

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 424 146**

51 Int. Cl.:

**A61B 17/11** (2006.01)

**A61L 27/22** (2006.01)

**A61L 27/50** (2006.01)

**A61L 27/56** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.11.2006 E 06818569 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.07.2013 EP 1948263**

54 Título: **Canal guía de nervios**

30 Prioridad:

**17.11.2005 DE 102005054941**

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

**27.09.2013**

73 Titular/es:

**GELITA AG (100.0%)  
UFERSTRASSE 7  
69412 EBERBACH, DE**

72 Inventor/es:

**AHLERS, MICHAEL;  
SCHLOSSHAUER, BURKHARD;  
DREESMANN, LARS y  
LIETZ, MARTIN**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 424 146 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**

Canal guía de nervios

La invención se refiere a un canal guía de nervios, que comprende un cuerpo moldeado de un material reabsorbible.

5 Los canales guía de nervios del tipo descrito al principio se usan en lesiones del sistema nervioso para unir a lo extremos de nervios dañados y puentear los huecos entre los dos extremos. A este respecto el canal guía de nervios ofrece a las fibras nerviosas (axones) un espacio para crecer y por otra parte ofrece, idealmente, protección frente a la penetración de células de tejido conjuntivo (fibroblastos) que forman cicatrices.

10 A este respecto, los dos extremos del canal guía de nervios recogen los dos cabos de nervio que se generan durante la lesión y puentean los huecos que existen entremedias. La luz del canal guía de nervios que queda entre los cabos de nervio preestablece la dirección para los axones que se regeneran y evita un crecimiento desviado erróneo, mediante lo cual se promueve una regeneración dirigida.

15 Los canales guía de nervios degradables o reabsorbibles se prefieren este respecto con respecto a los no reabsorbibles, dado que después de una reconstrucción de las fibras nerviosas o en su desarrollo se degrada el canal guía de nervios y con ello, a diferencia de los canales guía de nervios no reabsorbibles, se evita una operación necesaria adicional, dado el caso, para la eliminación del mismo, que conlleva en sí, a su vez, un riesgo del daño de las fibras nerviosas. No obstante, en el caso del canal guía de nervios reabsorbible debe poder ajustarse la estabilidad frente a mecanismos de reabsorción, lo que representa un desafío.

El objetivo de la regeneración nerviosa por medio de canales guía de nervios es la regeneración de funciones motoras y sensoriales así como evitar un crecimiento desviado erróneo y una formación dolorosa de neuromas.

20 Hasta el momento, la Medicina Regenerativa sólo puede ofrecer terapias insuficientes para lesiones de las fibras nerviosas del sistema nervioso. Aunque la mayoría de las neuronas adultas conservan en principio la capacidad de regenerar los axones, sin ayuda, en el sistema nervioso periférico, sólo tiene lugar una regeneración funcional limitada y en el sistema nervioso central prácticamente ninguna regeneración.

25 Los motivos para estas limitaciones son, entre otros, la pérdida de contacto con la vía nerviosa original y cicatrizaciones inhibitorias.

Un puenteo operativo de áreas lesionadas/inhibitorias representa en principio una estrategia de terapia satisfactoria, para la que en la práctica, no obstante, hasta el momento, se usan casi exclusivamente trasplantes de nervios autólogos (principalmente nervio sural de la pierna).

30 Las desventajas relacionadas con ello, tales como morbilidad en la región donante y la disponibilidad limitada, han estimulado esencialmente el desarrollo de fibras guía de nervios sintéticas. Las fibras guía de nervios como tubos huecos se desarrollaron en los últimos tiempos a partir de distintos polímeros puramente sintéticos, inertes y reabsorbibles, y componentes biológicos tales como por ejemplo polisacáridos, colágeno o materiales de gelatina específicamente reticulados.

35 En el documento WO 2005/111121 A2 (publicado posteriormente) se dan a conocer canales guía de nervios que comprenden un cuerpo moldeado a base de gelatina reticulada.

Chen y col. (Biomaterials 26 (2005) 3911-3918) describen canales guía de nervios reabsorbibles a base de gelatina, que está reticulada con genipina.

40 El documento EP 1 254 671 A1 da a conocer un instrumento para la regeneración de un tejido u órgano, en particular de nervios, que comprende un soporte y una matriz fina esponjosa en el interior del soporte, que ambos están formados por un material biológicamente degradable o bioabsorbible, y un canal lineal para conducir un tejido u órgano de un organismo vivo, comprendiendo el canal lineal al menos una fibra en el interior del soporte en dirección longitudinal del mismo.

45 El documento EP 0 945 145 A1 da a conocer un tubo flexible de plástico para nervios, que comprende un tubo flexible con recubrimientos de gelatina o colágeno sobre la superficie interior y superficie exterior del tubo flexible, así como un cuerpo de colágeno con espacios huecos en su luz, que atraviesan el tubo flexible esencialmente en paralelo a su eje, estando los espacios huecos cargados con un gel de matriz que contiene colágeno, laminina, heparán sulfato proteoglicanos, entactina y factor de crecimiento.

Es objetivo de la presente invención mejorar adicionalmente el canal guía de nervios descrito al principio para permitir un desarrollo lo menos impedido posible de los axones durante la regeneración.

50 Este objetivo se resuelve de acuerdo con la invención porque el canal guía de nervios mencionado al principio comprende un cuerpo moldeado de un material a base de gelatina, reabsorbible, reticulado, siendo el cuerpo moldeado un cuerpo hueco en forma de túbulo con una pared y una superficie exterior y una superficie interior, que define una luz, comprendiendo el canal guía de nervios una capa semipermeable, que rodea la luz, y en el que

(i) el grado de reticulación del canal guía de nervios o sus partes, en particular su cuerpo moldeado, en un extremo del canal guía de nervios es mayor que en el otro extremo y disminuye en varias etapas o de manera esencialmente continua en dirección hacia este otro extremo; o

5 (ii) el grado de reticulación del canal guía de nervios o sus partes, en particular su cuerpo moldeado, en sus extremos es menor que en la zona entre los extremos.

A partir de materiales a base de gelatina pueden formarse canales guía de nervios que pueden esterilizarse adecuadamente como implantes, que también pueden almacenarse durante tiempo más largo, en particular también a temperatura ambiente. También, tales canales guía de nervios pueden adaptarse también en el quirófano a la longitud y a otras cuestiones.

10 Los materiales a base de gelatina puede producirse también de manera definida y de manera reproducible en su composición así como las propiedades de reabsorción. Además, tales materiales resultan calculables con respecto a sus reacciones fisiológicas. Así mismo, los materiales presentan generalmente la biocompatibilidad necesaria y no son ni tóxicos, ni infecciosos ni proinflamatorios.

15 Además, los materiales a base de gelatina son también adecuados para producir canales guía de nervios, que satisfacen los requisitos mecánicos de un implante. Al mismo tiempo, los materiales pueden formularse de modo que presenten una flexibilidad suficiente durante el manejo por los cirujanos durante la operación como también de manera postoperatoria como implante utilizado, de modo que se evita una compresión de los nervios y se permite una adaptación durante los movimientos de partes del cuerpo del paciente tratado.

20 Por otro lado, con los materiales a base de gelatina usados de acuerdo con la invención para los cuerpos moldeados puede garantizarse una estabilidad de forma suficiente, que se impide una caída del implante utilizado.

Además, pueden producirse canales guía de nervios suficientemente resistentes al desgarro, que permiten una costura del implante a los cabos de nervio que se generan durante la lesión.

25 De acuerdo con la presente invención se diseña de manera semipermeable una capa del canal guía de nervios, que puede ser parte del cuerpo moldeado. Esto significa que es posible una difusión de nutrientes y de gas entre luz y el entorno del canal guía de nervios en dirección radial de la manera menos impedida posible, mientras que, por otro lado, se evita una difusión de sustancias no deseadas, en particular también la penetración de células, tales como por ejemplo fibroblastos, del tejido circundante.

Para la realización de esta función protectora de la capa semipermeable se ofrecen distintas posibilidades que pueden combinarse también parcialmente entre sí.

30 De este modo, la capa semipermeable del canal guía de nervios puede presentar por ejemplo poros, que de media son menores de aproximadamente 0,5  $\mu\text{m}$ . A través de tales denominados nanoporos no pueden pasar células, mientras que, por otro lado, una difusión de nutrientes y de gas a través de tales poros puede producirse de manera casi no impedida.

35 Como alternativa puede usarse para ello una estructura de gel que, por un lado, permita igual que antes la difusión de nutrientes y de gas, y por otro lado, actúe como barrera celular.

En otra forma de realización el canal guía de nervios presenta como capa semipermeable una capa de barrera, que es esencialmente impenetrable para especies con carga positiva, en particular también células, en particular fibroblastos, dado que las células portan con frecuencia cargas positivas en su superficie y por esto se adhieren escasamente sobre superficies con carga positiva.

40 Otra forma de realización presenta una capa semipermeable que presenta una hidrofilia extremadamente alta y también en este caso se observa que se impide considerablemente una difusión celular a través de una capa de este tipo.

Un efecto similar puede conseguirse también con una capa que es hidrófoba. También en este caso se reduce claramente la migración celular.

45 Las capas hidrófobas pueden estar formadas por ejemplo por un material que comprende una gelatina modificada con ésteres de ácido graso. Un ejemplo de ello es la gelatina dodecenil-succinada.

Preferentemente, en el caso de tales materiales la gelatina estará modificada con ácidos grasos en los grupos amino de los grupos lisina, en particular en del 10 al 80 % de los grupos lisina.

50 Por último, como variante adicional se encuentra disponible, que el canal guía de nervios o su cuerpo moldeado presentan sobre la superficie exterior proteínas de repulsión inmovilizadas como capa semipermeable, por ejemplo semaforinas, que impiden una inmigración celular.

La resistencia mecánica ya mencionada anteriormente de los canales guía de nervios de acuerdo con la invención deber permitir una costura durante la aplicación, es decir durante el uso como implante. La resistencia necesaria

para ello, en particular también la resistencia al desgarro con respecto a lo materiales de sutura usados, puede conseguirse en particular mediante el uso de materiales de refuerzo, que están incluidos en particular en el material a base de gelatina. Los materiales de refuerzo serán fisiológicamente compatibles y en el mejor de los casos también reabsorbibles.

- 5 En función del tipo del material de refuerzo puede influirse en cierta medida, además de la influencia de las propiedades mecánicas, también en la estabilidad frente a mecanismos de reabsorción. En particular la estabilidad de reabsorción de los materiales de refuerzo puede seleccionarse independientemente de los otros componentes, por ejemplo del material a base de gelatina, del canal guía de nervios.

