

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 941 614**

51 Int. Cl.:

A61L 31/06 (2006.01)

A61L 31/10 (2006.01)

A61L 31/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.03.2020** **PCT/EP2020/055510**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.09.2020** **WO20178271**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.03.2020** **E 20706756 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.01.2023** **EP 3934706**

54 Título: **Matriz biodegradable de dos capas para prevenir las adherencias posquirúrgicas, en particular en la reparación de hernias**

30 Prioridad:

04.03.2019 EP 19160449

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.05.2023

73 Titular/es:

BAER, HANS ULRICH (100.0%)
Strandweg 3
8807 Freienbach, CH

72 Inventor/es:

BAER, HANS ULRICH

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 941 614 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

Matriz biodegradable de dos capas para prevenir las adherencias posquirúrgicas, en particular en la reparación de hernias

5 La presente invención se refiere a una matriz biodegradable de dos capas para prevenir adherencias posquirúrgicas, en particular tras la reparación de tejidos blandos en cirugía abdominal, por ejemplo en la reparación de hernias, en el interior del cuerpo de un mamífero, de acuerdo con lo que se reivindica en la reivindicación 1. Además, la invención se refiere a un procedimiento para preparar la matriz biodegradable como se define en la reivindicación 10.

10 Cualquier traumatismo de un tejido suele ir seguido de la cicatrización, que normalmente va acompañada de la formación de tejido cicatrizante colagenoso. Cualquier traumatismo físico, químico o por radiación en un tejido biológico consistente en diversas células, matriz extracelular y tejido conjuntivo puede provocar la muerte de estas células y estructuras. El proceso de curación de los tejidos dañados implica varios pasos que también se encuentran en los procesos inflamatorios. Específicamente, los primeros pasos en la cicatrización de heridas implican la eliminación de tejidos necróticos, células muertas y restos. En un segundo paso, los tejidos eliminados son sustituidos, entre otras cosas, por células inflamatorias y fibroblastos responsables de la producción de colágeno en sus diversas formas, lo que conduce a la formación de tejidos cicatrizantes. Esta formación de cicatriz es deseable para cerrar el defecto en el tejido blando. Sin embargo, si el daño tisular afecta a dos o más tejidos que se encuentran en proximidad cercana de unos con los otros, el proceso de cicatrización también puede dar lugar a la formación de una conexión no deseada de tejidos originalmente separados. Esta conexión suele ser denominada como formación de adherencias.

20 En los procedimientos quirúrgicos, normalmente se producen múltiples traumatismos tisulares previos y/o causados por la incisión realizada por el cirujano para llegar a la zona quirúrgica. En consecuencia, las adherencias postquirúrgicas entre tejidos y/u órganos se encuentran entre las complicaciones más comunes que se producen tras cualquier tipo de cirugía. Sucesos tales como una hemorragia y/o inflamación excesivas, o el contacto íntimo entre tejidos aumentan sustancialmente la probabilidad de formación de adherencias en el lugar del traumatismo. Las consecuencias para los pacientes causadas por tales adherencias suelen ser dolor crónico y trastornos funcionales, y en muchos casos requerirán una nueva intervención.

30 Las adherencias pueden producirse en diversas formas e intensidades. En el campo de la cirugía abdominal, la formación de adherencias es motivo de especial preocupación. Las adherencias en la zona abdominal suelen ser consecuencia de un traumatismo abdominal, frecuente en las colisiones automovilísticas, o son causadas por intervenciones quirúrgicas. En lo que se refiere a esta última causa, se ha observado que las adherencias intra - abdominales suelen producirse en el lugar de los procedimientos quirúrgicos o intervencionistas para los que es preciso abrir la pared abdominal a través de todas las capas abdominales y el peritoneo. Después de suturar la incisión, el proceso de cicatrización afecta a todas las capas abdominales, en particular también a la zona del peritoneo situada a lo largo de la incisión. Como resultado, es probable que los procesos fisiológicos de cicatrización en el abdomen provoquen adherencias entre los tejidos del peritoneo y los órganos intra - abdominales adyacentes. Se ha demostrado que tales adherencias se presentan en forma de adherencias densas que forman bandas anchas o como cordones fuertes y tensos de unos pocos milímetros de diámetro que pueden atravesar toda la cavidad abdominal. Se han observado incluso formas extremas de adherencias abdominales que cubren zonas enteras del abdomen, lo que imposibilita la disección entre, por ejemplo, las asas del intestino delgado y el peritoneo, y a menudo provoca la perforación de las asas del intestino delgado o grueso durante la exploración quirúrgica.

40 Aunque es indeseable en general, la aparición de adherencias posquirúrgicas es especialmente preocupante en la reparación quirúrgica de hernias. Una hernia es una afección definida como el desplazamiento anormal de un órgano o de tejidos que sobresalen a través de la pared de una cavidad. Aunque las hernias pueden producirse en diversos lugares, lo más frecuente es que afecten al abdomen, concretamente a la pared abdominal, siendo la ingle el sitio más frecuente. Las hernias inguinales suelen ser de tipo inguinal, pero también pueden ser femorales. Las hernias abdominales se producen en lugares específicos dentro de puntos débiles de la pared abdominal, tales como las hernias de hiato, umbilicales, periumbilicales o de Spiegel, pero en realidad pueden producirse en cualquier parte de la pared abdominal. Un tipo especial es la hernia incisional, que es una hernia que se produce en la zona de una incisión quirúrgica u operación intervencionista anterior.

50 Tradicionalmente, una hernia se reparaba mediante una hernioplastia abierta con suturas. Durante los meses siguientes a la operación de hernia, la zona reparada estaría acumulando tejido cicatrizante, de modo que el defecto de la hernia se cerrará y se reforzará.

55 Lamentablemente, en algunos pacientes se ha demostrado que el proceso de formación de tejido cicatrizante es deficiente, lo que después de la reparación de la hernia da lugar a la formación de otra hernia, es decir, a la denominada recidiva o recurrencia herniaria. Por lo tanto, en particular para la reparación de hernias de mayor tamaño o en caso de recidiva herniaria, los implantes de malla se utilizan hoy en día habitualmente para la reconstrucción y el refuerzo de la pared abdominal. En la actualidad, las mallas disponibles en el mercado que se utilizan en la reparación quirúrgica de tejidos blandos no son degradables o son totalmente degradables y se absorben en el organismo

del paciente al cabo de cierto tiempo. Las mallas totalmente degradables (a menudo denominadas mallas "biológicas") se desarrollaron con la esperanza de que impidieran la formación de adherencias.

Lamentablemente, aunque son útiles para proporcionar estabilidad adicional a la zona reparada del anterior defecto de tejido blando, tanto las mallas no degradables así como también las biodegradables han demostrado causar adherencias posquirúrgicas. En particular, cuando se utilizan las denominadas mallas "IPOM", es decir, "mallas preperitoneales intra - abdominales en capas", para cubrir defectos de la pared abdominal, se ha demostrado que la formación de bandas inflamatorias o fibrosas indeseables o de cicatrices colágenas que conectan la malla y las estructuras intra - abdominales es la causa de dolores recurrentes y de obstrucción del intestino delgado o grueso. Si esta última no se diagnostica a tiempo, puede provocar un infarto del intestino, que generalmente requiere intervenciones quirúrgicas de mayor envergadura y alto riesgo. Por ello, en caso de reparación de hernia abdominal, la formación de adherencias posquirúrgicas puede ser especialmente grave para el bienestar del paciente.

Con el fin de prevenir o al menos minimizar la formación de adherencias postquirúrgicas, se realizaron intentos de aislar el tejido dañado y separarlo de cualquier tejido adyacente con un material biocompatible. Como resultado, se han desarrollado barreras de adherencia, que hoy en día están disponibles en forma de películas físicas, tejidos, geles u otros materiales que se aplican entre las capas de tejidos al final de una intervención quirúrgica antes de cerrar el lugar de la incisión. Mientras se encuentra en su posición, la barrera de adherencia actúa como barrera física para separar las superficies de tejido traumatizado, de modo que se evita la formación de fibrina entre las superficies de cicatrización. Entre los ejemplos de barreras antiadherencias disponibles comercialmente para su uso en procedimientos quirúrgicos se incluyen, por ejemplo:

- Preclude® es una fina lámina de ePTFE poroso (politetrafluoretileno expandido; también llamado GoreTex). Proporciona un inserto microporoso no pegajoso, biocompatible y no inflamatorio. Sin embargo, no es absorbible ni degradable, por lo que requiere una operación posterior para retirarlo. Además, debe ser suturado al tejido en su lugar. Por este motivo, no se aprobó para la prevención de adherencias en EE.UU.
- Seprafilm® (fabricado por Genzyme) es una película transparente y pegajosa compuesta de ácido hialurónico sódico con carboximetilcelulosa (CMC). Se adhiere a los tejidos sobre los que se aplica y se absorbe lentamente en el organismo durante un periodo de siete días. Su uso está autorizado en determinados tipos de cirugía pélvica o abdominal.
- Interceed® (fabricado por Johnson & Johnson) es un tejido de punto compuesto por celulosa modificada que se hincha y eventualmente se gelifica después de haber sido colocado en la zona lesionada y, al igual que Seprafilm, forma una barrera que se absorbe lentamente a lo largo de varios días. Está aprobado para su uso en cirugía pélvica.

