rotura mayores de las láminas según la invención (por ejemplo, lámina 1-2-V7 frente a lámina 1-2-V3). Es causa de ello probablemente una continuación de la reacción de reticulación durante el tiempo de almacenamiento.

La Figura 3 muestra finalmente las propiedades mecánicas de las láminas estiradas después de 28 días y de las láminas comparativas correspondientes. Se tomaron los diagramas de tracción/alargamiento aquí sólo para láminas según las preparaciones 1-1, 1-3 y 1-4.

Aunque los desarrollos de las curvas de láminas no estiradas después de un tiempo de almacenamiento de 28 días son casi idénticos, las propiedades de las láminas estiradas dependen en gran medida del contenido de agente reticulante. A un contenido bajo de 1.000 ppm, el estiramiento apenas tiene influencia, a 3.000 y 4.000 ppm aumenta por el contrario drásticamente la resistencia a la rotura frente a las láminas no estiradas. La resistencia a la rotura máxima de casi 90 N/mm², que se alcanza en la lámina 1-4-V28, es de nuevo mayor que en las láminas estiradas después de 3 ó 7 días por el largo tiempo de almacenamiento.

En todos los diagramas de tracción/alargamiento representados, ha de observarse que los desarrollos de curvas respectivos en la fabricación de láminas a escala de laboratorio no son exactamente reproducibles. Sin embargo, es característica la relación de curvas de distintas láminas entre sí.

Ejemplo 2

Fabricación y propiedades de láminas estiradas y no estiradas con distintas proporciones de plastificante

Este ejemplo se refiere a láminas basadas en gelatina reticulada con un contenido constante de agente reticulante de 2.000 ppm (referido a la cantidad de gelatina). El material de las láminas comprendía, además de gelatina, distintas proporciones de plastificante de entre aprox. 17% en peso y aprox. 33% en peso.

Para la fabricación de láminas, se disolvieron a 60°C respectivamente 20 g de gelatina de piel de cerdo (valor de Bloom de 300 g) en 4 distintas preparaciones en una mezcla de agua y glicerina como plastificante, correspondiente respectivamente a los datos de cantidades de la Tabla 2. Después de desgasificar la solución mediante ultrasonidos, se añadieron respectivamente 2 g de una solución acuosa de formaldehído (2,0% en peso, temperatura ambiente), se homogeneizó la mezcla y se aplicó con rasqueta a aprox. 60°C con un grosor de 1 mm sobre un soporte de polietileno.

TABLA 2

Preparación	2-1	2-2	2-3	2-4
Agua	76 g	74 g	72 g	70 g
Glicerina	4 g	6 g	8 g	10 g
Proporción de glicerina en el material	16,7% en peso	23,1% en peso	28,6% en peso	33,3% en peso

El secado, almacenamiento y estiramiento de las láminas se realizó también aquí como se describe en el ejemplo 1.

ES 2 328 282 T3

Los diagramas de tracción/alargamiento de láminas estiradas y no estiradas se representan en las Figuras 4 a 6. Las denominaciones de las curvas individuales son análogas al ejemplo 1.

La Figura 4 muestra el diagrama de tracción/alargamiento de láminas según la invención que después de un tiempo de almacenamiento de 3 días se han estirado, y las correspondientes láminas comparativas no estiradas. En primer lugar, llama la atención que, en todas las proporciones de plastificante utilizadas, la resistencia a la rotura de las láminas según la invención aumenta claramente con el estiramiento. Es especialmente llamativo este efecto en las láminas de las preparaciones 2-1 y 2-2 con bajas proporciones de plastificante, que presentan sin estiramiento un comportamiento totalmente insatisfactorio de tracción/alargamiento. Las láminas estiradas presentan por el contrario muy buenas propiedades mecánicas con altas resistencias a la rotura (aprox. 100 N/mm² en la lámina 2-1-V3).

Ha de observarse además que, mediante el estiramiento según la invención de láminas, no sólo mejora significativamente la resistencia a la rotura sino, con excepción de la preparación 2-4, también el alargamiento de rotura. Esto es asombroso, si se considera que las láminas han experimentado ya con el estiramiento un alargamiento de aprox. 100 a 300%.

Los diagramas de tracción/alargamiento de láminas estiradas después de 7 días de la Figura 5 muestran cualitativamente los mismos resultados que con estiramiento después de 3 días. En todas las preparaciones, la resistencia a la rotura de las láminas estiradas según la invención se eleva en cierta medida claramente por el tiempo de almacenamiento más largo, lo que principalmente podría atribuirse a la continuación anteriormente descrita de la reacción de reticulación. También el almacenamiento más largo tiene una influencia positiva sobre los alargamientos de rotura.

La Figura 6 muestra finalmente los diagramas de tracción/alargamiento de las láminas a un tiempo de almacenamiento de 28 días, en los que aquí se han medido sólo las láminas estiradas y no estiradas de las preparaciones 2-1, 2-2 y 2-4. En comparación con la Figura 5, las curvas muestran un desarrollo muy similar, en el que las resistencias a la rotura de las láminas estiradas son incluso algo menores que en el almacenamiento a 7 días. Esto sugiere que hay un óptimo para el tiempo de almacenamiento, que debería depender de la concentración de agente reticulante y la proporción de plastificante.