- 10 Los materiales de refuerzo muestran ya con porcentajes del 5 % en peso (con respecto al peso seco) una mejora considerable de las propiedades mecánicas de los canales guía de nervios.

Por lo general, por encima de porcentajes del 60 % en peso no puede conseguirse ninguna mejora significativa y/o las propiedades de absorción deseadas o también la flexibilidad necesaria de los canales guía de nervios pueden presentarse sólo con dificultad.

- 15 Los materiales de refuerzo pueden seleccionarse de materiales de refuerzo particulados y moleculares así como mezclas de los mismos.

En el caso de los materiales de refuerzo particulados se recomienda en particular el uso de fibras de refuerzo. En este caso se recomiendan en particular fibras de polisacárido y fibras de proteína, tales como por ejemplo fibras de colágeno, seda y fibras de algodón, así como fibras de polilactida o también mezclas de las mismas.

- 20 Por otro lado son igualmente adecuados materiales de refuerzo moleculares para mejorar las propiedades mecánicas y, si se desea, también la estabilidad de reabsorción del canal guía de nervios.

Materiales de refuerzo moleculares preferidos son en particular polímeros de polilactida y sus derivados, derivados de celulosa y quitosano y sus derivados. También pueden utilizarse los materiales de refuerzo moleculares como mezclas.

- 25 Preferentemente el cuerpo moldeado del canal guía de nervios comprenderá al menos una parte del o de los materiales de refuerzo. Los materiales de refuerzo están incluidos a este respecto en una matriz a partir del material a base de gelatina o se encuentran en una mezcla molecular con el material a base de gelatina.

Formas de realización preferidas de los canales guía de nervios presentan un cuerpo moldeado de varias capas, mediante lo cual es posible dotar a las capas individuales de funciones específicas, tal como se explicará en más detalle adicionalmente más adelante. Por ejemplo una de las capas puede funcionar como la capa semipermeable.

- 30 Sorprendentemente se ha comprobado que el material a base de gelatina, en particular gelatina de alto peso molecular, presenta un efecto promotor de la angiogénesis, de modo que al mismo tiempo con el implante del canal guía de nervios de acuerdo con la invención, junto con la verdadera función de base de la provisión de un canal guía para el crecimiento nervioso, se promueve también la formación de capilares de vasos sanguíneos, de modo que el entorno del canal guía de nervios, es decir del axón recientemente en desarrollo, se abastece de manera reforzada con nutrientes.

- 35 En el canal guía de nervios de acuerdo con la invención, el material a base de gelatina comprenderá gelatina como componente principal, es decir, que con respecto a otros posibles componentes adicionales, tales como por ejemplo otros biopolímeros reabsorbibles tales como por ejemplo polisacáridos o ácido hialurónico, la gelatina representa el mayor porcentaje de material. En esta regla de cálculo así como también en las recomendaciones más específicas que se proporcionan aún a continuación, los porcentajes posibles de los materiales de refuerzo quedan desatendidos.

Más preferentemente la gelatina representa el porcentaje principal en el material a base de gelatina.

Aún más preferentemente la gelatina representa esencialmente todo el material a base de gelatina.

- 40 La gelatina de alto peso molecular usada preferentemente en el material a base de gelatina presenta preferiblemente un valor de Bloom en el intervalo de aproximadamente 160 g a 300 g.

Ensayos con porcentajes de gelatina de bajo peso molecular muestran que su efecto promotor de la angiogénesis es claramente menor que el de la gelatina de alto peso molecular.

También la gelatina de alto peso molecular en el material a base de gelatina ofrece ventajas adicionales, que se mencionan aún con más detalle a continuación durante la cuestión del ajuste del grado de reticulación.

- 50 Más preferentemente se usa una gelatina que es pobre en endotoxina, siendo adecuada en este caso en particular gelatina de piel de cerdo. Una gelatina de este tipo presenta preferentemente un contenido en endotoxina, medido según la prueba LAL (véase la cuarta edición de la Farmacopea Europea Ph. Eur. 4) de 1.200 U.I./g o menos, en

particular también 200 U.I./g o menos. Mediante un trabajo especialmente cuidadoso pueden conseguirse incluso contenidos en endotoxina de por ejemplo 140 U.I./g o incluso hasta 50 U.I./g.

Gelatina de otro origen o producida según otros métodos puede presentar valores de endotoxina de hasta más de 20.000 U.I./g.

5 De acuerdo con la invención, una elección cuidadosa entre las materias primas permitidas, en particular sólo piel de cerdo aislada y suministrada y la exclusión del uso de artículos refrigerados, el uso inmediato de la materia prima sin largos periodos de transporte o de almacenamiento, una limpieza separada de toda la instalación de proceso antes del inicio de la producción de los lotes especiales, opcionalmente incluyendo el uso de intercambiadores de iones y sistemas de filtro, contribuye a una disminución drástica de los valores de endotoxina.

10 Los canales guía de nervios de acuerdo con la invención presentan habitualmente longitudes en el intervalo de 0,5 a 50 cm. En el caso de que el canal guía de nervios presente un único túbulo hueco como cuerpo moldeado, éste presenta un diámetro exterior de aproximadamente 1 a 30 mm. El grosor de pared, dependiendo de si el cuerpo moldeado está diseñado en una o en varias capas, asciende por ejemplo a 0,02 a 5 mm.

15 Si el canal guía de nervios presenta varios túbulos huecos/cuerpos moldeados, entonces, el diámetro exterior se encuentra en cada caso preferentemente en el intervalo de 100 a 800  $\mu\text{m}$ . En el nervio normal existen pequeños grupos de axones en los denominados fascículos. Un canal guía de nervios con varios cuerpos moldeados con los diámetros preferidos indicados anteriormente forma imita esta estructura.

20 La producción de cuerpos huecos en forma de túbulos de materiales a base de gelatina representa un desafío particular. En particular la producción de canales guía de nervios para la regeneración nerviosa en el sistema nervioso periférico pide dimensiones relativamente pequeñas. Al mismo tiempo, las dimensiones deberán mantenerse de forma reproducible y el procedimiento de producción no será demasiado costoso.

El procedimiento de inmersión representa un procedimiento preferido, en el que una espiga se sumerge una o varias veces en una disolución del material a base de gelatina y en medio se deja secar al menos parcialmente.

25 El desprendimiento de los túbulos huecos así generados como cuerpos moldeados para canales guía de nervios de acuerdo con la invención se configura sin embargo difícilmente debido a los pequeños diámetros y grosores de pared.

Por este motivo, preferentemente se produce un cuerpo hueco con mayor diámetro y grosor de pared en una primera etapa y este cuerpo hueco se estira entonces en su dirección longitudinal para dar un túbulo hueco con el diámetro exterior deseado y el grosor de pared buscado.

30 El estiramiento de materiales a base de gelatina en una medida significativa no se describe hasta el momento en la bibliografía. Se muestra también, que un material a base de gelatina, en particular la propia gelatina, no puede estirarse satisfactoriamente sin modificación.

35 Por este motivo, de acuerdo con la invención, el material a base de gelatina se utiliza preferentemente con un porcentaje en ablandador, que se encuentra en el intervalo entre el 12 y 40 % en peso, en particular en el intervalo del 16 al 25 % en peso.

Al mismo tiempo, el uso de los ablandadores, según lo esperado, lleva a una mayor flexibilidad del canal guía de nervios, mediante lo cual se simplifica su manejo durante su utilización como implante.

Sorprendentemente la gelatina, que contiene tales porcentajes de ablandadores, puede estirarse en una relación de estiramiento relativamente grande, que en la práctica asciende a de 1,4 a 8.

40 Los ablandadores preferidos de acuerdo con la invención para el material a base de gelatina se seleccionan en particular de glicerol, oligogliceroles, oligoglicoles y sorbitol. Tales ablandadores pueden permanecer en el material a base de gelatina y se reabsorben en el organismo del paciente igual que el material a base de gelatina del canal guía de nervios o del propio cuerpo moldeado.

45 Sorprendentemente, mediante el uso de los ablandadores durante el estiramiento de los materiales a base de gelatina puede conseguirse también un aumento de la resistencia a la rotura por tracción en dirección longitudinal del canal guía de nervios y en particular aumentar hasta un valor del 30 % o más, en particular también del 50 % o más.

50 Esto ofrece ventajas particulares para el cirujano durante el uso del canal guía de nervios de acuerdo con la invención como implante en la regeneración nerviosa, dado que éste tiene disponible un implante relativamente insensible. Así mismo, mediante el estiramiento del material reticulado puede conseguirse una resistencia a la rotura por tracción en dirección longitudinal de 40 N/mm<sup>2</sup> o más, en particular también 60 N/mm<sup>2</sup> o.

Preferentemente, el material a base de gelatina se usa en un estado al menos parcialmente reticulado. A través del grado de reticulación puede ajustarse la estabilidad de reabsorción del canal guía de nervios o del cuerpo moldeado.

La reticulación afecta preferentemente a la gelatina contenida en el material a base de gelatina.

En el procedimiento de inmersión recomendado para la producción de cuerpos huecos se utiliza el material a base de gelatina en la disolución prerreticulado. Esto lleva a un grado de reticulación uniforme en todo el material a base de gelatina.

5 Más preferentemente, el cuerpo moldeado acabado, por lo general estirado, se retícula adicionalmente en una segunda etapa para garantizar así la estabilidad de reabsorción deseada. Esta reticulación en dos etapas permite mayores grados de reticulación que la reticulación en una sola etapa. En este caso resulta entonces también la posibilidad de realizar grados de reticulación graduados.

10 Por ejemplo, el grado de reticulación del material a base de gelatina en la pared del cuerpo moldeado adyacente a la superficie exterior puede ser mayor que en zonas de la pared adyacente a la luz.

Debido a la elección de un grado de reticulación diferente sobre la superficie exterior del cuerpo moldeado por un lado y adyacente a la luz del cuerpo moldeado por otro lado, se permite que durante la regeneración de las fibras nerviosas, es decir durante el desarrollo de los axones, se ofrezca por un lado en primer lugar un volumen protegido en forma de luz, que se amplía durante el crecimiento nervioso debido a la reabsorción progresiva del material a base de gelatina. No obstante, la función protectora del canal guía de nervios se mantiene adicionalmente, dado que las zonas externas de la pared del cuerpo moldeado se reabsorben más lentamente y con ello pueden proporcionarse mayores tiempos de protección contra la inmigración de fibroblastos.