Sin embargo, la mayor parte de estas barreras antiadherencia actualmente disponibles no impiden totalmente la formación de adherencias. Son especialmente inadecuados para la cirugía de reparación de hernias, porque en este caso no basta con impedir la formación de tejidos de conexión entre la pared abdominal en cicatrización y los órganos intra - abdominales subyacentes, sino que es al menos igual de importante garantizar que haya un crecimiento suficiente de tejido de los tejidos adyacentes en la zona de la hernia, de forma que el hueco en la pared abdominal quede bien cerrado. En particular, si se utilizan mallas o armazones biodegradables (temporales) para cerrar una hernia, es esencial inducir la fibrogénesis y la formación de cicatrices, es decir, los procesos implicados en la cicatrización de heridas, para formar una placa cicatrizante estable que evite la formación recurrente de hernias. Por lo tanto, el éxito de la reparación de la hernia requiere medios que induzcan la fibrinogénesis y la formación de tejido puente para cerrar el defecto de tejido blando, pero sin provocar adherencias.

El documento WO 99/51163 A1 divulga una malla para cerrar una hernia, la malla comprende al menos una primera capa de polímero degradable más rápidamente y una segunda capa superpuesta de polímero degradable más lentamente. La malla se fabrica preferentemente con PGA y PLA, pudiéndose variar la velocidad de degradación ajustando la proporción de los dos polímeros. La segunda capa de polímero, de degradación más lenta, está diseñada para sellar la hernia hasta que se haya formado suficiente tejido nuevo (unos 6 meses). Por otra parte, se dice que la capa de polímero que se degrada más rápidamente favorece las reacciones inflamatorias debido a su elevada velocidad de degradación, lo que a su vez estimula la formación de tejido cicatrizante. La malla puede incluir opcionalmente una tercera capa, destinada a evitar que las capas de tejido se adhieran a los órganos internos.

El documento WO 2007/029913 A1 divulga una barrera antiadherente de múltiples capas que comprende una capa base estructurada nanofibrosa hecha de un polímero hidrófobo, biodegradable y biocompatible; y una capa polimérica hecha de un polímero hidrófilo de origen biológico, por ejemplo, colágeno, gelatina, elastina, fibrina y laminina.

El documento DE 10 353 930 A1 divulga una malla textil tejida intraperitoneal (malla IPOM). La malla tiene una primera cara con filamentos hidrófobos de PVDF (fluoruro de polivinilideno) y una segunda cara con filamentos hidrófilos, también de PVDF. La segunda cara hidrófila está pensada para adherirse fácilmente y facilitar de esta manera el crecimiento celular.

El problema resuelto por la presente invención es, por tanto, proporcionar una matriz biodegradable, que permita el cierre rápido, seguro y estable de un defecto de tejido blando, en particular un defecto de hernia, mientras se reduce la formación de adherencias. Al mismo tiempo, la matriz deberá ser fácil y barata de fabricar y permitir su uso en procedimientos quirúrgicos convencionales abiertos y laparoscópicos.

- 5 Este problema se resuelve con la matriz de acuerdo con la reivindicación 1. Las realizaciones preferidas son objeto de las reivindicaciones dependientes.

En línea con la presente invención, se proporciona una matriz biodegradable para prevenir las adherencias posquirúrgicas en la reparación quirúrgica de tejidos blandos, en particular después de una cirugía abdominal, dentro del cuerpo de un mamífero. Más concretamente, la matriz de la invención es especialmente adecuada para cubrir zonas del peritoneo o de la pared abdominal lesionadas durante una intervención quirúrgica abdominal o debido a una hernia.

El término "matriz", tal como se utiliza a lo largo de esta solicitud, se refiere a un soporte tridimensional, por ejemplo, una malla o un armazón, con una estructura similar a una esponja, que es adecuado para ser colonizado por células. En concreto, la matriz de la presente invención tiene una estructura esponjosa con poros interconectados de diferentes tamaños. En este sentido, la matriz sirve de plantilla tridimensional que puede ser colonizada por células o tejidos. Esta colonización puede tener lugar *in vitro* o *in vivo*. Además, en relación con los trasplantes, la matriz sirve para situar el trasplante y también como soporte para el tejido que se forma gradualmente *in vivo*.

La expresión "biodegradable" se refiere a un material que puede convertirse en productos metabolizables en organismos vivos (o fluidos corporales o cultivos celulares derivados de organismos vivos). Los materiales biológicamente degradables incluyen, por ejemplo, polímeros que son biorreabsorbibles y/o biodegradables. "Biodegradable" denota la capacidad de ser soluble o suspendible en líquidos biológicos. Biorreabsorbible significa la capacidad de ser absorbido por células, tejidos o fluidos de un organismo vivo.

En línea con la presente invención, la matriz incluye una capa superior porosa hecha de un primer material polimérico biocompatible que comprende poli (ácido láctico) (generalmente abreviado como "PLA") como componente principal y, opcionalmente, al menos otro polímero seleccionado del grupo de poli (ácido glicólico) (generalmente abreviado como "PGA"), poli (ácido glicólico - ácido láctico) generalmente abreviado como "PLGA") y mezclas de los mismos. El término "componente principal" significa que el contenido de PLA del primer material polimérico es mayor que el contenido de cualquier otro polímero que pueda estar presente en el primer material polimérico.

La matriz incluye además una capa inferior porosa hecha de un segundo material polimérico biocompatible que comprende como componente principal al menos un polímero seleccionado del grupo de poli (ácido láctico) [PLA], poli (ácido glicólico) [PGA], poli (ácido glicólico - ácido láctico) [PLGA] y mezclas de los mismos, en el que el contenido de poli (ácido láctico) en el primer material polimérico es mayor que en el segundo material polimérico. El término "mezclas de los mismos" también incluye los copolímeros de los polímeros mencionados.

Como "polímeros biocompatibles", los polímeros serán biológicamente tolerados y no causarán rechazo cuando se introduzcan en un organismo vivo. Para la presente invención, los polímeros biocompatibles también abarcan los polímeros que son reconocidos por un huésped como extraños pero cuyo rechazo puede suprimirse mediante una inmunosupresión adecuada.

Ambas capas de la matriz se forman como armazones porosos que comprenden una estructura similar a una esponja con poros interconectados de diferentes tamaños. A este respecto, el término "poroso" se refiere a una estructura que comprende poros, es decir, cavidades o regiones vacías. Estos poros pueden tener una forma redonda y/o una forma angular en una sección bidimensional y/o una forma inclinada cuando se ven tridimensionalmente. La forma de los poros también puede caracterizarse por extensiones tales que pueden compararse con la forma de las células nerviosas. Aunque en general, el término "poros" también se refiere a cavidades formadas por filamentos que encierran una región vacía, los poros en el sentido de la presente invención son cavidades formadas en una estructura similar a una esponja. De este modo, las cavidades están encerradas por paredes, como en las esponjas naturales o los corales. Al menos algunos de los poros o cavidades están interconectados, lo que significa que las paredes de los poros entre dos poros adyacentes pueden comprender orificios, formando una conexión entre los citados poros adyacentes. Esto contrasta con una estructura de malla tejida. Al menos algunos de los poros están interconectados de esta manera, de forma que dividen el espacio en una red intersticial conectada fluidicamente. De este modo, las células pueden propagarse a través de la estructura de la matriz. A este respecto, se debe hacer notar que los poros formados dentro de la capa superior y los formados dentro de la capa inferior pueden ser estructuralmente distintos unos de los otros, por ejemplo, con respecto a su forma, tamaño y/o interconectividad.

Un elemento clave de la presente invención es que ambas capas son biodegradables y se presentan en forma de armazones porosos, en los que la capa superior es hidrófila, con un ángulo de contacto con el agua inferior a 75°, preferiblemente inferior a 60°, y la capa inferior es hidrófoba, con un ángulo de contacto con el agua superior a 90°.

El término "ángulo de contacto", tal como se utiliza en el contexto de la presente solicitud, se refiere al ángulo de contacto del agua sobre una superficie, es decir, al ángulo formado en la interfaz en la que el agua se encuentra con la superficie. De este modo, el "agua" utilizada para la medición del ángulo de contacto se refiere al agua pura, concretamente al agua ultrapura. En particular, la medición del ángulo de contacto se lleva a cabo por el procedimiento de la gota sésil (por ejemplo, mediante un dispositivo del tipo EasyDrop DSA20E, Krüss GmbH) utilizando un tamaño de gota de 0,3 o 0,1 µl. Los ángulos de contacto se calculan generalmente ajustando una función de segmento circular al contorno de la gota colocada sobre la superficie (procedimiento "Ajuste de Círculo").

El término "hidrófilo" o "hidrofilia" utilizado en el contexto de la presente invención se refiere a un ángulo de contacto con el agua de un área superficial de la matriz inferior a 75°.

Por otro lado, el término "hidrófobo" o hidrofobicidad se entenderá como un sustrato que tiene una superficie con un ángulo de contacto con el agua superior a 90°. Con respecto a la capa inferior hidrófoba de la matriz de la invención, tiene preferentemente un ángulo de contacto con el agua superior a 120°. Las propiedades hidrófobas suelen ser un problema con los polímeros sintéticos, como el PLA; el PGA y el PLGA, y a menudo son incrementadas con muchos procedimientos de postprocesado, tales como el tratamiento UV.