Ejemplo 3

Fabricación de láminas estiradas reticuladas dos veces

Este ejemplo se refiere a la fabricación de láminas según la invención con una segunda etapa de reticulación después del estiramiento, mediante la que se alargan claramente los tiempos de degradación fisiológica de las láminas.

Los puntos de partida para ello fueron las láminas estiradas de los ejemplos 1 y 2. Estas se expusieron, después de estirar y fijar durante una noche, en un desecador durante 2 horas a la presión de vapor en equilibrio de una solución acuosa de formaldehído al 17% en peso a temperatura ambiente.

A continuación, se analizó el comportamiento de degradación de estas láminas reticuladas dos veces a diferencia de láminas de partida reticuladas una vez. Para ello, se dispusieron trozos de lámina de 2 x 3 cm de tamaño respectivamente en 500 ml de tampón PBS (pH 7,2) y se midió fotométricamente la concentración de la gelatina disuelta en tampón a una longitud de onda de 214 nm. Mientras que las láminas reticuladas una vez se desprendieron totalmente ya después de 15 minutos, en las láminas reticuladas dos veces, no se detectaban todavía cambios después de 1 hora.

Las propiedades mecánicas ventajosas de las láminas estiradas permanecieron esencialmente intactas durante la segunda etapa de reticulación.

Ejemplo 4

Fabricación de láminas basadas en gelatina reticuladas enzimáticamente

Este ejemplo se refiere a la fabricación de una lámina basada en gelatina en la que la reticulación se llevó a cabo enzimáticamente con transglutaminasa.

Para ello, se disolvieron a 60°C 20 g de gelatina de piel de cerdo (valor de Bloom de 300 g) en una mezcla de 72 g de agua y 8 g de glicerina, que corresponde a una proporción de plastificante de aprox. 29% en peso. Después de desgasificar la solución mediante ultrasonidos, se añadieron 4 g de una solución acuosa de transglutaminasa con una actividad específica de 30 U/g, se homogeneizó la mezcla y se aplicó con rasqueta con un grosor de 1 mm sobre un soporte de polietileno templado a 45°C.

Después de 30 min, se retiró la lámina del soporte de PE, se mantuvo 2 horas a una temperatura de 50°C y una humedad relativa del 90% y a continuación se secó durante aproximadamente 2 días a una temperatura de 25°C y una humedad relativa del 30%.

La lámina reticulada con transglutaminasa presentaba una resistencia a la rotura de aprox. 9 N/mm² a un alargamiento de rotura de aprox. 300%.

ES 2 328 282 T3

Pueden llevarse a cabo de igual manera un estiramiento de la lámina fabricada de este modo y eventualmente una segunda reticulación con formaldehído en fase gaseosa, como se describe en los ejemplos 1 ó 3.

Ejemplo 5

Fabricación de cilindros huecos estirados basados en gelatina

Mediante el estiramiento según la invención de cilindros huecos basados en gelatina, podrían fabricarse túbulos muy finos con un diámetro interno en el intervalo de 800 a 1.200 μm .

Como material de partida, servía una solución de gelatina de piel de cerdo (valor de Bloom de 300 g) que se fabricaba correspondientemente al modo de preparación descrito en los ejemplos 1 y 2 mediante la disolución de 100 g de gelatina en una mezcla de 260 g de agua y 40 g de glicerina como plastificante. Esto corresponde a una proporción de plastificante de aprox. 29% en peso.

Después de la adición de 4 g de una solución acuosa de formaldehído al 2,0% en peso (800 ppm de reticulante referido a la gelatina), se homogeneizó la solución, se desgasificó de nuevo y se liberó de espuma la superficie. Se sumergieron brevemente una serie de puntas de acero fino de un diámetro de 2 mm, que se habían pulverizado antes con una cera desmoldeante, a una longitud de aprox. 3 cm en la solución. Después de la extracción de las puntas de la solución, se mantuvieron éstas perpendiculares de modo que la solución adhesiva formara una capa lo más homogénea posible.

Después de un secado de aproximadamente 1 día a 25°C y una humedad relativa del 30%, se pudieron retirar los túbulos de gelatina formados de las puntas de acero fino. Se almacenaron estos entonces otros 5 días a 23°C y una humedad relativa del 45%.

Para el estiramiento, se sujetaron los túbulos en ambos extremos y se ablandaron mediante exposición a vapor de agua caliente. En este estado termoplástico, se alargaron con una relación de estiramiento de aprox. 1,4, se fijaron en este estado y se secaron durante una noche a 23°C y una humedad relativa del 45%.

Para alargar el tiempo de degradación fisiológica de los túbulos de gelatina, se sometieron estos, correspondientemente a las láminas descritas en el ejemplo 3, a una segunda etapa de reticulación. Para ello, se expusieron los túbulos en un desecador durante 17 horas a una presión de vapor equivalente a una solución acuosa de formaldehído al 17% a temperatura ambiente. Además, se cerraron ambos extremos de los túbulos, de modo que la reticulación se realizara esencialmente sólo en el lado externo.