20 Esto permite a los axones que se regeneran formar capas de mielina que se vuelven cada vez más gruesas, que sirven para el aislamiento, sin que de este modo se cree una presión en del canal guía de nervios que pudiera ser perjudicial para los axones que se regeneran.

La reticulación al menos parcial en la disolución, igual que la segunda etapa de reticulación, pueden tener lugar tanto químicamente como enzimáticamente.

En el caso de la reticulación química se utilizan como agentes reticulantes en particular aldehídos, dialdehídos, isocianatos, carbodiimidias y halogenuros de alquilo.

25 Se prefiere especialmente la reticulación con formaldehído, dado que en la etapa de reticulación respectiva se consigue al mismo tiempo una esterilización del material a base de gelatina o del cuerpo moldeado.

En el caso de la reticulación enzimática se utiliza preferentemente transglutaminasa.

30 Para el propósito de uso del canal guía de nervios, el grado de reticulación se selecciona de modo que el canal guía de nervios, en particular su cuerpo moldeado, muestre, en condiciones fisiológicas convencionales (tampón PBS pH 7,2; 37°C) durante 4 semanas, una disminución del peso secos de como máximo aproximadamente el 20 % en peso.

35 La luz del cuerpo moldeado es, en comparación con las dimensiones de las fibras nerviosas individuales que se producen naturalmente, es extremadamente grande. Los axones tienen un grosor de tan solo aproximadamente 1 µm, mientras que la luz proporcionada por el canal guía de nervios puede presentar un diámetro de hasta 10 mm. Incluso con el uso de varios túbulos huecos en un canal guía de nervios, su luz respectiva ofrece un diámetro interior que supera el grosor de los axones en aproximadamente 2 órdenes de magnitud o más.

Para el promover crecimiento planeado de los axones durante la regeneración y mantener el tiempo de regeneración lo más corto posible, se disponen preferentemente uno o varios elementos guía en la luz del cuerpo moldeado en paralelo a su dirección longitudinal. Preferentemente el o los elementos guía se extienden a este respecto esencialmente a lo largo de toda la longitud de la luz.

40 Los elementos guía pueden estar colonizados a este respecto ya con células auxiliares, en particular las células de Schwann, que promueven el crecimiento de axones.

45 En el nervio natural se encuentran células de Schwann, que a través de circuitos de realimentación regulados desprenden factores de crecimiento y promueven tanto la formación de vasos sanguíneos como la regeneración axonal. Estas células pueden aislarse por ejemplo a partir de nervio dañado de un paciente y reimplantarse a través del canal guía de nervios de acuerdo con la invención después de cultivo *in vitro*. Para disponer las células de Schwann de forma distribuida de la manera más uniforme posible en la luz del canal guía de nervios, se disponen las células de Schwann preferentemente en una matriz de gel de gelatina, que se licua a temperatura elevada (por ejemplo 40°C) y que melifica de nuevo al enfriarse hasta la temperatura corporal y que inmoviliza las células añadidas a temperatura más alta. De esta manera las células de Schwann pueden aplicarse de manera uniformemente distribuida sobre los elementos guía y permanecer en este estado tras enfriarse hasta temperatura ambiente, hasta que se utilice el implante en el paciente.

50 Para no obstaculizar el crecimiento de los axones y la diferenciación del tejido nervioso, los elementos guía ocuparán preferentemente como máximo aproximadamente el 30 % en volumen de la luz.

Como elementos guía son adecuados en particular microfilamentos con grosores promedio de aproximadamente 10 a 100  $\mu\text{m}$ , en función del diámetro interno disponible en la luz.

Para poder disponer de forma igualmente distribuida varios microfilamentos en la luz, estos se estabilizan preferentemente en una matriz o por medio de espaciadores a una distancia uno con respecto a otro.

- 5 Se observa una función de guía especialmente pronunciada en el caso de elementos guía que presentan ranuras de guía. De esto resulta un efecto estereotrópico y pueden establecerse ya las células auxiliares usadas opcionalmente como en las denominadas bandas de Büngner con una orientación longitudinal muy buena. Como consecuencia se obtiene un crecimiento orientado en sentido longitudinal así mismo de alto grado de los axones. Las dimensiones geométricas no son especialmente críticas y pueden presentar por ejemplo una profundidad de 0,5 a 50  $\mu\text{m}$ . Es importante la presencia de bordes que limiten las ranuras de guía.

Si se usa una matriz para fijar los microfilamentos entre sí, el material de matriz estará formado preferentemente de un material que inhiba un crecimiento axonal, de modo que su crecimiento se oriente sólo a los microfilamentos. Materiales que inhiben el crecimiento axonal son por ejemplo ácido hialurónico o también geles de gelatina hidrofobizados.

- 15 Como alternativa puede producirse un elemento guía a partir de un material plano enrollado, que proporciona microcanales entre sus capas enrolladas, de manera similar a las ranuras de guía de los microfilamentos descritos anteriormente. La estructura necesaria puede darse al material plano con una colada del mismo en un molde o mediante estampación, punzonado o similar posterior. El eje de arrollamiento para el material plano es paralelo a la dirección longitudinal del canal guía de nervios.

- 20 En una configuración correspondiente del material plano, este puede formar al mismo tiempo el cuerpo moldeado del canal guía de nervios.

Tal como ya se mencionó anteriormente, el canal guía de nervios puede contener varios cuerpos moldeados que se unen entre sí preferentemente por medio de un material de matriz. Este material de matriz contiene preferentemente componentes que promueven la angiogénesis, para permitir la formación de vasos sanguíneos entre los axones, de manera similar a como sucede también en los fascículos naturales en una matriz no neuronal. Este material de matriz es preferentemente material a base de gelatina y presenta de manera especialmente preferente una estructura de poro abierto.

- 25 Este material ocupa por ejemplo un porcentaje de volumen del 30 al 60 % en volumen del volumen del canal guía de nervios. Más preferentemente, el material de matriz es reabsorbible.

- 30 En una forma de realización preferida de la invención, el canal guía de nervios presenta una envoltura exterior o matriz de recubrimiento que rodea el o los cuerpos moldeados, que está formada así mismo por un material reabsorbible. En particular, para la matriz de recubrimiento se recomienda una estructura porosa, en particular de poro abierto. El tamaño de poro medio se encuentra preferentemente en el intervalo de 100 a 300  $\mu\text{m}$ .

- 35 La matriz de recubrimiento puede producirse por ejemplo mediante recubrimiento con espuma del o de los cuerpos moldeados.

- 40 Como alternativa, la matriz de recubrimiento puede troquelarse a partir de un bloque de material sólido prefabricado, en particular una espuma, u obtenerse por medio de una broca de núcleo-manguito. La abertura de paso para la introducción del cuerpo moldeado, que opcionalmente se dotó previamente de la capa semipermeable, puede formarse de manera sencilla mediante una herramienta de perforación (al trabajar con la broca de núcleo-manguito esto se produce preferentemente al mismo tiempo con la generación de la matriz de recubrimiento).

En la matriz de recubrimiento así formada puede introducirse el cuerpo moldeado. Un ajuste a presión entre matriz de recubrimiento y cuerpo moldeado es suficiente por lo general para manejar de forma segura el canal guía de nervios.

- 45 Preferentemente, el material de matriz de recubrimiento comprende un componente que promueve la angiogénesis para promover también una formación de vasos sanguíneos alrededor del canal guía de nervios y en particular hasta su cuerpo moldeado. Este efecto promotor se realiza preferentemente de modo que la formación de vasos sanguíneos puede tener lugar antes de la formación o al menos durante la formación de los axones en la luz del cuerpo moldeado. Materiales adecuados para ello son a su vez materiales a base de gelatina, en particular a base de gelatina de alto peso molecular, tal como ya se describió adicionalmente con detalle anteriormente. El grosor de la envoltura exterior o matriz de recubrimiento asciende preferentemente a de 1 a 2 mm.

- 50 Con el uso de varios cuerpos moldeados en el canal guía de nervios puede convertirse la matriz de recubrimiento en la matriz que conecta los cuerpos moldeados entre sí. Ambas matrices pueden estar formadas por el mismo material que promueve en particular la angiogénesis.

En este caso, la capa semipermeable es entonces parte de cada uno de los cuerpos moldeados para garantizar que en la luz reservada para el crecimiento axonal no puede tener lugar ninguna inmigración de células que inhiben o impiden completamente el crecimiento axonal.

5 La matriz de recubrimiento puede presentar a este respecto una tasa de reabsorción mayor que el o los cuerpos moldeados.

Cuanto más largos sean los tramos a puentear por un implante entre dos cabos de nervio, más largo será el tiempo de reabsorción de los materiales a base de gelatina de los cuerpos moldeados. Es decir, la propiedad de reabsorción del implante, en particular el cuerpo moldeado y muy especialmente la capa semipermeable se ajustará a la longitud de los tramos defectuosos de nervio.

10 En el caso de canales guía de nervios, que se usan como implantes para el sistema nervioso periférico, la propiedad de reabsorción del canal guía de nervios se selecciona de modo que la reabsorción comience en un extremo del implante y avance hasta el otro extremo, de manera correspondiente y preferentemente ajustado al crecimiento axonal. Desde el extremo del implante, en el que comienza el desarrollo axonal, comienza también la mielinización y por lo tanto el engrosamiento de las fibras nerviosas. Mediante la reabsorción ajustada temporalmente del implante se crea el espacio necesario, de modo que pueda evitarse un aplastamiento de las fibras nerviosas.

15 Tales propiedades deseadas pueden realizarse a través del grado de reticulación variable del material a base de gelatina a lo largo de la dirección longitudinal del canal guía de nervios, es decir el grado de reticulación es en un extremo del canal guía de nervios menor que en el otro extremo, siendo posible una variación escalonada o un aumento esencialmente continuo del grado de reticulación.

20 Si por el contrario, el implante se utiliza en el sistema nervioso central, entonces se tiene en cuenta el hecho de que el crecimiento axonal tiene lugar a partir de ambos cabos de nervio. En este caso se recomienda entonces un comportamiento de reabsorción graduado, en el que la reabsorción comience en ambos extremos del implante aproximadamente al mismo tiempo y la zona central entre los extremos del implante sólo se reabsorba con un retraso temporal.

25 Esto puede realizarse también mediante una graduación correspondiente del grado de reticulación a lo largo de la dirección longitudinal del canal guía de nervios. También en este caso puede seleccionarse una variación escalonada del grado de reticulación o una esencialmente continua.