En particular, la capa superior de la matriz de la invención es hidrófila a pesar de comprender los polímeros sintéticos biodegradables generalmente hidrófobos que se han mencionado más arriba. Las propiedades hidrófilas son importantes para favorecer la penetración y la adhesión celular.

Se ha descubierto que, gracias al primer material polimérico que comprende PLA como componente principal, las propiedades hidrófilas de la capa superior pueden mejorarse mediante ciertos procedimientos de postratamiento, en particular un paso de tratamiento con plasma a baja temperatura y baja presión, que se describirá en detalle más adelante. El término "plasma" se refiere generalmente a un gas excitado y radicalizado, es decir, un gas de proceso conductor de la electricidad en el que intervienen electrones e iones. El plasma suele generarse mediante electrodos en una cámara de vacío (la llamada "aproximación plasmática RF"), pero también puede generarse mediante procedimientos capacitivos o inductivos, o radiación de microondas. Más adelante, en la sección de experimentos, se ofrecen más detalles al respecto.

La matriz de la invención proporciona múltiples efectos beneficiosos: Por un lado, se ha observado que las propiedades hidrófilas de la capa superior de la matriz favorecen el crecimiento tisular de, por ejemplo, células peritoneales, células musculares lisas y fibroblastos de tejidos adyacentes en la herida que se va a cerrar, por ejemplo una hernia, y permite una distribución celular uniforme en la capa superior y a lo largo de ella. Además, la naturaleza porosa de la capa superior proporciona un entorno estimulante de crecimiento para las células que ayudan a construir tejido de matriz extracelular y diversos tipos de fibras de colágeno, formando así una placa cicatrizante que cierra el defecto tisular. En primer lugar, la placa cicatrizante en crecimiento establecerá una conexión firme entre la matriz degradable (y, por tanto, temporal) y los bordes del defecto tisular. En caso de hernia, la placa cicatrizante se formará en toda la matriz para cerrar el hueco dentro de la pared abdominal. Con el tiempo, mientras continúa la degradación de la matriz, el tejido cicatrizante recién formado asumirá gradualmente la función de soporte necesaria creando una cicatrización adicional, evitando así la reapertura de la herida o la formación recurrente de hernias.

Por otro lado, se ha encontrado que las propiedades hidrófobas de la capa inferior de la matriz impiden eficazmente la adhesión de la mayoría de los tipos celulares, en particular las proteínas inflamatorias, o los fluidos hidrófilos a la superficie inferior de la matriz, lo que impide la formación de adherencias tisulares no deseadas. Específicamente, cuando se probó en la reparación de hernias abdominales, las propiedades hidrófobas de la capa inferior de la matriz de la invención impidieron con éxito la infiltración de líquido peritoneal u otros fluidos corporales en la matriz y minimizaron la formación de adherencias tisulares no deseadas entre la reparación de la hernia y las estructuras intra - abdominales, en particular el intestino delgado.

En resumen, la matriz de la presente invención proporciona un cierre temporal del defecto del tejido blando - por ejemplo una hernia abdominal - y tiene los siguientes beneficios:

- Por un lado, la capa superior hidrófila porosa que recubre la hernia favorece el crecimiento y la proliferación de células, tales como células musculares y fibroblastos, que formarán nuevo tejido cicatrizante asumiendo la función de soporte que disminuye continuamente, de la matriz. Al final, tras la degradación completa de la matriz (es decir, cuando se hayan absorbido los componentes poliméricos de la matriz), no quedará ningún material extraño permanente dentro del cuerpo del paciente.
- Por otra parte, las propiedades hidrófobas de la capa inferior de la matriz impiden la adhesión de células inflamatorias, fibrina o residuos a la matriz desde el lado intraperitoneal (es decir, el lado de la matriz que está orientado hacia la cavidad abdominal en dirección opuesta a la hernia), de modo que se evita la inflamación y la formación de tejido adhesivo entre la matriz o la placa cicatrizante recién formada y los tejidos abdominales subyacentes.

Aunque es particularmente útil en la reparación de hernias, la matriz de la invención puede ser usada para ayudar al proceso de curación tras una intervención quirúrgica en general. Por ejemplo, si se realiza una cirugía abdominal y hay inflamación intraabdominal, es importante proporcionar una barrera entre el tejido intraabdominal inflamado y los tejidos suprayacentes que se han cortado para acceder a la zona quirúrgica, independientemente del tamaño de la herida, por ejemplo, aunque sólo se realice una pequeña incisión en un enfoque mínimamente invasivo. Por lo tanto, la capa hidrófoba puede proporcionar una barrera de este tipo y la capa hidrófila puede favorecer el proceso de curación de las heridas quirúrgicas.

Otra ventaja de la matriz de la invención es que ambas capas son porosas, lo que proporciona la opción de tener agentes farmacológicamente activos - tales como factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor de crecimiento transformante beta, factor de angiogénesis, antibióticos, antifúngicos, espermicidas, hormonas, enzimas y/o inhibidores enzimáticos - incorporados a las capas, preferentemente a la capa superior, para hacer llegar estos agentes al lugar de la herida y afectar positivamente al crecimiento celular, como colágeno de tipos IV y V, fibronectina, laminina, ácido hialurónico y proteoglicanos, en la zona de la capa superior y adyacentes a ella.

Para facilitar la adhesión y el crecimiento celular en toda la capa superior, se prefiere que toda la estructura de armazón de la capa superior tenga una superficie hidrófila, es decir, una superficie que tenga un ángulo de contacto con el agua inferior a 75°. Tales propiedades hidrófilas se han conseguido sometiendo la matriz a tratamiento con plasma a una temperatura inferior a 50°C y preferentemente a baja presión dentro del rango o en el rango de 10^{-2} a 10^{-6} bar, preferentemente dentro del rango de 0,1 a 1,0 mbar.

Puesto que el aumento de la hidrofiliidad ha demostrado correlacionarse con una mejor adhesión y proliferación celular, la capa superior de la matriz tiene preferiblemente un ángulo de contacto con el agua inferior a 60°, más preferiblemente inferior a 45° e incluso más preferiblemente inferior a 25°. Lo más preferible es que el ángulo de contacto con el agua de la superficie hidrófila de la capa superior de la matriz esté comprendido entre 0° y 10°, lo que significa que la capa superior es "superhidrófila".

La capa superior y la inferior pueden proporcionarse como una estructura de una entidad, es decir, en la que las dos capas están formadas integralmente o firmemente conectadas una a la otra en múltiples posiciones. Alternativamente, las dos capas también pueden proporcionarse como dos estructuras individuales separadas una de la otra. Un ejemplo sería que tanto la capa superior como la capa inferior se proporcionasen en forma de lámina y estuvieran simplemente apiladas flojamente una encima de la otra.

En una realización particularmente preferida, las composiciones materiales de las dos capas difieren una de la otra. La diferencia puede ser con respecto al tipo de polímero y/o al contenido de un polímero específico en el material polimérico. Por ejemplo, ambas capas pueden estar formadas por el mismo tipo de polímeros, pero con diferentes proporciones de polímeros. Alternativamente, la capa superior y la capa inferior pueden diferir con respecto al tipo de polímeros presentes en el material polimérico.

En una realización preferida, el primer material polimérico de la capa superior consiste en al menos un 70% de PL. (En particular, el término "PLA" engloba todas las formas quirales de PLA, es decir, PLLA, PDLA y sus mezclas (copolímeros)) Esto significa que la capa superior puede estar formada enteramente de PLA o puede consistir en un 70% o más de PLA y un 30% o menos de al menos un polímero diferente adicional, por ejemplo PLG. Si está presente al menos un polímero adicional, el PLA y el otro polímero o polímeros pueden formar un copolímero o la capa superior puede proporcionarse como dos componentes separados, por ejemplo, una estructura básica de PLA con un revestimiento del otro polímero o polímeros. Se comprobó que el PLA tiene una buena resistencia a la tracción y un módulo elevado. Además, se descubrió que el PLA era beneficioso para conseguir y mantener las propiedades hidrófilas. Más concretamente, se descubrió que para las estructuras porosas hechas de un material con un alto contenido de PLA, por ejemplo, si el primer polímero consiste en al menos un 70% de PLA, la hidrofiliidad de la superficie no sólo se podía mejorar significativamente mediante un tratamiento con plasma como el que se describe en la presente memoria descriptiva, sino que la hidrofiliidad también podía mantenerse durante un tiempo prolongado. De hecho, la hidrofiliidad también podría mantenerse después de esterilizar la matriz con peróxido de hidrógeno (como también se describirá más adelante). Gracias a sus propiedades hidrófilas, la capa superior facilita la adhesión de las células a la matriz y su crecimiento en ella.

Sin embargo, el PLA puro tiene el inconveniente de ser menos estable, es decir, menos resistente a la deformación, que, por ejemplo, el PGA. No obstante, puesto que la capa inferior puede utilizarse para proporcionar estabilidad adicional a la matriz, la capa superior también puede consistir esencialmente en PLA. Un ejemplo específico de un material PLA preferido es el poli (L - lactida) que está disponible comercialmente en Sigma Corporation (PLLA número de catálogo P1566) con un peso molecular de 85.000 - 160.000 Da. Una alternativa adecuada es el PLLA de Durect Corporation (Lactel® número de catálogo B6002 - 2).