En la Figura 7, se representan algunos túbulos de gelatina 10 fabricados de este modo con una longitud de aprox. 3 cm en un recipiente de vidrio 12.

La Figura 8 muestra una fotografía de microscopio óptico de la sección transversal de un túbulo. El túbulo formado presenta un diámetro interno de aprox. 1.100 μm y un grosor de pared de aprox. 200 μm . Tanto la forma de la sección transversal como el grosor de pared del túbulo son extremadamente regulares.

Los túbulos de gelatina fabricados en este ejemplo son especialmente bien adecuados, debido a sus medidas y debido a su largos tiempos de degradación, como guías nerviosas. También la reticulación más fuerte de los túbulos en el lado externo es ventajosa para esta aplicación, ya que de este modo el túbulo puede degradarse en el transcurso del crecimiento de células nerviosas desde dentro hacia fuera.

Mediante la elevación de la relación de estiramiento, pueden fabricarse también cilindros huecos según la invención con un diámetro interno todavía menor, que pueden ser ventajosos para otras aplicaciones. Particularmente, usando el procedimiento de la invención, es posible fabricar túbulos extremadamente finos con un diámetro en el intervalo de 150 μm . Dicho valor no puede alcanzarse sin un estiramiento de los túbulos.

REIVINDICACIONES

1. Cuerpo de moldeo basado en un material reticulado que contiene gelatina, en el que el cuerpo de moldeo está
5 estirado de modo que las moléculas de gelatina están orientadas al menos parcialmente en una dirección preferente, y
en el que el material comprende un plastificante.

2. Cuerpo de moldeo según la reivindicación 1, en el que el material está formado en proporción mayoritaria por
gelatina.

10 3. Cuerpo de moldeo según la reivindicación 1 ó 2, en el que el plastificante se selecciona de glicerina, oligoglice-
rinas, oligoglicoles y sorbita.

15 4. Cuerpo de moldeo según una de las reivindicaciones precedentes, en el que el cuerpo de moldeo está estirado de
modo monoaxial.

5. Cuerpo de moldeo según una de las reivindicaciones precedentes, en el que el cuerpo de moldeo comprende un
reforzante.

20 6. Cuerpo de moldeo según la reivindicación 5, en el que el reforzante se selecciona de reforzantes particulados
y/o moleculares.

7. Cuerpo de moldeo según la reivindicación 6, en el que el reforzante particulado comprende fibras reforzantes.

25 8. Cuerpo de moldeo según una de las reivindicaciones precedentes, en el que el cuerpo de moldeo es una lámina.

9. Cuerpo de moldeo según una de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el cuerpo de moldeo es un cilindro hueco.

10. Cuerpo de moldeo según la reivindicación 9, en el que el cilindro hueco está estirado en dirección longitudinal.

30 11. Cuerpo de moldeo según la reivindicación 9, en el que el cilindro hueco está estirado en dirección periférica.

12. Procedimiento para la fabricación de un cuerpo de moldeo estirado basado en un material reticulado que
contiene gelatina, que comprende las siguientes etapas:

35 a) fabricación de una solución acuosa de un material que contiene gelatina;

b) reticulación parcial del material que contiene gelatina disuelto;

40 c) fabricación de un cuerpo de moldeo a partir de la solución que contiene el material parcialmente reticulado; y

d) estiramiento del cuerpo de moldeo.

45 13. Procedimiento según la reivindicación 12, en el que el material de la etapa a) está formado en proporción
mayoritaria por gelatina.

14. Procedimiento según la reivindicación 12 ó 13, en el que el material de la etapa a) comprende un plastificante.

50 15. Procedimiento según una de las reivindicaciones 12 a 14, en el que el cuerpo de moldeo se seca al menos
parcialmente entre las etapas c) y d).

16. Procedimiento según una de las reivindicaciones 12 a 15, en el que el cuerpo de moldeo se transfiere a un
estado termoplástico inmediatamente antes de la etapa d) mediante una elevación de la temperatura y/o del contenido
de agua.

55 17. Procedimiento según una de las reivindicaciones 12 a 16, en el que la etapa d) se lleva a cabo con una relación
de estiramiento de 1,4 a 8.

60 18. Procedimiento según una de las reivindicaciones 12 a 17, en el que la etapa d) se lleva a cabo 3 a 7 días después
de la etapa c).

19. Procedimiento según una de las reivindicaciones 12 a 18, que comprende además:

e) reticulación del material contenido en el cuerpo de moldeo estirado.

65 20. Procedimiento según la reivindicación 19, en el que la reticulación de la etapa e) se lleva a cabo mediante la
acción de un agente reticulante en fase gaseosa.

ES 2 328 282 T3

21. Procedimiento según una de las reivindicaciones 12 a 20, en el que el cuerpo de moldeo es una lámina.

22. Procedimiento según una de las reivindicaciones 12 a 20, en el que el cuerpo de moldeo es un cilindro hueco.

5 23. Uso de un cuerpo de moldeo según una de las reivindicaciones 1 a 11 para la fabricación de un material reabsorbible para el recubrimiento de heridas o de hemorragias internas o externas en el campo de la medicina humana o veterinaria.