30 Por consideraciones prácticas puede ser ventajoso si el diámetro interno de la luz a ambos extremos del canal guía de nervios es mayor que en la zona restante, mediante lo cual pueden introducirse los cabos de nervio de la lesión de manera más sencilla en el canal guía de nervios.

La invención se explica aún más en detalle por medio de los dibujos y los siguientes ejemplos. Muestran:

- la figura 1 una representación esquemática de un canal guía de nervios de acuerdo con la invención en una primera forma de realización;
- 35 la figura 2 una representación esquemática de un canal guía de nervios de acuerdo con la invención en una segunda forma de realización;
- las figuras 3 y 4 diagramas referentes al efecto de acuerdo con la invención de gelatina modificada sobre la colonización celular de un sustrato.
- la figura 5 una representación esquemática de una construcción de ensayo para examinar las propiedades de difusión de una capa semipermeable de acuerdo con la invención;
- 40 las figuras 6 y 7 diagramas con resultados de ensayo del examen de las propiedades de difusión de una capa semipermeable de acuerdo con la invención;
- las figuras 8a y una representación esquemática de la disposición de ensayo para el reconocimiento de la angiogénesis por medio de una membrana corioalantoidea;
- 45 la figura 9 un diagrama para la ilustración del desarrollo de vasos sanguíneos en el material que promueve la angiogénesis; y
- la figura 10 imágenes de microscopio óptico de células de Schwann y axones cultivados sobre una lámina de plástico inerte.

50 La figura 1 muestra un canal de guía de nervios designada en conjunto con el número de referencia 10, con un cuerpo moldeado 12 de un material a base de gelatina, reticulado. El cuerpo moldeado 12 presenta un cuerpo hueco en forma de túbulo con una pared 14, que presenta una superficie exterior 16 y con una superficie interior 18 define una luz mencionada espacio hueco 20.

El canal guía de nervios presenta además una capa semipermeable que está diseñada de manera solidaria (no representada en detalle en la figura 1) con el cuerpo moldeado 12. La posición de la capa semipermeable se encuentra dentro de la pared 14, preferentemente adyacente a la superficie exterior 16.

5 La superficie exterior del cuerpo moldeado 12 está rodeada por una envoltura exterior 22, que está configurada con poros abiertos y que comprende un componente que promueve la angiogénesis, en particular una gelatina reticulada de alto peso molecular con estructura de esponja. La envoltura exterior 22 puede producirse a partir de un material de esponja de gelatina reticulada, tal como se describe en detalle en el siguiente ejemplo 3. En primer lugar se produce un bloque de un material de esponja de este tipo con un grosor suficiente (de manera correspondiente a la longitud del canal guía de nervios acabado). A partir de este bloque se fabrica como cilindro hueco, por ejemplo mediante estampación o por medio de una broca de núcleo-manguito la envoltura exterior 22. En la abertura de paso de este cilindro hueco puede introducirse entonces el cuerpo moldeado 12 que se sujeta en la envoltura exterior 22 preferentemente con un ligero ajuste a presión.

15 La figura 2 muestra un canal guía de nervios adicional de acuerdo con la invención 40 con un cuerpo hueco en forma de túbulo como cuerpo moldeado 42. El cuerpo moldeado 42 presenta una pared 44 de un material a base de gelatina con una superficie exterior 46 y una superficie interior 48 que define una luz 50.

Adyacente a la superficie exterior 46 del cuerpo moldeado 42 está dispuesta una capa semipermeable independiente 52, que puede difundir a su través nutrientes y gases, pero que bloquea la penetración de células, en particular fibroblastos.

20 A continuación hacia fuera, el cuerpo moldeado 42 con la capa semipermeable 52 está rodeado por una envoltura exterior 54, que está diseñada de manera similar a en el caso de la forma de realización de la figura 1. La envoltura exterior 54 puede fabricarse tal como se describe en relación con la forma de realización de la figura 1 y empujarse sobre el cuerpo moldeado 42.

La figura 2 muestra esquemáticamente la formación ya realizada de vasos sanguíneos 56 en la envoltura exterior, promovida por el componente que promueve la angiogénesis de la envoltura exterior 54.

## 25 Ejemplos

### Ejemplo 1: Producción de un canal guía de nervios de acuerdo con la invención

#### Producción de un cuerpo hueco en forma de túbulo

30 A continuación se describe en primer lugar la producción de un cuerpo hueco en forma de túbulo, que es elemento fundamental de un canal guía de nervios de acuerdo con la invención. Los distintos tipos producidos presentan diámetros internos de aproximadamente 2.000  $\mu\text{m}$ , 1.100  $\mu\text{m}$  y 150  $\mu\text{m}$  y se producen por medio del procedimiento de inmersión preferido de acuerdo con la invención y a continuación se estiran.

35 Para ello se disolvieron en primer lugar 100 g de gelatina de piel de cerdo (fuerza de Bloom 300 g) en una mezcla de 260 g de agua y 40 g de glicerol como ablandador a 60 °C y se desgasificó la disolución por medio de ultrasonidos. Esto corresponde a un porcentaje de ablandador en el material de aproximadamente el 29 % en peso, con respecto a la masa de gelatina y glicerol.

40 Tras la adición de 4 g de una disolución acuosa de formaldehído al 2,0 % en peso (800 ppm de reticulante con respecto a la gelatina) se homogeneizó la disolución, se desgasificó de nuevo y se liberó de espuma la superficie. Entonces se sumergió brevemente en la disolución así preparada una espiga de acero fino como elemento de conformación con un diámetro de 2 mm, que se había pulverizado previamente con una cera de separación, con una longitud de aproximadamente 3 cm. Tras sacar la espiga de la disolución se giró la misma, de modo que la disolución adherida formara una capa lo más uniforme posible.

Después de un secado de aproximadamente un día a 25 °C y una humedad relativa del aire del 30 % pudo retirarse el túbulo hueco formado de la espiga.

45 El túbulo hueco producido de esta manera tenía un diámetro interno correspondiente al diámetro de espiga de 2 mm y un grosor de pared medio de 300  $\mu\text{m}$ , que se determinó mediante microscopio óptico.

Para llevar el túbulo hueco hasta un diámetro interno menor, se almacenó durante cinco días a 23°C y a una humedad relativa del aire del 45 % y a continuación se estiró.

50 Para el estiramiento se sujetó el túbulo en ambos extremos y se ablandó bajo la acción de vapor de agua caliente. En este estado termoplástico se alargó con una relación de estiramiento de aproximadamente 1,4, se fijó en este estado y se secó durante 16 horas a 23 °C y a una humedad relativa del aire del 45%.

El túbulo hueco obtenido a este respecto presentaba un diámetro interno de aproximadamente 1.100  $\mu\text{m}$  y un grosor de pared de aproximadamente 200  $\mu\text{m}$ . Un examen con microscopio óptico muestra una forma de sección transversal de forma extraordinariamente regular como también un grosor de pared muy uniforme del túbulo visto a

lo largo de su perímetro y longitud.

Con mayores relaciones de estiramiento se obtuvieron túbulos huecos con diámetros internos de hasta 150  $\mu\text{m}$ .

5 Para prolongar el tiempo de degradación fisiológica de los túbulos se sometió la contenida en los mismos a una etapa de reticulación adicional. Para ello se expusieron los túbulos en un desecador durante 17 horas a la presión de vapor de equilibrio de una disolución acuosa de formaldehído al 17 % en peso a temperatura ambiente.

A este respecto, los extremos de los túbulos pueden cerrarse de modo que la reticulación tenga lugar sólo a partir de la superficie exterior. En este caso se encuentra entonces un grado de reticulación mayor sobre la superficie exterior en comparación con la superficie interior que define la luz del túbulo y una estabilidad de reabsorción correspondientemente elevada.

10 Un túbulo hueco con un mayor grado de reticulación en la zona de pared adyacente a la luz puede obtenerse por ejemplo porque el vapor de formaldehído se conduce exclusivamente a través de la luz del túbulo hueco.

15 Como alternativa o de manera complementaria pueden realizarse también diferentes grados de reticulación de modo que la espiga se sumerja una tras otra en disoluciones con distintas concentraciones de agente reticulante. De esta manera resulta un grado de reticulación graduado de manera correspondiente a lo largo del grosor de pared del túbulo hueco.

Se entiende que las propiedades del túbulo hueco descrito en este caso pueden modificarse de muchas maneras, adaptándose a los requisitos respectivos en particular el tamaño y la forma de la espiga, los porcentajes de gelatina, ablandador y agente reticulante en la disolución, el número de pasos de inmersión, y la intensidad de la reticulación posterior.

#### 20 Generación de la capa semipermeable

La superficie exterior de los túbulos huecos descritos anteriormente puede modificarse por ejemplo químicamente para generar una capa semipermeable, que rodea la luz integral con el túbulo hueco.

25 De este modo pueden convertirse, por ejemplo los grupos amino de los restos lisina por medio de anhídrido de ácido succínico, en una forma succinada, mediante lo cual se reduce el valor de  $\text{pK}_s$  del materia de gelatina de 8 a 9, tal como se halló para la gelatina no modificada, hasta aproximadamente 4.

Una posibilidad adicional de modificar la gelatina consiste en convertir los grupos amino de los restos lisina en grupos dodecenil-succinilo. El valor  $\text{pK}_s$  se reduce a este respecto hasta aproximadamente 5 y al mismo tiempo tiene lugar una ligera hidrofobización de la gelatina.

30 En ambos casos disminuye claramente la adhesión celular de fibroblastos con respecto a una superficie tratada de esta manera, lo que se explica aún en más detalle a en los ensayos que se describen a continuación y en relación con las figuras 3 y 4.

35 En primer lugar, para completar, ha de mencionarse que en el caso de los túbulos huecos generados tal como se describió anteriormente como alternativa a la modificación de la gelatina de la superficie exterior éstos pueden dotarse de una capa semipermeable separada. Para permanecer en el caso de los ejemplos seleccionados previamente, esta capa puede tener lugar mediante la aplicación de una gelatina succinada o dodecenil-succinada o mezclas de la misma con otros biopolímeros, en particular también gelatina no modificada en disolución acuosa. El modo de proceder puede estar apoyado en el procedimiento de inmersión, tal como se describió adicionalmente con anterioridad para la producción de los túbulos huecos.

El grado de conversión de los grupos lisina en la gelatina modificada asciende preferentemente al 30 % o más.