Como se ha mencionado, el material polimérico de la capa superior puede estar basado en PLA, pero combinado con uno o más polímeros para aumentar la estabilidad de la capa superior. Un polímero adicional preferido es el

PGA. Los copolímeros de PLA y PGA - denominados "poli - lactida - ácido co - glicólico" (abreviados como PLGA o PLG) - pueden ser adquiridos en diferentes proporciones de PLA/PGA con propiedades físicas bien definidas. Al variar la proporción de copolímero de PLA y PGA, los distintos copolímeros de PLGA ofrecen un amplio espectro de flexibilidades y tasas de degradación variables, desde unos pocos días hasta años.

- 5 En una realización preferida, el segundo material polimérico de la capa inferior de la matriz consiste preferentemente en poli (ácido glicólico - ácido láctico) [PLGA]. En general, cuanto mayor sea la proporción de PGA en la composición de PLGA, mayor será la estabilidad del polímero. Además, cuanto mayor es el contenido de PGA en el segundo material polimérico, mayor es la hidrofobicidad de la capa inferior, incluso después de un tratamiento con plasma que se utiliza para aumentar la hidrofiliidad de la capa superior. De nuevo, la capa inferior proporcionará generalmente estabilidad adicional a la matriz, mientras que la capa superior proporciona un entorno hidrófilo y favorable a las células que aumenta la tasa de supervivencia y proliferación de las células sobre y dentro de la capa superior. De esta manera, el segundo material polimérico de la capa inferior tendrá generalmente un mayor contenido de PGA que el primer material polimérico de la capa superior (ya que el primer material polimérico de la capa superior tiene un mayor contenido de PLA que el segundo material polimérico de la capa inferior).
- 10
- 15 En una realización, ambas capas consisten en PLGA, pero con diferentes proporciones de PLA a PGA. Un material polimérico preferido para la capa superior es una mezcla 85:15 de poli (ácido L - láctico) (PLLA) y PGA, es decir, una mezcla polimérica con un contenido de ácido láctico (PLA) de aproximadamente 85 mol% y un contenido de ácido glicólico (PGA) de aproximadamente 15 mol%. Dicha mezcla 85:15 puede adquirirse, por ejemplo, en Evonik Industries AG (Essen, Alemania) o de la empresa Durect (Cupertino, CA, EE.UU.) bajo la marca registrada RESOMER® RG 858 o LACTEL® Absorbable Polymers. La capa inferior de poli (D,L - lactida - co - glicolida) puede ser una mezcla 50:50 de PLLA y PLG, por ejemplo RESOMER® RG 502. Otras mezclas de polímeros preferidas para la capa superior y/o inferior son poli (D,L - lactida - co - glicolida) 65:35, por ejemplo RESOMER® RG 653; poli (D,L - lactida - co - glicolida) 75:25, por ejemplo RESOMER® RG 752; poli (D,L - lactida - co - glicolida) (elegidos siempre de forma que el contenido en PLA del primer material polimérico sea superior al contenido en PLA del segundo material polimérico).
- 20
- 25

Los procedimientos de preparación de mallas porosas a partir de los polímeros sintéticos que se han mencionado más arriba son bien conocidos en la técnica. Una posibilidad es el uso de una técnica de lixiviación salina, como se describe, por ejemplo, en el documento EP 2256155.

- 30 Se prefiere que la capa superior comprenda o esté cubierta al menos parcialmente con al menos un polímero natural seleccionado del grupo que consiste en colágeno, gelatina, laminina, fibrinógeno, albúmina, quitina, quitosano, agarosa, ácido hialurónico alginato y mezclas de los mismos, siendo preferible el colágeno. El polímero natural proporciona a la capa superior estabilidad adicional, hidrofiliidad y facilita la proliferación celular. Preferiblemente, el armazón poroso de la capa superior está recubierto o cubierto con el polímero natural, de manera que la estructura porosa subyacente de la capa superior no se ve modificada por el recubrimiento. Más concretamente, se prefiere que el polímero natural cubra la superficie de la estructura esponjosa sin formar estructuras tridimensionales adicionales dentro de los poros de la estructura esponjosa de la capa superior. Esto garantiza que el recubrimiento no afecte negativamente a la capacidad de las células para penetrar y extenderse dentro de la capa superior de la matriz.
- 35

- En una realización particularmente preferida, el segundo material polimérico de la capa inferior consiste esencialmente en PLGA o PGA y el primer material polimérico de la capa superior de la matriz consiste esencialmente en PLA solo (que puede estar cubierto con un polímero natural seleccionado entre los que se han mencionado en el párrafo anterior). De los polímeros naturales mencionados, el colágeno es el más preferido. Esto se debe a que el colágeno es una biomolécula de la matriz extracelular (MEC) y el principal componente de la piel y los huesos. Gracias a su arquitectura nanofibrosa, es especialmente eficaz para promover la adhesión celular, el crecimiento y la función diferenciada en cultivos de tejidos. Sin embargo, también se ha observado que la presencia de colágeno en el primer material polimérico mejora especialmente las propiedades hidrófilas de la capa superior de la matriz.
- 40
- 45

- De manera especial, el término "colágeno", tal como se utiliza en el contexto de la presente invención, abarca colágenos derivados naturalmente y colágenos producidos sintéticamente, así como sustancias derivadas del colágeno, tales como la gelatina, que es una forma hidrolizada de colágeno. Además, el término "colágeno" incluye también todos los tipos de colágeno. Por ejemplo, el polímero natural puede incluir sólo un tipo específico de colágeno, por ejemplo el tipo I, o puede consistir en una mezcla de tipos de colágeno, por ejemplo una mezcla de colágeno tipo I y colágeno tipo IV. En este último caso, se da preferencia a la mezcla que contiene las proteínas en porcentajes aproximadamente iguales en peso. El colágeno de tipo I es el preferido, ya que es uno de los principales componentes de los vasos sanguíneos naturales y proporciona a la estructura secundaria sitios de fijación celular, así como resistencia a la tracción. Además, es uno de los principales componentes de los vasos sanguíneos naturales y proporciona un lugar de fijación natural para las células implicadas en el proceso de cicatrización de heridas. Por último, pero no por ello menos importante, también se ha demostrado que los productos de degradación del colágeno de tipo I a III inducen una atracción quimiotáctica de los fibroblastos humanos, lo que resulta especialmente beneficioso para el uso previsto de la matriz de la invención en la reparación quirúrgica de tejidos blandos.
- 50
- 55

En una realización preferida, al menos una de las capas superior e inferior, preferiblemente ambas, tiene / tienen una forma de lámina plana y es / son deformables elásticamente para permitir su plegado o enrollado. En particular, se prefiere que toda la matriz sea deformable elásticamente, de modo que pueda doblarse o enrollarse y pueda volver a su forma original. Esto permite la inserción de la matriz a través de un trocar en un procedimiento laparoscópico, por ejemplo, permitiendo una inserción IPOM de la matriz.

En general, cada capa tiene preferiblemente un grosor dentro del rango de al menos 0,1 mm a 20 mm, más preferiblemente de aproximadamente 1 mm a aproximadamente 10 mm, incluso más preferiblemente de aproximadamente 1 mm a aproximadamente 3 mm. No hace falta decir que las dos capas también pueden tener grosores diferentes.

Si se proporciona en forma de lámina, la forma exterior (vista desde arriba o en sección longitudinal) de la matriz puede ser de cualquier tipo, por ejemplo rectangular, cuadrada, circular, ovalada, etc., y también puede cortarse para adaptarse a la forma del defecto de tejido blando que se va a reparar. Preferiblemente, la forma exterior de la sección transversal es circular u ovalada para evitar bordes afilados.

Se prefiere además que las capas superior e inferior - y preferiblemente toda la matriz - tengan una porosidad de al menos el 80%, preferiblemente de al menos el 85%, más preferiblemente de al menos el 90%. Esta porosidad garantiza que los nutrientes puedan difundirse a través de la matriz para proporcionar un entorno favorable a las células en la capa superior hidrófila que favorece la proliferación y el desarrollo celular. Además, la estructura porosa permite la incorporación de factores de crecimiento u otras moléculas estimuladoras del crecimiento celular en la matriz, en particular en la capa superior.

En lo que respecta al tiempo de degradación de la matriz dentro del cuerpo - que normalmente ocurrirá por medio de la bioabsorción de sus componentes - se prefiere que la capa superior tenga una tasa de degradación más rápida que la capa inferior. En particular, el tiempo de degradación de la capa superior en el cuerpo preferiblemente va de la mano de la formación de tejido cicatrizante que cierra de forma segura el defecto de tejido blando cuando la matriz se ha degradado. En particular, en la reparación de hernias, es preferible que la capa inferior siga proporcionando un soporte adicional cuando la capa superior se haya degradado por completo, ya que así se evita que la hernia anterior vuelva a abrirse hasta que la placa cicatrizante que se forma sobre y dentro de la capa superior en degradación sea lo suficientemente fuerte como para soportar la presión abdominal. Además, la hidrofobicidad de la capa inferior ayuda a establecer una barrera física entre el tejido cicatrizante en formación y los órganos abdominales subyacentes. Por lo tanto, durante los primeros meses, cuando ese crecimiento celular es más prominente, la formación de adherencias entre el nuevo tejido cicatrizante y los órganos intra - abdominales se evita eficazmente gracias a las propiedades hidrófobas de la capa inferior. En el momento en que se complete la formación de una placa cicatrizante estable que cubra la antigua hernia, la capa inferior continuará degradándose, de tal forma que, por lo general, después de 12 a 24 meses tras la implantación de la matriz, no quedará ningún material extraño dentro del cuerpo.