10 24. Uso de un cuerpo de moldeo según una de las reivindicaciones 1 a 11 como soporte para el cultivo de células de mamífero *in vitro*.

25. Implante que comprende un cuerpo de moldeo según una de las reivindicaciones 1 a 11, así como células de mamífero que se aplican o cultivan sobre el cuerpo de moldeo.

15

20

25

30

35

40

45

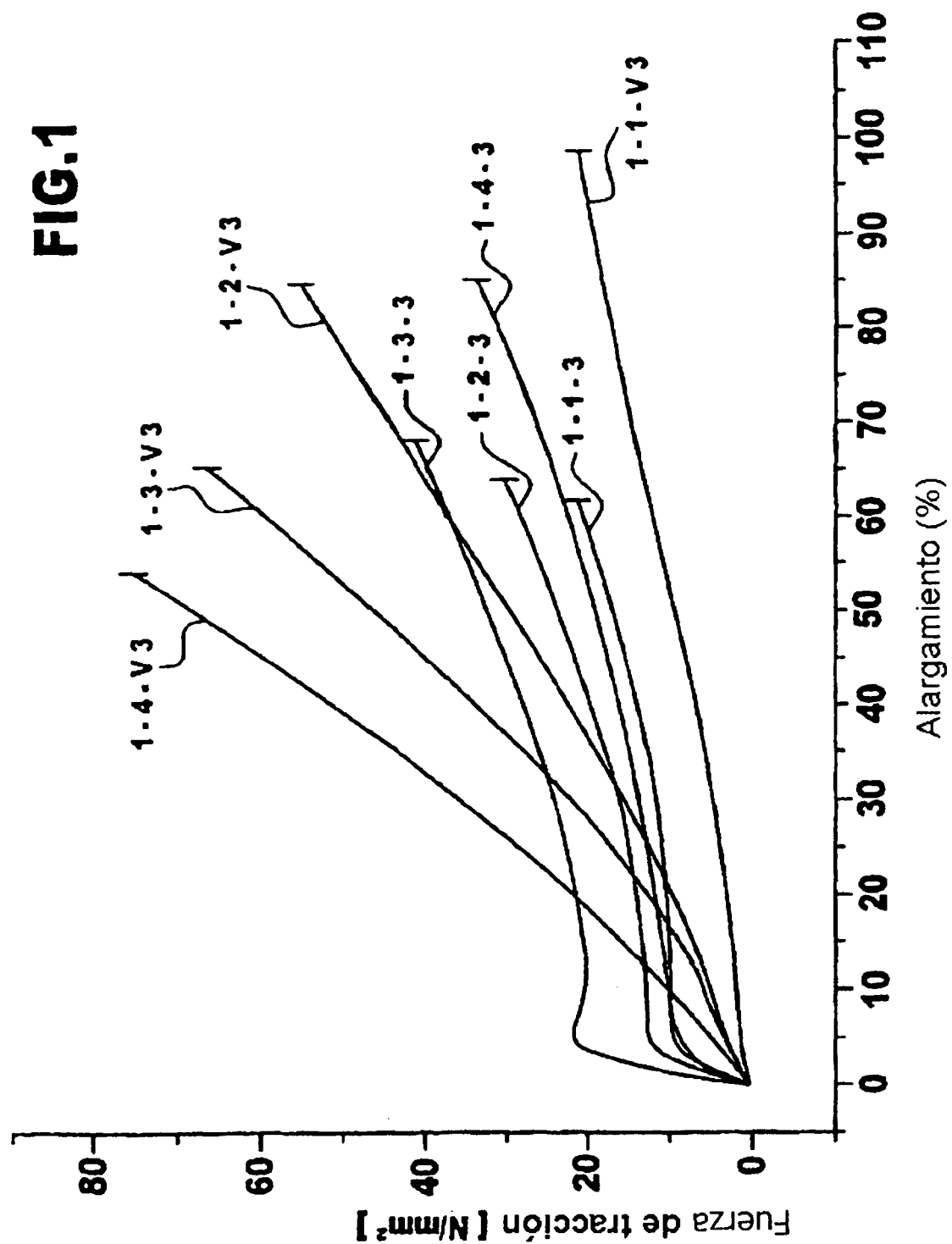
50

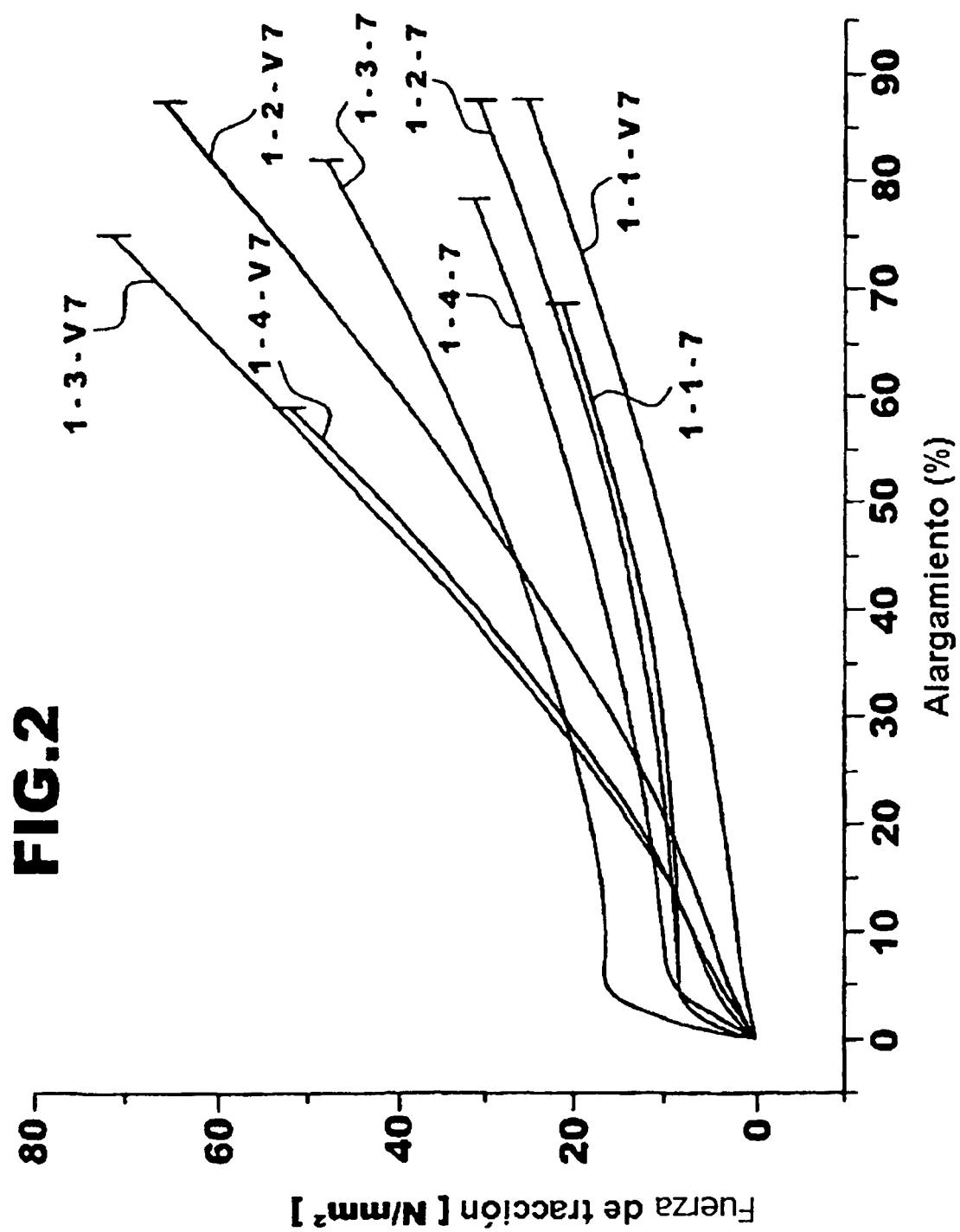