40 En el caso de la gelatina dodecenil-succinada son suficientes muy adecuadamente con frecuencia grados de conversión del 40 al 50 %, mientras que el caso de la gelatina succinada más bien una conversión del 80 % hasta la conversión casi completa de los grupos lisina, proporciona mejores resultados.

45 Las figuras 3 y 4 muestran resultados de adhesión celular para superficies de prueba de materiales de gelatina aplicadas sobre superficies de vidrio para fines de ensayo, que se produjeron a partir de gelatina de piel de cerdo (MW 119 kDa) y una gelatina succinada con aproximadamente un 95 % de grupos lisina (figura 3) o aproximadamente un 45 % de gelatina dodecenil-succinada (figura 4) del mismo tipo. En cada caso se sometieron a ensayo mezclas de gelatina no modificada con gelatina modificada en las proporciones 100:0, 80:20, 50:50 y 0:100.

50 En los ensayos se incubaron en cada caso 20.000 condrocitos porcinos sobre una superficie de prueba durante 4 h a 37°C. El sobrenadante se retiró, se lavó la superficie y se fijaron las células que quedaban sobre la superficie para evaluarlas con el microscopio óptico a continuación. Se obtuvieron resultados comparables con condrocitos humanos.

Los datos en porcentaje en los diagramas representan el porcentaje de las células halladas sobre las superficies de

prueba de lámina con respecto al número usado para la incubación, después de que se realizara el procedimiento mencionado anteriormente.

Para los dos tipos de gelatina modificada, resultaron efectos de población prácticamente nulos con el uso exclusivo de gelatina modificada.

- 5 A partir de esto puede concluirse para el caso de la modificación de las superficies de los túbulos huecos, que con un grado de conversión correspondientemente alto de los grupos lisina accesibles sobre la superficie exterior pueden obtenerse efectos comparables.

Lo mismo sirve naturalmente para una aplicación de una capa separada de gelatina modificada sobre la superficie exterior del tubo hueco.

- 10 Dado que una inmigración de células a la pared del tubo hueco supone en primer lugar su adhesión sobre la superficie exterior, las condiciones para un efecto de bloqueo para células, tal como se espera de acuerdo con la invención de una capa semipermeable, se satisfacen muy adecuadamente.

### **Ejemplo 2: Propiedad semipermeable / Función de capa de barrera de la lámina de gelatina por medio de pruebas de material plano**

- 15 Para someter a prueba las propiedades de difusión de las láminas de prueba descritas anteriormente se sujetaron en un dispositivo de prueba de dos cámaras 60 tal como se ve en la figura 5 entre dos bloques 62 y 64, creándose a ambos lados de la lámina de prueba 66 espacios huecos 68, 70 en los bloques 62 o 64, que se enjuagaron durante la fase de ensayo con diferentes medios.

- 20 La cámara superior 68 se enjuagó con una disolución en bruto de fenol como sustituto de disolución de nutrientes, en la cámara inferior 70 se usó una disolución de PBS pura. Cada dos horas se midió la absorción de la disolución de rojo de fenol y de PBS. Los valores de medición están reproducidos en las curvas de la figura 6 para una lámina de gelatina no modificada.

- 25 El ensayo se repitió con una lámina, que en primer lugar se colonizó con 10.000 células/cm<sup>2</sup>, que se dejaron adherir durante 2 h. Las células adheridas se multiplicaron en cultivo durante una semana sobre la lámina, después se realizó la misma medición que se describió anteriormente. Los valores de medición están representados en la figura 7.

- 30 Como resultado se encontró una disminución de la concentración de rojo de fenol en la cámara superior 68 y un aumento correspondiente de la concentración de rojo de fenol en la cámara inferior 70, de manera correspondiente a una difusión de nutrientes a través de la lámina. En el caso de la lámina colonizada con células resulta en la tendencia una difusión un tanto acelerada para el rojo de fenol.

- En paralelo a esto, con suspensiones de partículas de carbono (tamaño de partícula para el 75 % en peso inferior a 45 µm) no se encontró ningún paso a través de las láminas. Esto significa que la lámina colonizada con células ofrece también una capa de barrera eficaz contra la penetración de células y partículas del tamaño de células y no deja de funcionar por proteasas celulares.

- 35 Los resultados anteriores pudieron confirmarse también en ensayos en cultivo que duraron dos y tres semanas.

### **Ejemplo 3: Efecto de angiogénesis**

#### Producción y propiedades de cuerpos moldeados con estructura celular a base de gelatina reticulada

- 40 Se prepararon cinco mezclas madre de una disolución de gelatina de piel de cerdo al 12 % en peso (fuerza de Bloom 300 g, peso molecular medio 140 kDa) en agua disolviendo la gelatina a 60 °C, se desgasificaron por medio de ultrasonidos, y en cada caso se mezcló con la cantidad correspondiente de una disolución acuosa de formaldehído (al 1,0 % en peso, temperatura ambiente), de modo que se dispusieron 1500 ppm de formaldehído (con respecto a la gelatina). En una sexta mezcla madre no se realizó ninguna adición de formaldehído.

- 45 Las mezclas homogeneizadas se templaron hasta 45 °C y después de un tiempo de reacción de 10 min se espumaron a máquina con aire. El proceso de espumación de aproximadamente 30 minutos se realizó para las seis mezclas madre con una relación diferente de aire con respecto a disolución de gelatina, mediante lo cual se obtuvieron cultivos celulares con diferentes densidades en húmedo y tamaños de poro según la tabla 1.

Las disoluciones de gelatina espumadas, que presentaban una temperatura de 26,5 °C, se colaron en moldes con unas dimensiones de 40 x 20 x 6 cm y se secaron aproximadamente durante cuatro días a 26 °C y a una humedad relativa del aire del 10%.

- 50 Los cuerpos moldeados secados de las seis mezclas madre presentan una estructura celular de tipo esponja (a continuación denominadas esponjas). Se cortaron en capas de 2 mm de grosor y se expusieron durante la segunda etapa de reticulación durante 17 horas en un desecador a la presión de vapor de equilibrio a una disolución acuosa

de formaldehído al 17 % en peso a temperatura ambiente. Para la sexta mezcla madre esto representó la primera (y única) etapa de reticulación. Para conseguir una gasificación uniforme del volumen total de los cuerpos moldeados, se evacuó el desecador a este respecto en cada caso dos o tres veces y se aireó de nuevo.

5 La estructura de poro de las esponjas se determinó con microscopio óptico y puede confirmarse mediante microscopía electrónica de barrido.

Tabla 1

Mezcla madre	Densidad en húmedo (mg/cm <sup>3</sup> )	Densidad en seco (mg/cm <sup>3</sup> )	Tamaño de poro medio (µm)
1-1	100	20	250
1-2	175	27	200
1-3	300	50	125
1-4	530	70	100
1-5	600	100	75
1-6	78	12	300

Para determinar la estabilidad de las esponjas, se pesaron pedazos de un tamaño de 30 x 30 x 2 mm, se dispusieron en cada caso 75 ml de tampón PBS y se almacenaron a 37 °C. Después del tiempo de almacenamiento respectivo se lavaron los pedazos durante 30 min en agua, se secaron y se pesaron.

10 Mientras que la esponja 1-6 después de tres días ya estaba completamente disuelta, todas las espumas reticuladas en dos etapas también después de 14 días se mantenían aún en más del 80 %. Se muestran sin embargo diferencias considerables en el comportamiento de degradación adicional, que pueden atribuirse a las diferentes densidades de espumación de los materiales. De este modo esponja 1-1 después de 21 días y la esponja 1-2 después de 28 se disolvieron completamente, mientras que las espumas 1-4 y 1-5 también después de 35 días se mantienen aún en gran medida. De esto resulta una posibilidad adicional de influir de manera controlada en el comportamiento de degradación de estas espumas o materiales de estructura celular independientemente de otros parámetros.

En cambio, las propiedades de los materiales de estructura celular pueden modificarse claramente también a través de una variación de la concentración de gelatina en la disolución de partida.

20 Mayores concentraciones de gelatina llevan a paredes celulares o almas más anchos (más gruesos) entre los poros individuales, lo que repercute en una elevada resistencia a la rotura de las esponjas correspondientes.

A través del grado de reticulación, es decir mediante la elección de la concentración del agente reticulante, puede por el contrario influirse en la estabilidad de los cuerpos moldeados, en particular con respecto a la degradación proteolítica.

25 Detección del efecto que promueve la angiogénesis

A partir de cuerpos moldeados que pueden obtenerse de manera análoga al modo de proceder anterior, reticulados dos veces (densidad en seco 22 mg/ml, tamaño de poro medio aproximadamente 250 µm) se produjeron muestras con las dimensiones 15 x 15 x 2 mm, a continuación se denominan implantes.

30 Las propiedades que promueven la angiogénesis de estos implantes se sometieron a ensayo por medio de un ensayo en huevos de gallina fecundados, que se representa esquemáticamente en las figuras 8a y 8b.

La figura 8a muestra esquemáticamente la estructura de un huevo de gallina en sección transversal. Por debajo de la cáscara de calcio 80 se encuentra la membrana corioalantoidea 82 (a continuación denominada de forma abreviada CAM). A partir del embrión 86 que se encuentra en el borde de la yema de huevo 84 tiene lugar una formación de vasos sanguíneos extraembrionarios 88, que se extienden a lo largo de la CAM. Si se extrae por medio de una cánula una parte de la clara, puede cortarse a continuación una ventana 90 en la cáscara de calcio 80, sin dañar la CAM 82 (tal como se representa en la figura 8b). Ahora puede colocarse un implante 92 sobre la CAM 82 y someterse a ensayo su efecto sobre la formación de vasos sanguíneos (véase por ejemplo J. Borges y col. (2004) Der Chirurg 75, 284-290).

40 Se observa una reorientación y una nueva formación de vasos sanguíneos en imágenes de microscopio óptico después de 3, 5 y 7 días.

Como ejemplos de referencia se sometieron a prueba, además del sustrato de acuerdo con la invención, materiales de tipo esponja comparables de colágeno (colágeno bovino, renaturalizado, densidad 5,6 mg/cm<sup>3</sup>, disponible de la

empresa Innocoll) y poli-DL-lactida (fabricante ITV Denkendorf).

5 Todos los implantes se colocaron sobre una CAM y después de 3, 4, 5, 6 y 7 días se determinó el número de vasos sanguíneos que se habían desarrollado en los alrededores inmediatos de los implantes. Los vasos sanguíneos se orientan en el plazo de pocos días muy claramente al sustrato que promueve la angiogénesis o las muestras de referencia de colágeno de tipo espuma y poli-DL-lactida.