En una realización preferida, la matriz tiene un tiempo de degradación total en un organismo vivo de menos de 24 meses, teniendo la capa superior un tiempo de degradación preferido de menos de 6 meses, preferiblemente menos de 4 meses, y la capa inferior un tiempo de degradación preferido de al menos 4 meses, preferiblemente entre 4 y 24 meses. De esta manera, la capa inferior proporcionará una función de soporte adicional durante los primeros 4 a 12 meses. Al cabo de 24 meses, la capa inferior también se habrá degradado más o menos completamente.

En una realización específica, se prefiere que el tiempo de degradación de la capa superior en el organismo vivo esté comprendido entre 1 y 4 meses, preferiblemente unos 3 meses. Para la capa inferior, en cambio, se prefiere que el tiempo de degradación en el organismo vivo esté comprendido entre 6 y 12 meses.

Otra ventaja de la matriz de la invención es que permite la incorporación de agentes en la matriz, en particular en la capa superior, que posteriormente se suministran al defecto de tejido blando. Los agentes preferidos son el colágeno de tipo IV y V, la fibronectina, la laminina, el ácido hialurónico y los proteoglicanos. Del mismo modo, también pueden incorporarse a la matriz agentes farmacológicamente activos como factores de crecimiento, antibióticos, antifúngicos, espermicidas, hormonas, enzimas y/o inhibidores enzimáticos.

Para promover la formación de tejido cicatrizante en y alrededor del área de la capa superior, se prefiere que la capa superior incluya además factores de crecimiento. Los factores de crecimiento suelen actuar como moléculas de señalización entre las células y a menudo promueven la diferenciación y maduración celular. Por ejemplo, el factor de crecimiento epidérmico (EGF) potencia la diferenciación osteogénica, mientras que los factores de crecimiento de fibroblastos (FGF) y los factores de crecimiento endotelial vascular (VEGF) estimulan la diferenciación de los vasos sanguíneos (angiogénesis). En vista del uso de la matriz en la reparación de tejidos blandos, la capa superior incluye preferentemente al menos un factor de crecimiento seleccionado del grupo formado por interleucinas, factor de crecimiento de fibroblastos ácido, factor de crecimiento de fibroblastos básico (b - FGF), factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento similar a la insulina, proteína de unión al factor de crecimiento similar a la insulina, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento transformante alfa, factor de crecimiento transformante beta, VEGF y factor de crecimiento de hepatocitos (HGF). Estos factores de crecimiento son importantes para regular la proliferación y diferenciación celular, la síntesis de proteínas y la remodelación de la MEC (matriz extrace-

lular). En particular, se ha demostrado que el b - FGF, el PDGF, el VEGF y el HGF aumentan la granulación, la epitelización y la formación de capilares mediante la secreción de citocinas angiogénicas. También se ha demostrado que inhiben la migración de neutrófilos y macrófagos a la localización de la herida mediante la secreción de factores que inhiben la migración y la supresión tanto de IL - 1 α como de IL - 1 β , y que secretan factores antiinflamatorios que previenen la apoptosis y mejoran la cicatrización de la herida.

En una realización particularmente preferida, la capa superior incluye factores de crecimiento que se añaden a la matriz, en particular a la capa superior, en forma de secretoma derivada de células mesenquimales placentarias. El secretoma disponible comercialmente derivado de (o al menos compuesto por) Células Madre de Gelatina de Wharton humana (CM - hWJSC) que se cultivaron en condiciones de hipoxia resultó ser particularmente eficaz para estimular la adhesión celular a la capa superior de la matriz y el crecimiento celular en ella. Este secretoma de células madre puede adquirirse, por ejemplo, en el Instituto de Células Madre y Cáncer (PT. Kalbe Farma Tbk.).

Para la preparación de la matriz, puede utilizarse un procedimiento que incluya los siguientes pasos:

a) preparar una primera mezcla I consistente en partículas de sal y un primer material polimérico disuelto que comprende poli (ácido láctico) [PLA] como componente principal y, opcionalmente, al menos otro polímero seleccionado del grupo formado por poli (ácido glicólico) [PGA], poli (ácido glicólico - ácido láctico) [PLGA] y mezclas de los mismos;

b) extender la primera mezcla I sobre una superficie para formar una primera capa;

c) preparar una segunda mezcla II consistente en partículas de sal y un segundo material polimérico disuelto que comprenda como componente principal al menos un polímero seleccionado del grupo consistente en PGA, PLA, PLGA y mezclas de los mismos, en el que el contenido de PLA en el primer material polimérico sea mayor que en el segundo material polimérico;

d) depositar una capa de la segunda mezcla II del paso c) sobre la primera capa;

e) secar la estructura resultante para obtener una matriz biodegradable de dos capas con una capa superior del primer material polimérico y una capa inferior del segundo material polimérico; y

f) tratamiento con plasma de la matriz con un plasma de gas ionizado a una temperatura inferior a 50°C.

Se comprobó que el tratamiento con plasma aumentaba las propiedades hidrófilas de la superficie de la capa superior, sin tener efectos perjudiciales sobre la estabilidad o la integridad estructural de la matriz. Por otra parte, se observó que el tratamiento con plasma de las estructuras de PGA no mejoraba la hidrofilia. Debido al mayor contenido de PLA en la capa superior en comparación con la inferior, el tratamiento con plasma fue particularmente eficaz para mejorar y también mantener las propiedades hidrófilas de la capa superior, pero no, o sólo en un pequeño grado, de la capa inferior.

El plasma de gas ionizado utilizado para el tratamiento con plasma se selecciona preferentemente del grupo formado por helio, argón, nitrógeno, neón, silano, hidrógeno, oxígeno y mezclas de los mismos. Los gases de tratamiento preferidos son el hidrógeno, el oxígeno y el nitrógeno, en particular el oxígeno.

Más específicamente, el tratamiento con plasma implica preferiblemente un tratamiento con plasma a baja temperatura y baja presión, en el que la malla portadora está expuesta a un plasma de gas ionizado a i) una temperatura inferior a 50°C, preferiblemente inferior a 40°C, ii) durante al menos 2 minutos, más preferiblemente de 5 a 20 minutos, y iii) a una presión A22266WOEP/07.04.2022 en el rango de 10⁻² a 10⁻⁶ bar, preferiblemente a una presión en el rango de 0,1 a 1,0 mbar.

El término "plasma" por lo tanto se refiere generalmente a un gas excitado y radicalizado, es decir, un gas de proceso conductor de la electricidad en el que intervienen electrones e iones. El plasma suele generarse mediante electrodos en una cámara de vacío (la llamada "aproximación plasmática RF"), pero también puede generarse mediante procedimientos capacitivos o inductivos, o radiación de microondas.

En lugar de los pasos anteriores a) a e), la matriz de la presente invención también puede fabricarse mediante impresión 3D (no reivindicada), electrohilado (no reivindicado) y otros procedimientos (no reivindicados) conocidos en la técnica para la preparación de armazones poliméricos.

El procedimiento puede incluir además un paso en el que el armazón poroso de la capa superior formado por el primer material polimérico se cubre con un polímero natural seleccionado del grupo de colágeno, gelatina, laminina, fibrinógeno, albúmina, quitina, quitosano, agarosa, ácido hialurónico alginato y mezclas de los mismos, preferentemente colágeno. Este paso - si existe - se realiza preferentemente antes del paso de tratamiento con plasma f).

En vista de su uso posterior como implante, la matriz de la presente invención es entonces (es decir, después del paso f)) preferiblemente esterilizada. Para ello, se utiliza preferentemente una técnica de esterilización especial desarrollada con este fin. Esta técnica de esterilización permite esterilizar tejidos sensibles al calor y/o a los rayos UV, en particular armazones poliméricos, por lo que no se limita a la matriz especial que se ha descrito más arriba, sino que es aplicable a todo tipo de artículos (sensibles al calor) que deban esterilizarse.

Hoy en día no hay duda de que la esterilización es esencial para casi cualquier dispositivo y artículo que se utilice en el campo médico, como instrumentos, todo tipo de implantes y cualquier elemento auxiliar quirúrgico. En teoría, existen numerosas técnicas de esterilización, pero no todas son aplicables a todos los sustratos. Los sustratos metálicos, tales como un instrumento metálico o un implante, por ejemplo, pueden someterse a esterilización térmica mediante vapor. Esta técnica se realiza normalmente en un esterilizador de vapor (también denominado autoclave) utilizando vapor que suele tener una temperatura superior a 120°C bajo presión. Sin embargo, la esterilización por calor no es adecuada si el artículo a esterilizar es sensible al calor. Además, el uso de vapor es inadecuado para componentes biodegradables y, por tanto, hasta cierto punto solubles en agua. Por lo tanto, los sustratos poliméricos biodegradables que comprenden un polímero natural sensible al calor, tal como el colágeno, por ejemplo, no pueden esterilizarse con vapor caliente sin dañar la estructura molecular del sustrato.