55

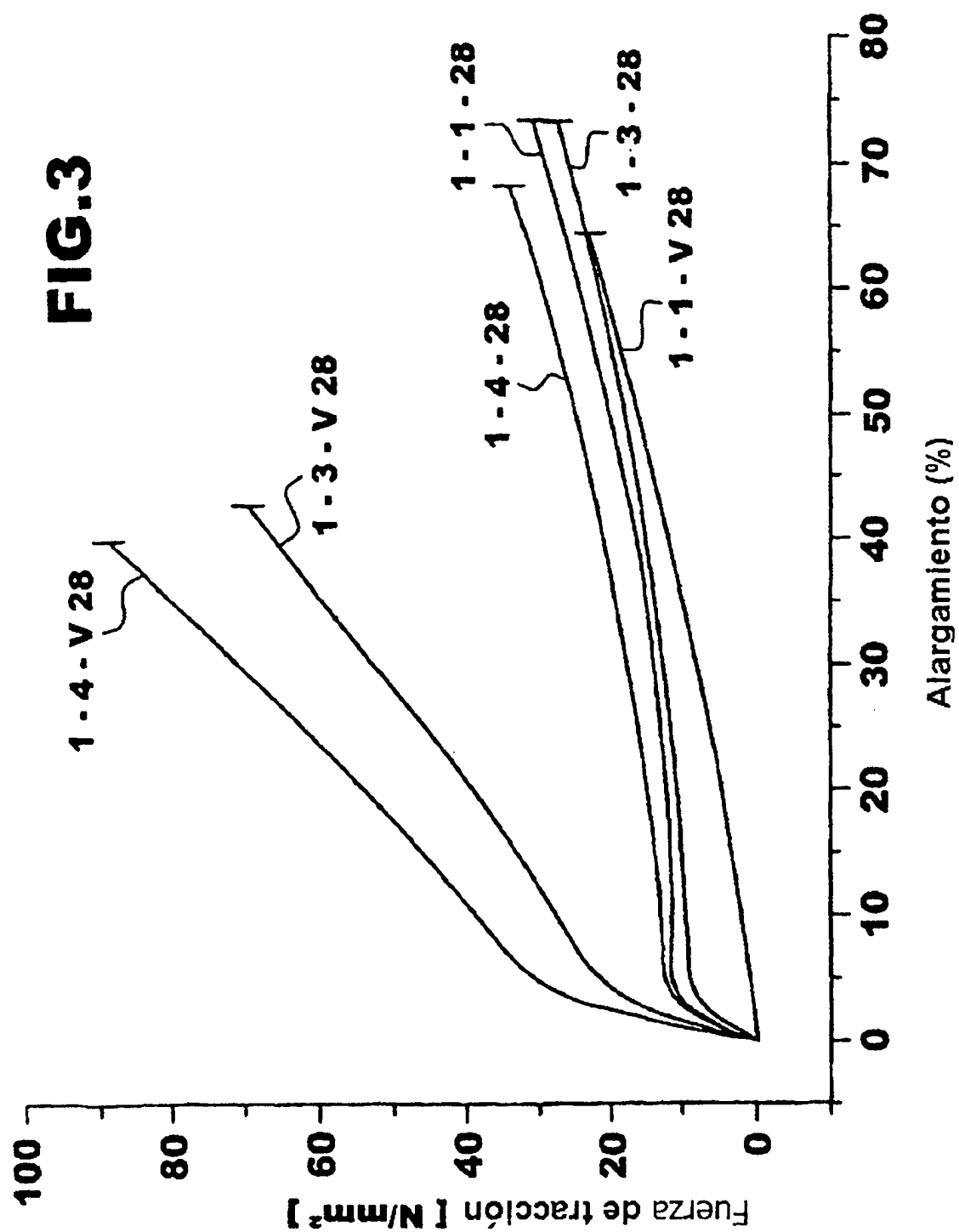
60

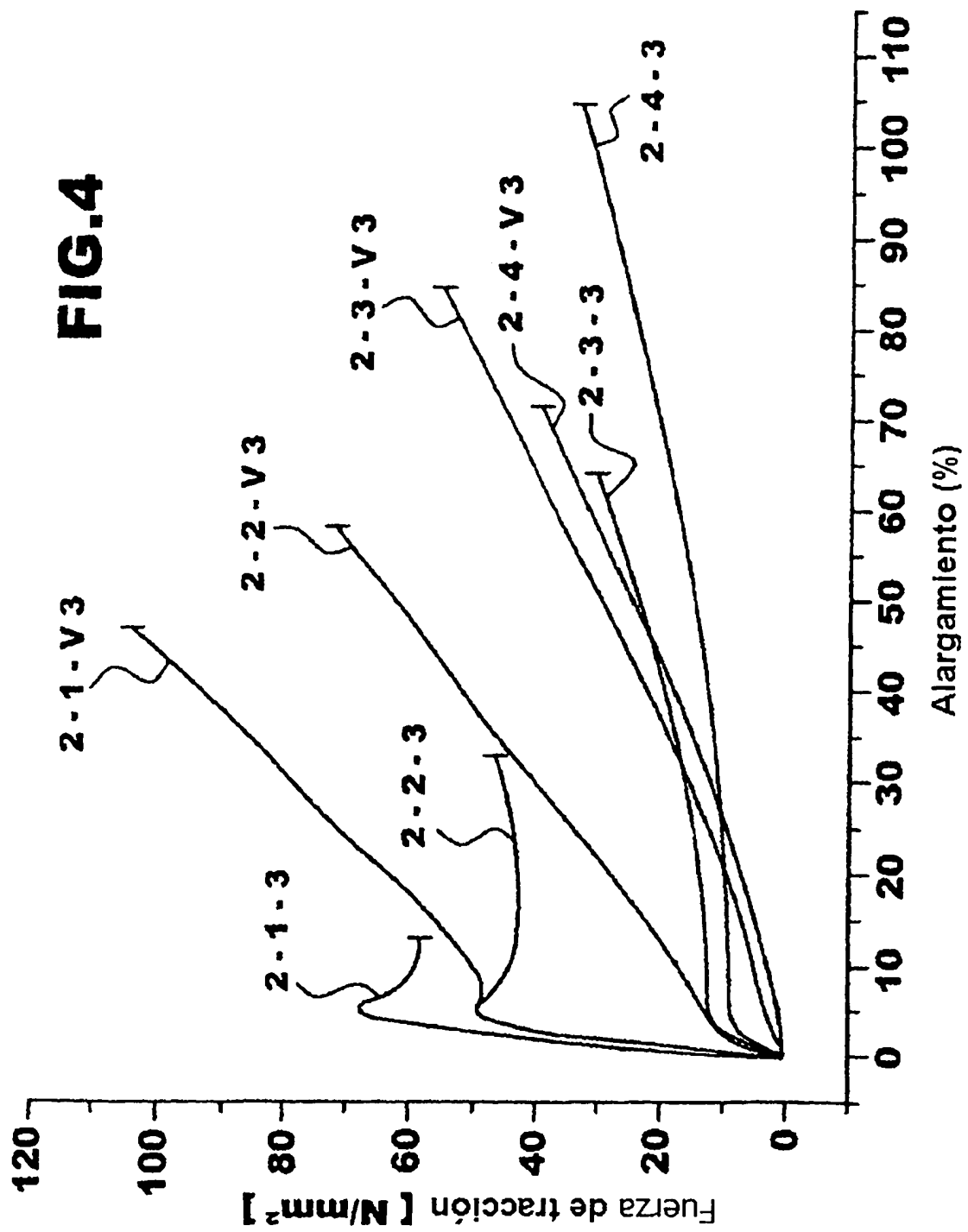
65

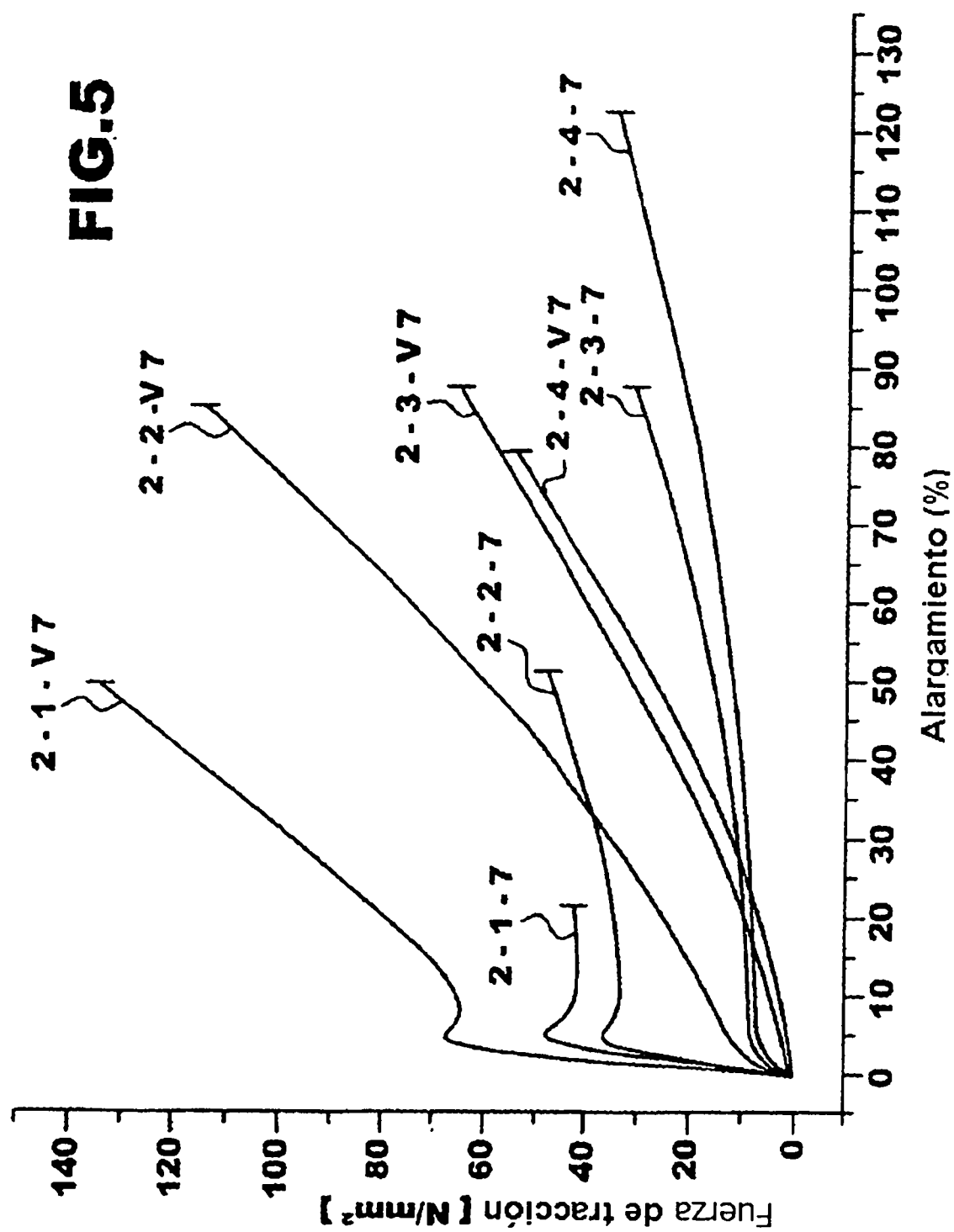