Se muestra que en las tres muestras con respecto al valor cero (CAM sin implante colocado) está presente un número notablemente mayor de vasos sanguíneos, obteniéndose en las tres muestras efectos similares, en particular considerado con respecto al valor cero.

10 Es decir, todos los materiales sometidos a prueba se encuentran, en su efecto angiogénico, en su entorno, aproximadamente al mismo nivel elevado. El efecto observado se provoca a lo largo de una cierta distancia y se basa por este motivo probablemente en los denominados factores de difusión.

15 En el caso de la CAM se trata de un tejido que representa la superficie límite entre el aire y el líquido del huevo. Posiblemente únicamente mediante el estímulo mecánico mediante la colocación del sustrato sobre la CAM se produce una activación de receptores, lo que podría llevar a una distribución de factores pro-angiogénicos tales como por ejemplo VEGF de las células. Con ello podrían atraerse células endoteliales y se produciría entonces una formación de vasos sanguíneos controlada sobre el implante.

20 Otra posibilidad de aclaración consiste en que debido a la colocación del implante se impide el acceso de oxígeno del aire al tejido epitelial. De este modo, en la región del implante se genera una denominada anoxia, dado que poco oxígeno se encuentra disponible para el tejido epitelial. Las células reaccionan a una anoxia habitualmente con la distribución de VEGF, mediante lo cual se induce una reorganización o nueva formación de vasos sanguíneos. Esto significa que en la parte desabastecida de las células se organizan nuevas líneas de alimentación. Este fenómeno biológico aparece probablemente por encima de una superficie de tejido desabastecida de manera crítica (deformada)

25 Esto explicaría por qué en ensayos en los que con la simple colocación de anillos de caucho delgados sobre la CAM (superficie cubierta muy pequeña) no podía observarse ningún efecto pro-angiogénico.

En la figura 9 está representada la superficie de los vasos sanguíneos (en  $\text{mm}^2$ ) dentro de los sustratos o implantes de los materiales de comparación y el sustrato que promueve la angiogénesis de la presente invención después de 3, 5 y 7 días. En la sucesión de las columnas representadas sirve el orden muestra de gelatina, muestra de colágeno, muestra de poli-DL-lactida.

30 Tal como puede verse en la figura 9, después de 3 días se muestra únicamente en el sustrato que promueve la angiogénesis de acuerdo con la invención, un porcentaje medible de vasos sanguíneos en el propio implante, mientras que en la esponja de colágeno y la esponja de poli-DL-lactida no está presente ningún porcentaje medible de vasos sanguíneos.

35 Los vasos sanguíneos medibles después de 5 días muestran un aumento extremo en los sustratos que promueven la angiogénesis de acuerdo con la invención, mientras que para la muestra de poli-DL-lactida y para la esponja de colágeno no se observa aún ningún efecto.

40 Después de 7 días disminuye claramente el porcentaje de vasos sanguíneos en el implante en el sustrato que promueve la angiogénesis de acuerdo con la invención, pero el efecto es aún aproximadamente el doble de alto que después de 3 días. En este instante no se observa en la esponja de colágeno aún ningún éxito medible, mientras que en el caso de la esponja de poli-DL-lactida no se ajusta ahora ningún efecto, como se había establecido en el caso de la muestra de implante de esponja de gelatina de acuerdo con la invención ya después de 3 días.

45 Para la evaluación de las muestras y la determinación del número de vasos sanguíneos en el implante se prepararon secciones congeladas de las muestras respectivas y se tiñeron con DAPI, para analizar la superficie de los vasos sanguíneos dentro del implante. Para ello se realizaron tomas de la región central de las secciones y a continuación se evaluaron cuantitativamente con procedimientos de procesamiento de imágenes. En el caso de las esponjas de colágeno no pudo observarse en la región central ninguna formación de vasos sanguíneos. En el caso de las esponjas de poli-DL-lactida sólo después de 7 días se había establecido la angiogénesis, relacionado con una colonización de células de tejido conjuntivo progresiva. En conjunto, la colonización con células progresa también en esta muestra de comparación claramente más lentamente que en los implantes de acuerdo con la invención.

50 La involución de los vasos sanguíneos en el implante de acuerdo con la invención después de 7 días se expresa en una reducción de la superficie medida. Esto podría basarse en que la red de vasos sanguíneos se reduce de nuevo tanto como se necesita realmente para la zona del implante, porque por ejemplo han inmigrado aún relativamente pocos tipos celulares distintos, que deben abastecerse. Esto corresponde a un proceso que se encuentra también en el caso de infecciones, donde se atrofia de nuevo una red de vasos sanguíneos, tan pronto como baje la inflamación.

55

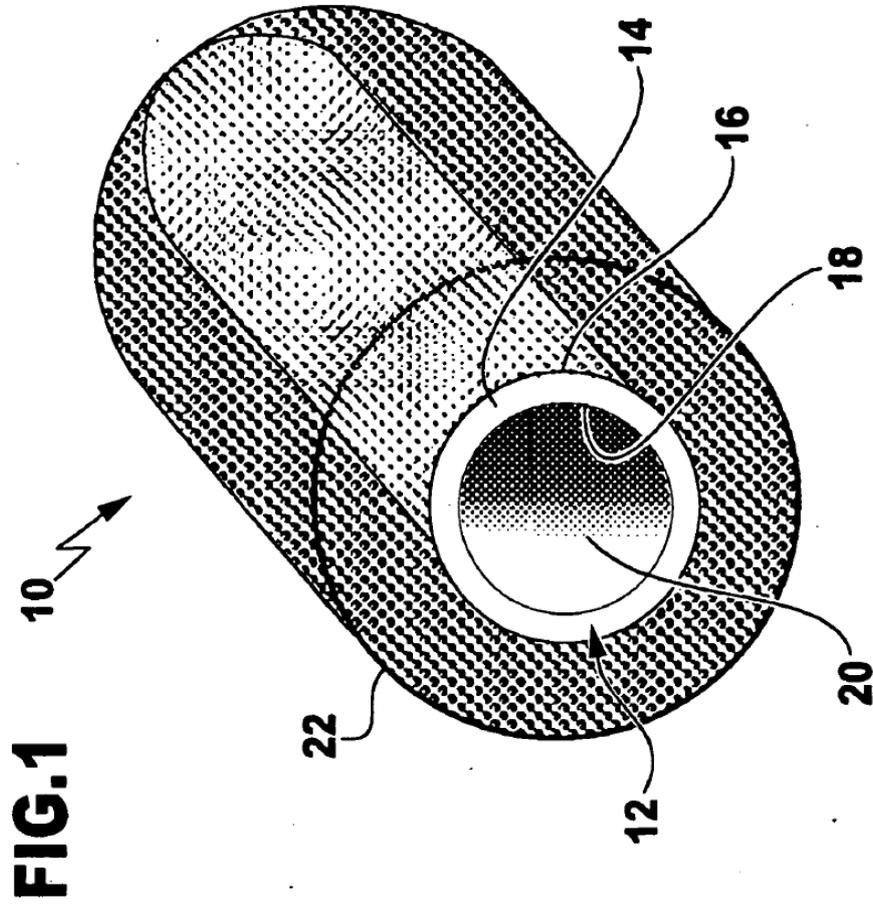
**Ejemplo 4: La propiedad semipermeable de un tubo de gelatina permite la supervivencia de células encapsuladas**

Se someterá a ensayo si sobreviven células en cuerpo moldeado en forma de tubo cerrado de gelatina (producido según el ejemplo 1, 1100  $\mu\text{m}$  de diámetro interno, grosor de pared 200  $\mu\text{m}$ , reticulado dos veces). Para ello se colocó el cuerpo moldeado durante una semana en PBS para lavarlo. A continuación se sembraron células de Schwann sobre tiras de plástico inertes, transparente, de 0,9 mm de ancho (lámina de copia no recubierta de la empresa folex imaging X-70 con un grosor de 0,1 mm). Las tiras de plástico se limpiaron previamente con el PlasmaCleaner, se recubrieron con poli-lisina y laminina (33  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 1 h a 37°C). Sobre la lámina se sembraron en primer lugar sobre el nervio ciático de rata células de Schwann aisladas (25.000 células/ $\text{cm}^2$ ) y se mantuvieron durante 24 h en cultivo. Después se prepararon neuronas individuales a partir de ganglios de la raíz dorsal del sistema nervioso periférico y se sembraron con una densidad de 10.000 células/ $\text{cm}^2$  sobre las tiras de plástico con las células de Schwann. Las neuronas pudieron adherirse durante 4 h, a continuación se introdujeron las tiras de plástico con las células sobre las mismas en el cuerpo moldeado de gelatina. No introducir las células directamente, sino sobre tiras de plástico transparentes, en los cuerpos moldeados, tenía la gran ventaja de que se podían retirar sin problema de nuevo posteriormente las tiras de plástico, para determinar con el microscopio la vitalidad celular. El cuerpo moldeado en forma de tubo se cerró entonces en los extremos con tapón de cera dental (Rosa Dura, Kem-Dent, GB) y se llevó a un cultivo durante 5 días. En estas condiciones nutrientes y oxígeno sólo podían llegar a través de la pared del cuerpo moldeado a las células. Después de 5 días de tiempo de cultivo se extrajeron las tiras de plástico del tubo y se marcaron con el anticuerpo SMI31 (Sternberger Monoclonals, EE.UU.) para detectar los axones y DAPI para detectar los núcleos celulares. Como control sirvieron tiras de plástico colonizadas con células, que se trataron exactamente del mismo modo, pero no se cultivaron encapsuladas, sino que se cultivaron en abierto durante 5 días en el mismo medio (DMEM, 10% de FCS, glutamina, gentamicina). Tal como puede observarse en las imágenes del microscopio óptico de la figura 10, las células / neuronas sobreviven por encima y por debajo del cuerpo moldeado de manera igualmente satisfactoria (figuras A y C). Esto puede observarse en los puntos claros. Así mismo, en ambas superficies se forman axones de manera igualmente satisfactoria (fibras claras en las figuras B y D). Las figuras A y B representan células de Schwann y axones de ganglio de la raíz dorsal del mismo cultivo, que esta encapsulado. Las figuras C y D se refieren al cultivo no encapsulado. Con ello se demostró que la permeabilidad de los tubos de gelatina era suficiente para permitir una supervivencia de células encapsuladas.