Como alternativa, un sustrato puede ser sometido a esterilización por gas de óxido de etileno o esterilización por plasma. Sin embargo, en la medida en que se utiliza óxido de etileno, la técnica presenta el inconveniente adicional de requerir medidas de seguridad relativamente estrictas debido a la elevada toxicidad del agente esterilizante.

Otras técnicas adicionales de esterilización incluyen la esterilización por radiación, en particular la esterilización gamma o la esterilización por rayos X. Por otra parte, estas técnicas tienen el gran inconveniente de que las características hidrófilas de la superficie del sustrato (en este caso, la capa superior) suelen perderse o, al menos, verse sustancialmente mermadas debido al tratamiento de esterilización.

Por lo tanto, para esterilizar una matriz de dos capas de acuerdo con la presente invención que se ha descrito más arriba, se requiere un procedimiento que evite el uso de calor, es decir, temperaturas superiores a 50°C, para preservar la estructura polimérica tridimensional de la matriz. Además, el procedimiento debe permitir preservar la alta hidrofiliidad de la capa superior durante y después del procedimiento de esterilización.

Teniendo en cuenta lo anterior, también ha sido un objeto adicional de la presente invención proporcionar un proceso sencillo que permita la esterilización completa de la matriz sin comprometer la hidrofiliidad de la capa superior.

Se ha encontrado que el siguiente procedimiento cumple todos estos requisitos y, por lo tanto, es especialmente adecuado para la esterilización de sustratos sensibles, como la matriz de dos capas de la presente invención. El procedimiento consta de los siguientes pasos

I. proporcionar una matriz de dos capas como la descrita en la presente memoria descriptiva, y

II. someter la matriz a un entorno que contenga peróxido de hidrógeno a una temperatura inferior a 50°C, preferentemente inferior a 40°C; a una presión reducida comprendida entre 10^{-6} y 10^{-2} bares; y durante al menos 2 minutos.

El sorprendente hallazgo de que esta esterilización con peróxido de hidrógeno a baja temperatura consigue un artículo biodegradable estéril e hidrófilo abre la posibilidad de un proceso sencillo para esterilizar materiales sensibles sin afectar negativamente a su integridad estructural y propiedades hidrófilas. Como ventaja adicional, el nuevo procedimiento de esterilización es muy sencillo y directo, ya que no requiere laboriosos pasos de preparación.

El entorno que contiene peróxido de hidrógeno puede proporcionarse mediante tratamiento con plasma de H_2O_2 o colocando el sustrato a esterilizar en una cámara de vacío, junto con una fuente de peróxido de hidrógeno (generalmente líquido). El tratamiento con plasma consiste preferentemente en un tratamiento con plasma a baja presión, en el que la matriz se expone a un plasma de gas ionizado a una presión comprendida entre 10^{-2} y 10^{-6} bares, preferentemente entre 0,1 y 20,0 mbar, y a una temperatura inferior a 50°C, preferentemente inferior a 40°C, durante al menos 2 minutos. Alternativamente, la matriz puede colocarse dentro de una cámara de vacío y, al aplicar una presión suficientemente baja para evaporar el peróxido de hidrógeno, éste se evapora y se crea una atmósfera que contiene peróxido de hidrógeno. Las presiones (negativas) especialmente preferidas están comprendidas entre 0,1 y 20,0 mbar, por ejemplo entre 6 y 12 mbar.

El tiempo de esterilización depende en gran medida de la presión dentro de la cámara, de la temperatura de tratamiento y de la concentración de la solución de H_2O_2 . Preferiblemente, la solución de H_2O_2 comprende H_2O_2 en una cantidad de alrededor del 30% en volumen o menos. Los tiempos de tratamiento preferidos son de al menos unos minutos, por ejemplo de 2 a 30 minutos, alternativamente al menos una hora. Si se aplican presiones "más altas", en particular por encima o alrededor de 10 mbar, y/o temperaturas bajas, por ejemplo inferiores a 40°C, o si la concentración de H_2O_2 es inferior al 30%, por ejemplo 20 - 25%, se prefieren tiempos de tratamiento de varias horas, por ejemplo entre 10 y 12 horas.

Como se ha mencionado inicialmente, la matriz de dos capas de la presente invención es particularmente útil para prevenir adherencias intra - abdominales, por ejemplo en el campo de la reparación de hernias y para prevenir hernias recurrentes. Por lo tanto, la presente divulgación también se refiere al uso (no reivindicado) de la matriz bicapa de la invención en la reparación quirúrgica de tejidos blandos, en particular en cirugía abdominal, por ejemplo en la reparación de hernias. Específicamente cuando se utiliza para la reparación de hernias el procedimiento divulgado incluye los pasos de

i. proporcionar una matriz biodegradable que tenga una capa superior hidrófila y una capa inferior hidrófoba como se ha descrito en las secciones anteriores;

ii. realizar una incisión a través de la piel y los tejidos abdominales de un paciente para acceder a una hernia en la pared abdominal;

iii. colocar la matriz por encima del defecto, por ejemplo, en la pared abdominal o, alternativamente, por debajo de la capa muscular de la pared abdominal (técnica de subcolocación) o como malla intraperitoneal en colocación (IPOM) por debajo del peritoneo;

iv. cerrar la incisión.

Si se desea, la matriz puede fijarse adicionalmente a los músculos abdominales para evitar la migración.

Las realizaciones preferidas con respecto a la estructura de la matriz y su colocación dentro del cuerpo de un paciente en la reparación de una hernia se ilustran además mediante la figura adjunta, en la que

la figura 1 muestra un dibujo esquemático de una sección a través de un defecto de tejido blando, específicamente una hernia, reparada con la ayuda de una matriz de acuerdo con la presente invención.

El dibujo esquemático de la figura 1 muestra un defecto (hueco) 10 en el tejido muscular 12 que ha sido puentado con una matriz 14 de la presente invención. Específicamente, se proporciona una matriz biodegradable de la presente invención que tiene una capa superior hidrófila porosa 16 y una capa inferior hidrófoba porosa 18. La capa superior hidrófila 16 consiste en poli (ácido láctico) [PLA] y, opcionalmente, colágeno. Tiene un ángulo de contacto con el agua inferior a 10°, por lo que es superhidrófila. La capa inferior 18 de la matriz consiste en poli (ácido glicólico - ácido láctico) [PLGA], por ejemplo Resome® RG 503 H de Sigma Aldrich con un contenido de lactida: glicolida de 50:50, y tiene un ángulo de contacto con el agua superior a 90°. Por tanto, es hidrófoba. Las dos capas están conectadas una a la otra a lo largo de una interfaz común 20 y forman una única unidad matriz de dos capas 14. Las propiedades hidrófilas de la capa superior se obtienen mediante tratamiento con plasma de la matriz con un plasma de gas oxígeno a una temperatura inferior a 40°C y a una presión comprendida entre 0,1 y 1,0 mbar. Este tratamiento con plasma demostró poder proporcionar a la capa superior un alto contenido en PLA con propiedades hidrófilas, mientras que las propiedades hidrófobas de la capa inferior de PLGA no se ven esencialmente alteradas por el tratamiento con plasma.

En la reparación quirúrgica de una hernia, se realiza una incisión a través de la piel 22 y los tejidos abdominales 12 del paciente para acceder a una hernia 10 en la pared abdominal. A continuación, la matriz 14 se coloca por encima del defecto, por ejemplo, la pared abdominal (reparación de hernia inguinal de acuerdo con Lichtenstein) o alternativamente por debajo de la capa muscular de la pared abdominal (técnica de subcolocación) o - como en el caso mostrado en la figura 1 - como una IPOM (malla intraperitoneal colocada) por debajo del peritoneo 24. La capa inferior 18 estará orientada hacia los órganos intra - abdominales, en particular el intestino delgado 26, y la capa superior 16 estará orientada hacia la hernia 10. Si se desea, la matriz 14 puede fijarse adicionalmente a los músculos abdominales 12 y/o al peritoneo 24 para evitar la migración. (Antes de colocar la matriz, el defecto de la pared abdominal también puede cerrarse con puntos de sutura. La matriz se colocará entonces por encima o por debajo del defecto reparado para estabilizar la sutura y ayudar al proceso de cicatrización). A continuación, se cierra la incisión cerrando la piel superpuesta 22 mediante puntos de sutura 28.

Después de la implantación, generalmente se realizarán los siguientes procesos: Como estructura degradable, la matriz proporciona una estructura de soporte temporal para que las células migren a la matriz, en particular a la capa superior de la matriz, desde los tejidos adyacentes y proliferen. Las propiedades hidrófilas de la capa superior frente a la hernia favorecen el crecimiento y la proliferación de células, como células musculares y fibroblastos, que formarán nuevo tejido cicatrizante asumiendo la función de soporte de la matriz, que disminuye continuamente. Por otro lado, las propiedades hidrófobas de la capa inferior hacen lo contrario: impiden que se adhieran células, tales como células inflamatorias, fibrina o residuos, a la matriz desde el lado intraperitoneal, es decir, el lado de la matriz que está orientado en dirección opuesta a la hernia y hacia la cavidad abdominal, de modo que se evita la inflamación y la formación de tejido adhesivo entre la matriz o la placa cicatrizante recién formada y los tejidos abdominales subyacentes.