FIG.1











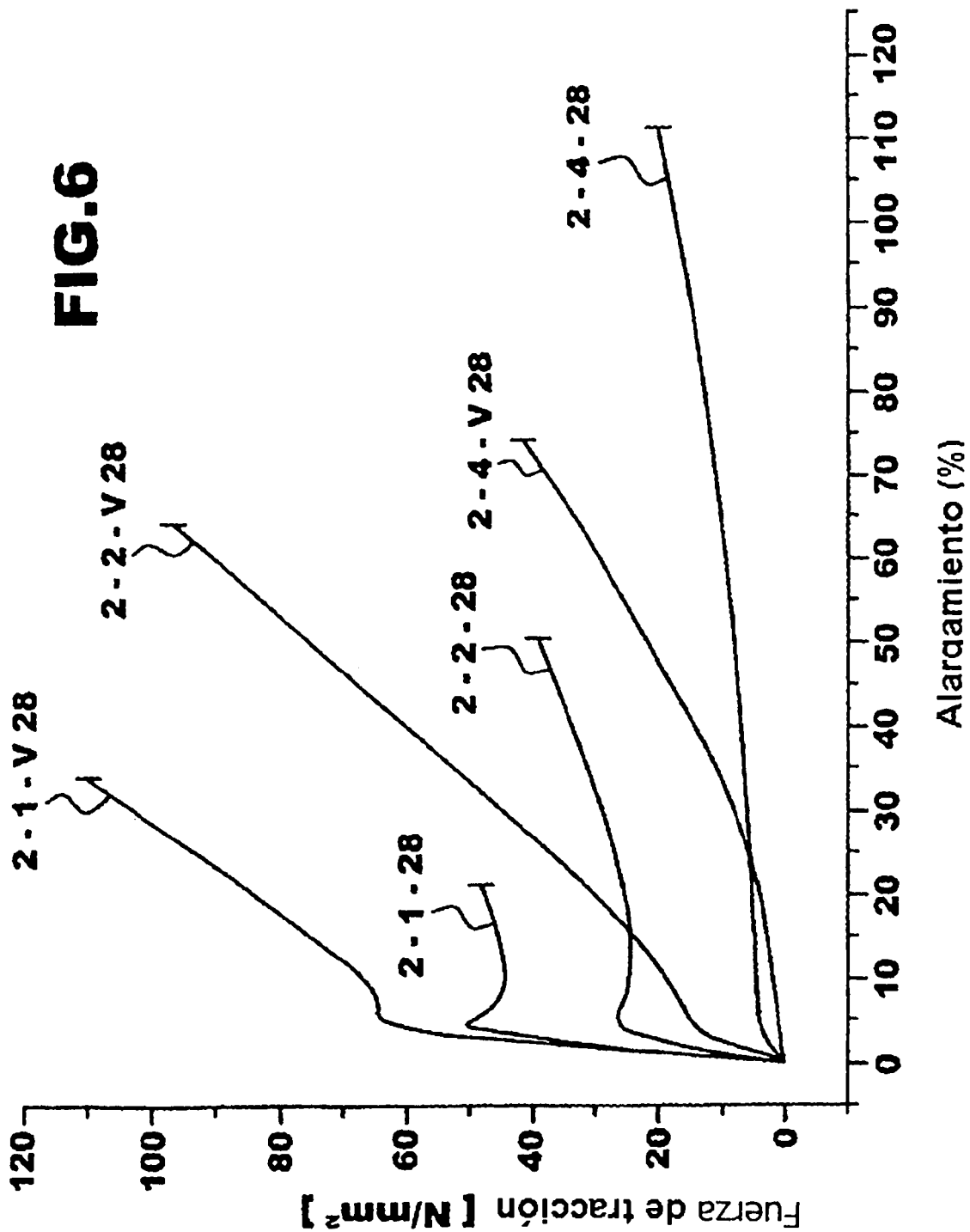


FIG.7

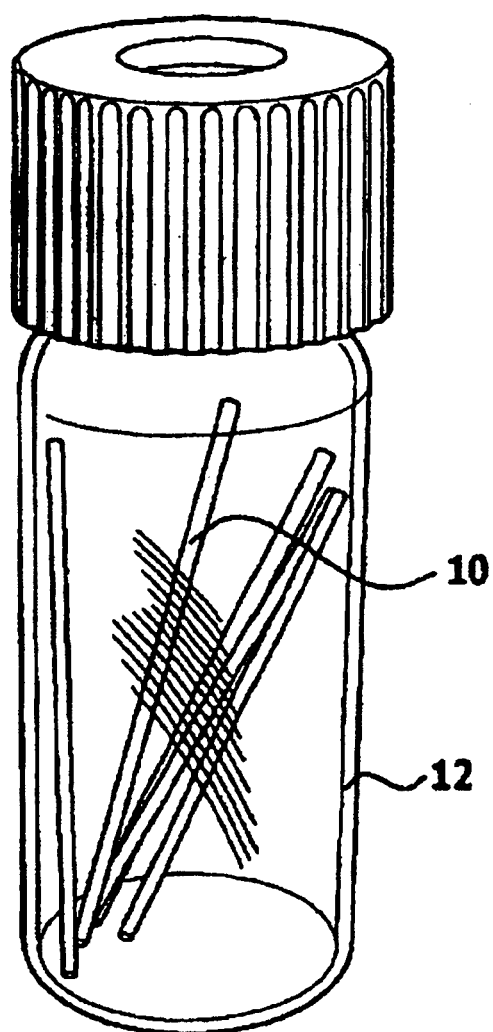


FIG.8