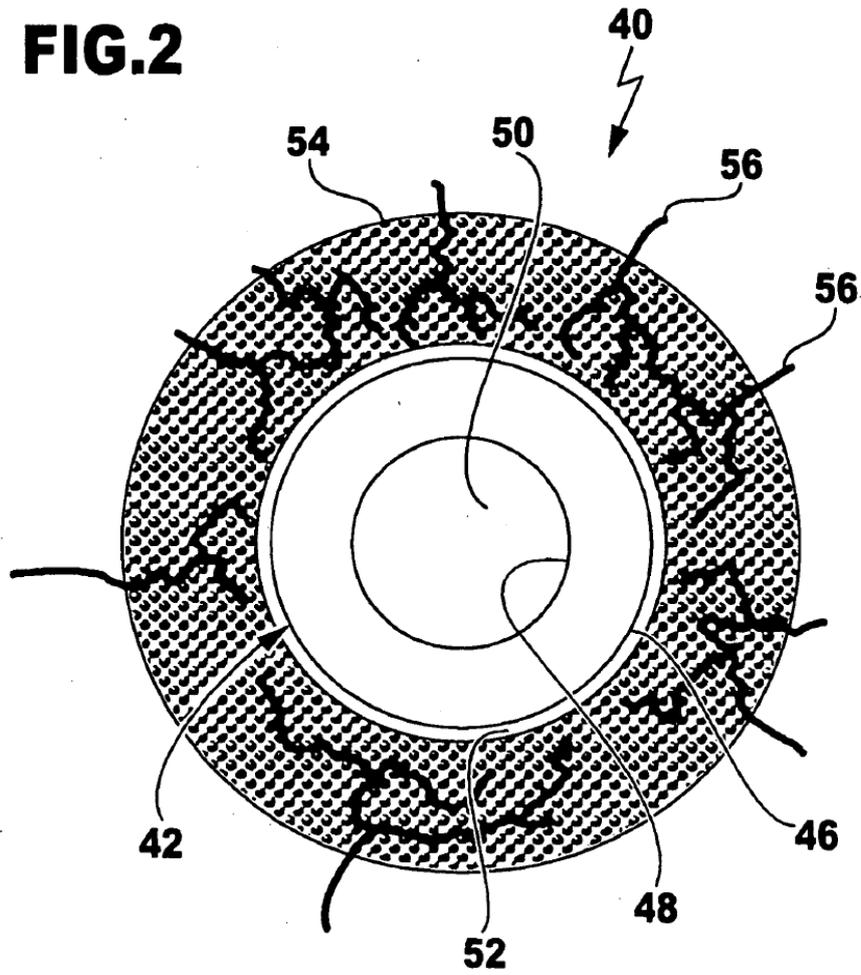
**REIVINDICACIONES**

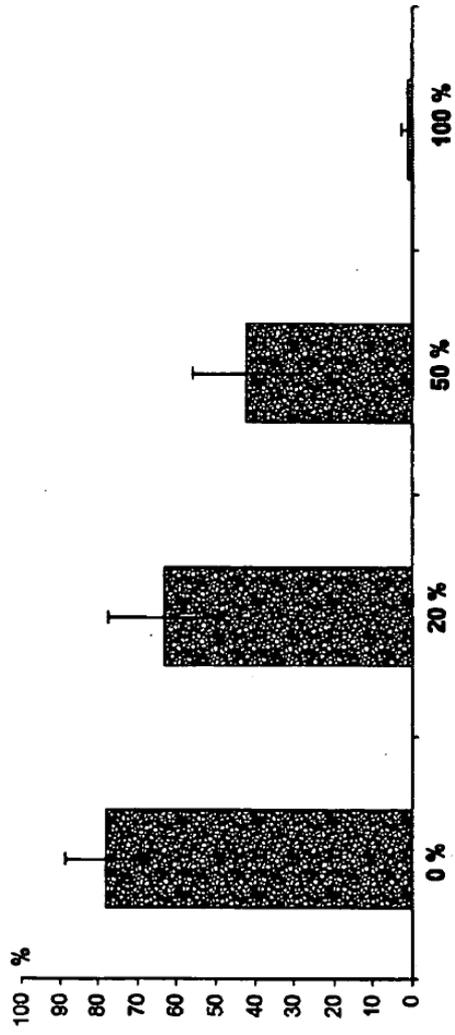
- 5 1. Canal guía de nervios, que comprende un cuerpo moldeado de un material a base de gelatina, reabsorbible, reticulado, en el que el cuerpo moldeado es un cuerpo hueco en forma de túbulo con una pared con una superficie exterior y una superficie interior que define una luz, comprendiendo el canal guía de nervios una capa semipermeable, que rodea la luz, y en el que
- 10 (i) el grado de reticulación del canal guía de nervios o sus partes, en particular su cuerpo moldeado, en un extremo del canal guía de nervios es mayor que en el otro extremo y disminuye en varias etapas o de manera esencialmente continua en dirección hacia este otro extremo; o
- (ii) el grado de reticulación del canal guía de nervios o sus partes, en particular su cuerpo moldeado, en sus extremos es menor que en la zona entre los extremos.
2. Canal guía de nervios de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** la capa semipermeable comprende una estructura de gel como barrera celular.
3. Canal guía de nervios de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** la capa semipermeable del canal guía de nervios presenta poros, que son de media menores de 0,5  $\mu\text{m}$ .
- 15 4. Canal guía de nervios de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** la capa semipermeable está diseñada de manera esencialmente impenetrable como capa de barrera para especies con carga positiva, en particular células.
5. Canal guía de nervios de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** la capa semipermeable presenta una hidrofilia extremadamente alta.
- 20 6. Canal guía de nervios de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** la capa semipermeable está diseñada de manera ligeramente hidrófoba.
7. Canal guía de nervios de acuerdo con la reivindicación 6, **caracterizado porque** la capa semipermeable, ligeramente hidrófoba comprende gelatina modificada con ésteres de ácido graso.
- 25 8. Canal guía de nervios de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizado porque** el canal guía de nervios o su cuerpo moldeado presenta sobre la superficie exterior proteínas de repulsión inmovilizadas.
9. Canal guía de nervios de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 8, **caracterizado porque** el canal guía de nervios comprende un material de refuerzo.
10. Canal guía de nervios de acuerdo con la reivindicación 9, **caracterizado porque** el material de refuerzo se selecciona de materiales de refuerzo particulados y/o moleculares.
- 30 11. Canal guía de nervios de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 10, **caracterizado porque** el cuerpo moldeado está diseñado en varias capas.
12. Canal guía de nervios de acuerdo con la reivindicación 11, **caracterizado porque** el cuerpo moldeado comprende la capa semipermeable.
- 35 13. Canal guía de nervios de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 12, **caracterizado porque** el cuerpo moldeado está estirado en dirección de su eje longitudinal.
14. Canal guía de nervios de acuerdo con la reivindicación 13, **caracterizado porque** la relación de estiramiento vale de 1,4 a 8.
15. Canal guía de nervios de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 14, **caracterizado porque** la luz del cuerpo moldeado contiene uno o varios elementos guía orientados en dirección longitudinal del cuerpo moldeado.
- 40 16. Canal guía de nervios de acuerdo con la reivindicación 15, **caracterizado porque** los elementos guía están colonizados con células auxiliares, en particular células de Schwann.
17. Canal guía de nervios de acuerdo con la reivindicación 15 o 16, **caracterizado porque** los elementos guía comprenden microfilamentos.
- 45 18. Canal guía de nervios de acuerdo con la reivindicación 17, **caracterizado porque** los microfilamentos presentan ranuras longitudinales sobre su superficie exterior.
19. Canal guía de nervios de acuerdo con una de las reivindicaciones 16 a 18, **caracterizado porque** un elemento guía en forma de una bobina de material plano con un eje de arrollamiento en paralelo a la dirección longitudinal del cuerpo moldeado está dispuesto en la luz, estando diseñada en la bobina en paralelo al eje de arrollamiento una pluralidad de microcanales.

20. Canal guía de nervios de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 19, **caracterizado porque** el canal guía de nervios comprende varios cuerpos moldeados en disposición paralela.
21. Canal guía de nervios de acuerdo con la reivindicación 20, **caracterizado porque** los varios cuerpos moldeados están unidos entre sí por medio de un material de matriz reabsorbible.
- 5 22. Canal guía de nervios de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 21, **caracterizado porque** el canal guía de nervios comprende una envoltura exterior reabsorbible que rodea el o los cuerpo(s) moldeado(s), en particular con una estructura porosa.
- 10 23. Canal guía de nervios de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 22, **caracterizado porque** puede usarse para puentear tramos defectuosos de nervio, en particular después de prostatectomías, lesiones de nervios faciales como consecuencia de extracciones dentales y lesiones de la médula espinal.
24. Canal guía de nervios de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 22, **caracterizado porque** puede usarse para la inducción de nuevas vías nerviosas, en particular para la derivación de nervios hacia músculos para evitar una formación dolorosa de neuromas.