La capa superior tiene una tasa de degradación más rápida que la capa inferior. La degradación de la capa superior dura entre 3 y 6 meses y va acompañada de la formación de tejido cicatrizante que une de forma segura los bordes

de la antigua hernia con la pared abdominal. En el momento en que la capa superior se ha degradado por completo, la capa inferior sigue proporcionando soporte adicional contra la presión abdominal y también proporciona una barrera física entre el tejido cicatrizante recién formado y los órganos abdominales subyacentes. Por lo tanto, en el momento en que el crecimiento celular es más prominente, la formación de adherencias entre el tejido cicatrizante y los órganos intraabdominales se previene eficazmente gracias a las propiedades hidrófobas de la capa inferior. Además, si hay inflamación intraabdominal, dicha barrera física también separa los tejidos inflamados de la herida quirúrgica. Al cabo de unos 12 meses, cuando se haya completado la formación de una placa cicatrizante estable que cubra la antigua hernia, por lo general la capa inferior también se habrá degradado por completo y no quedará ningún material extraño dentro del cuerpo.

- 10 La matriz se puede colocar simplemente sobre el defecto o fijarse adicionalmente en su lugar mediante puntos de sutura u otras medidas para evitar el desplazamiento de la matriz.

Durante los días y semanas posteriores a la inserción de la matriz, las células de los tejidos adyacentes, en particular las células musculares lisas y los fibroblastos, seguirán proliferando y formando tejido cicatrizante que cierra firmemente la hernia. Dicho tejido cicatrizante cerrará la hernia de forma segura en el momento en que ambas capas de la matriz se hayan degradado por completo.

- 15 Para probar los efectos que se han descrito más arriba, la matriz de la invención se ha probado *in vivo* implantándola en ratas. Concretamente, se reparó una hernia experimental de la pared abdominal en una rata con la ayuda de una matriz de dos capas de acuerdo con la presente invención. En este experimento, la matriz se colocó debajo del peritoneo, como se muestra en la figura 1. Para mantener la matriz implantada en su sitio, se fijó la matriz al tejido muscular mediante unos pocos puntos de sutura antes de cerrar la piel mediante los puntos de sutura. Tras un periodo de cicatrización de seis semanas, se reabrió la zona de implantación. Se comprobó que no se habían formado adherencias entre la matriz y el intestino delgado subyacente. Por otra parte, en una zona que no estaba cubierta por la matriz, se observó la formación de una banda de adherencia desde el borde del hígado hasta la pared abdominal. Por lo tanto, el experimento *in vivo* confirmó que la matriz de la invención previene con éxito la formación de adherencias posquirúrgicas.

En las siguientes secciones, se describirán en detalle ejemplos específicos de formas de preparar la matriz de la invención.

Datos experimentales

Preparación de la matriz

- 30 Partículas de cloruro sódico (NaCl) se molieron con mortero y mazo antes de tamizarlas para obtener partículas de NaCl de 355 a 425 pm. Se introdujeron 9 g de partículas de NaCl en un tubo de centrifugación y se secaron en un desecador. A continuación, las partículas de NaCl se colocaron en un recipiente de aluminio y se vertió sobre las partículas de NaCl una solución de PLLA preparada con 1 g de gránulos de PLLA (lactida 100 de Durect Lactel®) en 5 ml de cloroformo. La solución de PLLA se mezcló con las partículas de NaCl y la mezcla se extendió uniformemente en la bandeja de aluminio para formar una capa plana de PLLA.

Posprocesamiento opcional del colágeno

- Algunas matrices también estaban provistas de un revestimiento de colágeno sobre la capa de PLLA (que posteriormente formará la capa superior). Para ello, la capa de PLLA preparada se secó y se separó del molde de aluminio. A continuación, se vertió una solución de colágeno (Solución de colágeno tipo I; Wako) en una placa de Petri. La concentración de la solución de colágeno se eligió dentro del rango de 0,1 a 5,0 (p/v)%, preferentemente 1% (p/v). La capa de PLLA se sumergió en la solución de colágeno antes de colocarse en otra placa de Petri y congelarse en un ultracongelador a - 80°C durante varias horas antes de la deshidrocongelación (también conocida como liofilización) al vacío de < 5 mbar (a una temperatura entre - 50 °C y - 80 °C) durante al menos 24 h.

- 45 Para formar la capa hidrófoba de PLGA (que posteriormente formará la capa inferior), se colocaron 9,0 g de partículas de NaCl en un segundo recipiente de aluminio y se preparó una solución de PLGA de 1 g de gránulos de PLGA (lactida 25; glicolida 75. de Durect Lactel®) en 5 ml de cloroformo. La solución de PLGA se mezcló con las partículas de NaCl. A continuación, se vertió la mezcla de PLGA/NaCl sobre la capa de PLLA (con o sin recubrimiento de colágeno) proporcionada en el primer molde de aluminio y se extendió uniformemente para formar una matriz con una capa de PLGA sobre la capa de PLLA.

- 50 La matriz de PLLA/PLGA - NaCl se separó de la bandeja de aluminio y se secó en una cámara de vacío a - 0,1 MPa durante 3 - 4 días.

Las matrices secadas resultantes de PLLA/PLGA - NaCl se colocaron en un vaso de precipitados, se sumergieron en ddH₂O (agua desionizada dos veces) y se mantuvieron en un baño de agitación lineal a 25°C (temperatura ambiente), a 60 rpm durante 48 horas para lixiviar/lavar las partículas de NaCl. El agua del vaso de precipitados se

cambiaba cada 1 - 2 horas. Las matrices de PLLA/PLGA de dos capas se sacaron del vaso de precipitados y se secaron en la campana extractora durante la noche.

Las matrices se prepararon con poros de un diámetro comprendido entre 355 y 425 micrómetros.

5 Se descubrió que la capa de PLGA también puede prepararse en primer lugar y la capa de PLLA en un segundo paso.

Tratamiento con plasma de O₂

10 Las matrices - con la capa superior recubierta o no de colágeno - se sometieron además a un tratamiento con plasma utilizando un plasma de gas ionizado, preferentemente seleccionado del grupo que consiste en helio, argón, nitrógeno, neón, silano, hidrógeno, oxígeno y mezclas de los mismos. Preferentemente, se utilizó un tratamiento con plasma de gas de oxígeno ionizado.

15 El tratamiento con plasma se realizó utilizando una máquina de tratamiento con plasma de Diener (Diener electronics; Plasma - Surface - Technology; Ebhausen, Alemania), dentro de una cámara de vacío durante un tiempo de 5 a 20 minutos, preferiblemente de 8 a 15 minutos. Los parámetros de tratamiento se fijaron de la siguiente manera: Presión dentro de la cámara de vacío: 0.40 mbar; potencia: 35 W; flujo de gas oxígeno: 5 sccm (min) - 60 sccm (max).

Se observó que el tratamiento con plasma aumentaba significativamente las propiedades hidrófilas de la capa superior de PLLA - independientemente de la presencia de un revestimiento de colágeno - pero no de la capa de PLGA. Estos últimos permanecieron hidrofóbicos.

Esterilización

20 Con o sin recubrimiento de colágeno en la capa superior, las matrices se esterilizaron posteriormente colocándolas en un medio que contenía H₂O₂ a una temperatura inferior a 40°C. El entorno que contenía H₂O₂ se creó dentro de una cámara de vacío, colocando la matriz en la cámara, junto con un matraz o plato abierto que contenía una solución de H₂O₂ y evacuando posteriormente la cámara para evaporar el H₂O₂. La solución de H₂O₂ comprende H₂O₂ en una cantidad igual o inferior al 30% en volumen. El tiempo de tratamiento depende en gran medida de la presión dentro de la cámara y de la concentración de la solución de H₂O₂. La presión dentro de la cámara es tal que se produce la evaporación del peróxido de hidrógeno. Las presiones (negativas) preferidas están en el rango de 10⁻² a 10⁻⁶ bar, preferiblemente en el rango de 0,1 a 20,0 mbar, por ejemplo 9 mbar. Los tiempos de tratamiento preferidos son de al menos dos minutos, por ejemplo de 2 a 30 minutos. Sin embargo, en particular a presiones superiores a 1 mbar, por ejemplo, alrededor de 10 mbar, y/o temperaturas más bajas (por ejemplo, inferiores a 35°C) y/o baja concentración de peróxido de hidrógeno (por ejemplo, por debajo de 30 % vol.), los tiempos de tratamiento fueron preferentemente superiores a una hora, por ejemplo, de 8 a 10 horas.

Mediciones del ángulo de contacto estático, procedimiento de la gota sésil

35 Se realizaron mediciones del ángulo de contacto para determinar el grado de hidrofiliidad o hidrofobicidad. Normalmente, los ángulos de contacto de las capas superior e inferior de la matriz se determinaban mediante mediciones estáticas del ángulo de contacto, utilizando un ensayo de gota sésil con agua ultrapura (EasyDrop DSA20E, Krüss GmbH). El tamaño de gota para las mediciones del ángulo de contacto se fijó en 0,1 µl. Los ángulos de contacto se calcularon ajustando una función de segmento circular al contorno de la gota colocada sobre la superficie (procedimiento de ajuste circular).

REIVINDICACIONES

- 5 1. Matriz biodegradable (14) para la prevención de adherencias posquirúrgicas, en particular tras la reparación de tejidos blandos después de una intervención quirúrgica abdominal, dentro del cuerpo de un mamífero; comprendiendo la matriz
 - una capa superior (16) hecha de un primer material polimérico biocompatible que comprende poli (ácido láctico) como componente principal y, opcionalmente, al menos otro polímero seleccionado del grupo del poli (ácido glicólico), poli (ácido glicólico - ácido láctico) y mezclas de los mismos; y
 - 10 una capa inferior (18) hecha de un segundo material polimérico biocompatible que comprende como componente principal al menos un polímero seleccionado del grupo que consiste en poli (ácido glicólico), poli (ácido láctico), poli (ácido glicólico - ácido láctico) y mezclas de los mismos;
 - en el que** el contenido de poli (ácido láctico) en el primer material polimérico es mayor que en el segundo material polimérico;
 - 15 ambas capas (16, 18) están formadas como armazones porosos que comprenden una estructura esponjosa con poros interconectados de diferentes tamaños,
 - la capa superior (16) es hidrófila, tiene un ángulo de contacto con el agua inferior a 75° y
 - la capa inferior (18) es hidrófoba y tiene un ángulo de contacto con el agua superior a 90°.
- 20 2. Matriz como se ha reivindicado en la reivindicación 1, en la que la capa superior (16) tiene un ángulo de contacto con el agua inferior a 60°, preferiblemente inferior a 45°, más preferiblemente inferior a 25°, aún más preferiblemente inferior a 15°, más preferiblemente dentro del rango de 0° a 10°.
3. Matriz como se ha reivindicado en la reivindicación 1 o 2, en la que las dos capas (16, 18) están formadas integralmente o firmemente conectadas una a la otra a lo largo de una interfaz común 20.
- 25 4. Matriz como se ha reivindicado en reivindicación 1 o 2, en la que las dos capas (16, 18) se proporcionan como dos estructuras individuales separadas una de la otra.
5. Matriz como se ha reivindicado en una de las reivindicaciones 1 a 4, en la que el primer material polimérico consiste en al menos un 70%, preferiblemente al menos un 80%, de poli (ácido láctico), o consiste esencialmente en poli (ácido láctico).
- 30 6. Matriz como se ha reivindicado en una de las reivindicaciones 1 a 5, en la que al menos una, preferiblemente cada una, de las dos capas (16, 18) tiene forma de lámina plana y es elásticamente deformable para permitir su plegado o enrollado.
- 35 7. Matriz como se ha reivindicado en una de las reivindicaciones 1 a 6, que tiene un tiempo total de degradación en el organismo vivo inferior a 24 meses, teniendo la capa superior un tiempo de degradación preferente inferior a 6 meses, preferentemente inferior a 4 meses, y la capa inferior un tiempo de degradación preferente superior a 4 meses, preferentemente entre 4 y 12 meses.
8. Matriz como se ha reivindicado en una de las reivindicaciones 1 a 7, en la que una de las dos capas (16, 18), preferentemente la capa superior (16), tiene un índice de degradación más rápido que la otra capa.
9. Matriz como se ha reivindicado en una de las reivindicaciones 1 a 8, en la que la capa superior (16) comprende o está cubierta con al menos un polímero natural seleccionado del grupo que consiste en colágeno, gelatina, laminina, fibrinógeno, albúmina, quitina, quitosano, agarosa, ácido hialurónico alginato y mezclas de los mismos, siendo preferible el colágeno.
- 40 10. Procedimiento para preparar una matriz de acuerdo con la reivindicación 1 a 9, mediante
 - a) preparar una primera mezcla I de partículas de sal y un primer material polimérico disuelto que comprende poli (ácido láctico) como componente principal y, opcionalmente, al menos otro polímero seleccionado del grupo formado por poli (ácido glicólico), poli (ácido glicólico - ácido láctico) y mezclas de los mismos;
 - 45 b) extender la primera mezcla I sobre una superficie para formar una primera capa;

- c) preparar una segunda mezcla II de partículas de sal y un segundo material polimérico disuelto que comprenda al menos un polímero seleccionado del grupo que consiste en poli (ácido glicólico), poli (ácido láctico), poli (ácido glicólico - ácido láctico) y mezclas de los mismos, en el que el contenido de poli (ácido láctico) en el primer material polimérico sea mayor que en el segundo material polimérico;
- 5 d) depositar una capa de la segunda mezcla II del paso c) sobre la primera capa del paso b);
- e) secar la estructura resultante para obtener una matriz biodegradable de dos capas (14) con una capa inferior (18) de segundo material polimérico y una capa superior (16) de primer material polimérico; y
- f) tratar con plasma la matriz (14) con un plasma de gas ionizado a una temperatura inferior a 50°C.
- 10 11. Procedimiento como se ha reivindicado en la reivindicación 10, en el que el primer material polimérico consiste en al menos un 70% de poli (ácido láctico).
12. Procedimiento como se ha reivindicado en las reivindicaciones 10 u 11, en el que el tratamiento con plasma se lleva a cabo durante 2 a 30 minutos, preferentemente de 5 a 20 minutos, y a una presión comprendida entre 10^{-2} y 10^{-6} bares, preferentemente entre 0,1 y 1,0 mbar.
- 15 13. Procedimiento como se ha reivindicado en una de las reivindicaciones 10 a 12, que comprende además un paso de recubrimiento de la capa superior (16) de la matriz (14) obtenida en el paso d) con un polímero natural seleccionado del grupo de colágeno, gelatina, laminina, fibrinógeno, albúmina, quitina, quitosano, agarosa, ácido hialurónico alginato y mezclas de los mismos, preferentemente colágeno.
- 20 14. Procedimiento como se ha reivindicado en una de las reivindicaciones 10 a 13, que comprende además un paso g) de esterilización de la matriz resultante (14) tratándola con peróxido de hidrógeno a una temperatura inferior a 50°C.
- 25 15. Procedimiento como se ha reivindicado en la reivindicación 14, en el que el tratamiento con peróxido de hidrógeno en el paso g) se lleva a cabo exponiendo la matriz (14) a un plasma de H_2O_2 o a una atmósfera que contenga H_2O_2 , a presión reducida, preferiblemente en el rango de 10^{-2} a 10^{-6} bares, más preferiblemente en el rango de 0,1 a 20,0 mbar, y durante al menos 2 minutos, preferiblemente de 2 a 30 minutos, o alternativamente durante varias horas.

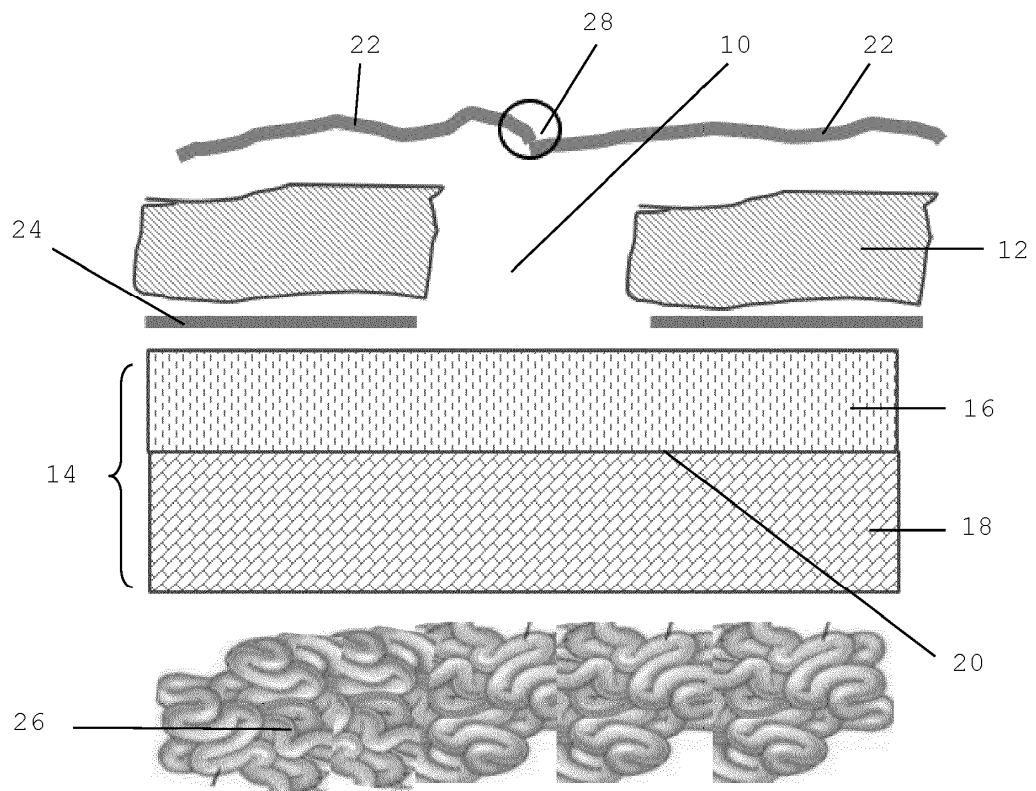


Fig. 1