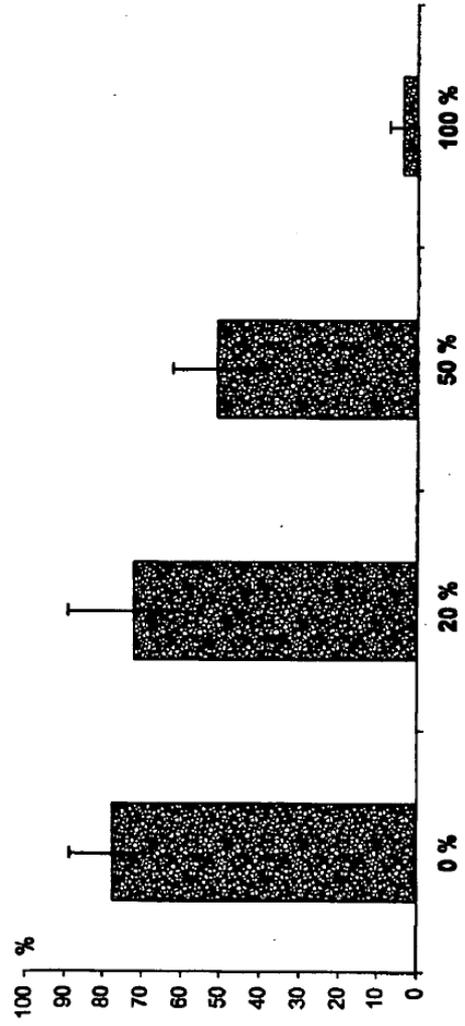


**FIG.2**





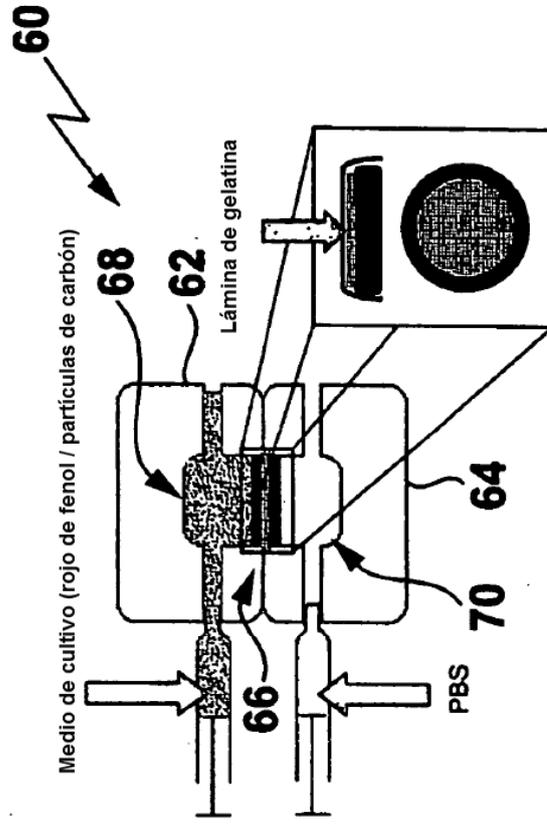
**FIG.3**



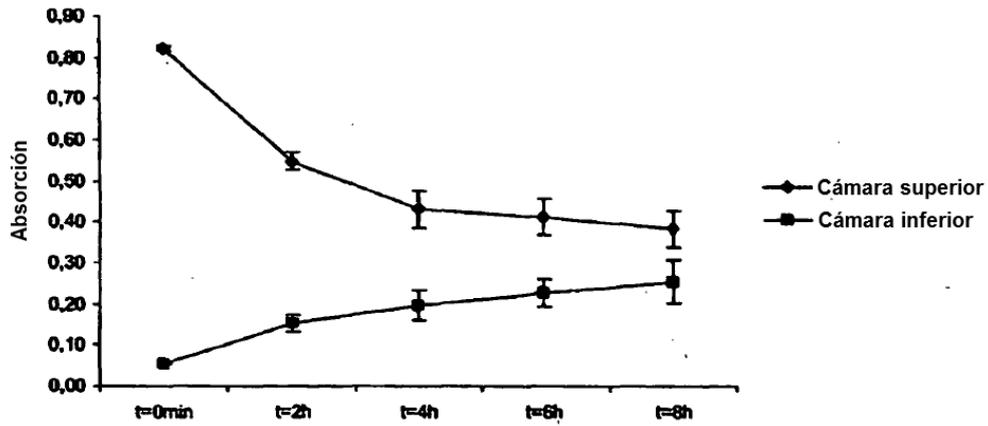
**FIG.4**

**FIG.5**

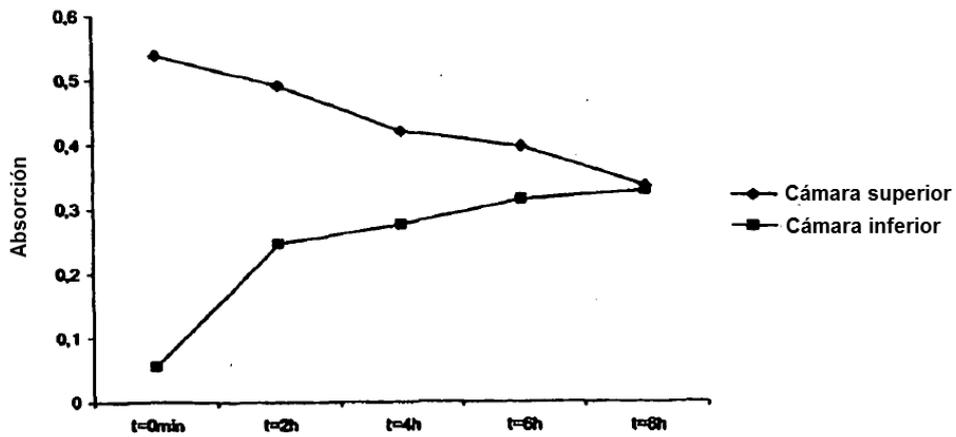
- Modelo de dos cámaras
- Pro Ensayo: Modelo de 4 cámaras
- Medir cada 2 h las muestras de un modelo en el fotómetro: 58 nm  
Partículas de carbono: 600 nm



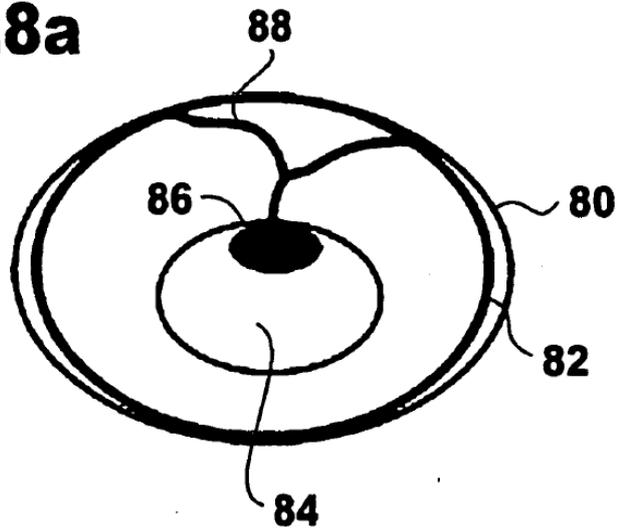
Difusión (Rojo de fenol) **FIG.6**



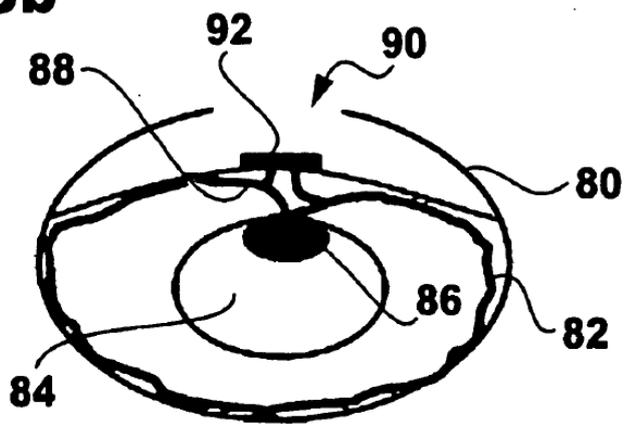
Difusión (Rojo de fenol) **FIG.7**

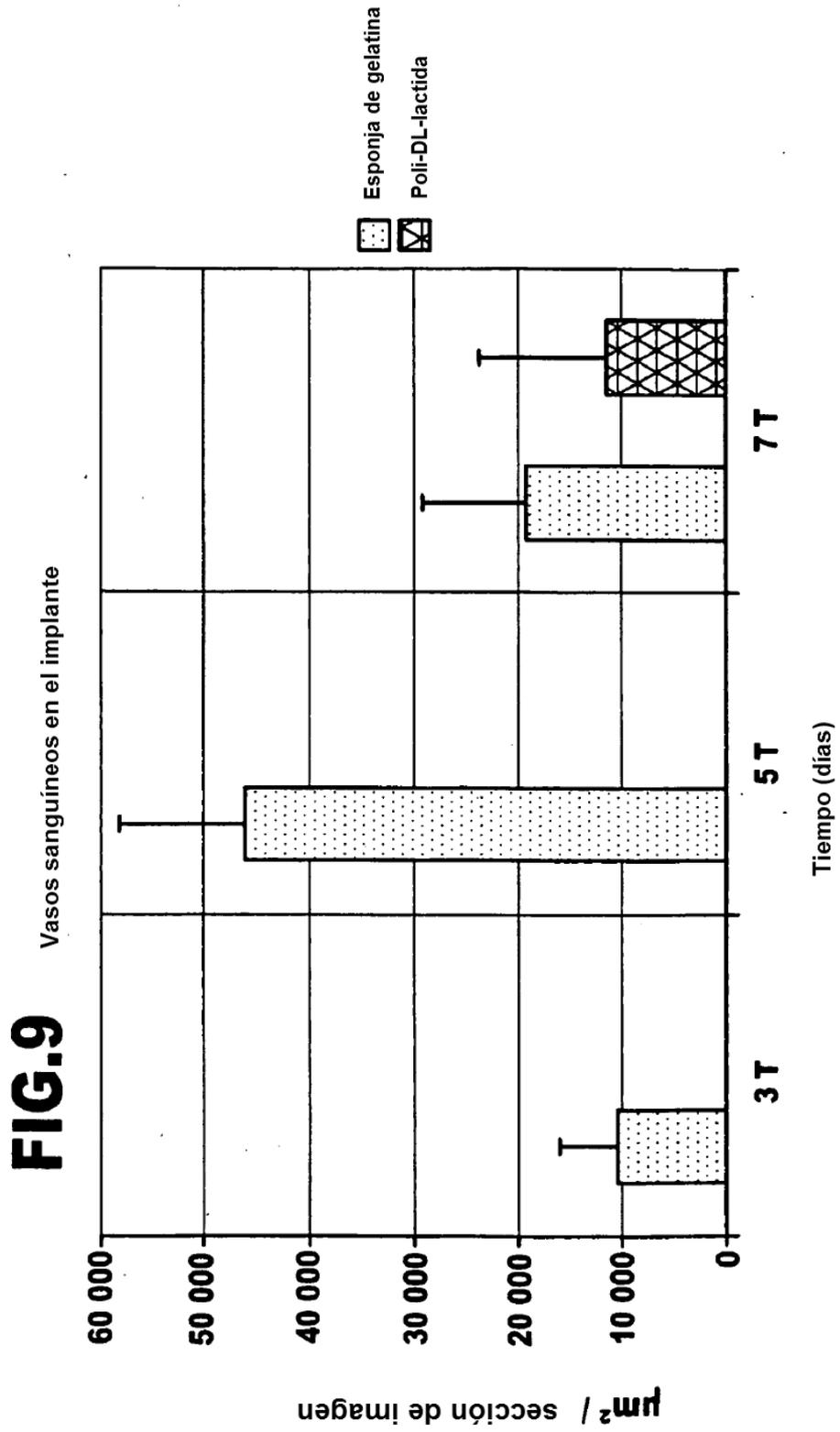


**FIG.8a**



**FIG.8b**





**FIG.10**

