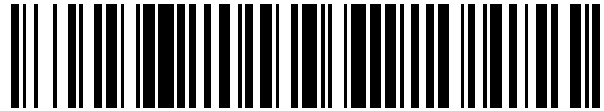


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 555 978**

51 Int. Cl.:

A61L 27/00 (2006.01)

A61L 27/24 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.02.2009 E 09839205 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.12.2015 EP 2404622**

54 Título: **Tubo inductor de la regeneración nerviosa**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.01.2016

73 Titular/es:

**TOYOBO CO., LTD. (100.0%)
2-8, Dojima Hama 2-chome, Kita-ku
Osaka-shi, Osaka 530-8230, JP**

72 Inventor/es:

**SUZUKI, MICHIKO;
KAJII, FUMIHIKO;
TANAKA, HIDENORI y
KASHIWABARA, SUSUMU**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 555 978 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

Tubo inductor de la regeneración nerviosa

Campo técnico de la invención

5 La presente invención se refiere a un tubo inductor de la regeneración nerviosa mediante el cual un nervio periférico cortado o escindido por un accidente o una operación quirúrgica es reconectado utilizando la elongación de las células nerviosas. Más particularmente, la presente invención se refiere a un tubo inductor de la regeneración nerviosa en donde se utiliza colágeno como un andamio para la regeneración nerviosa, y en donde los tejidos nerviosos cortados o escindidos son fijados en su dirección extendida y son conectados entre sí sin que resulten inhibidos por tejidos circundantes.

10 Hay muchos ejemplos en los que el daño del nervio periférico causado por un accidente o similar no puede ser completamente restaurado. Hay también muchos ejemplos clínicos en donde se debe escindir un nervio periférico como resultado de operaciones quirúrgicas en general. En el daño de nervios periféricos, el injerto de nervios autólogos ha sido el único medio además de la anastomosis directa. Sin embargo, el resultado de los mismos no es siempre satisfactorio ya que la recuperación de la percepción sensorial y la capacidad para la locomoción son malas y se nota además la secuela debida a un control erróneo. Además, hay muchos pacientes que se quejan no sólo de secuelas tales como dolor y deficiencia en la percepción sensorial, sino también de la anormal percepción sensorial de la zona enferma o, particularmente, de dolor.

20 Desde principios de los años 1980 se ha llevado enérgicamente a cabo un intento para la regeneración del nervio mediante la conexión de huecos de nervio periférico usando un tubo conector hecho de materiales artificiales. Sin embargo, todos los estudios sobre canales conectores usando materiales artificiales sintéticos no absorbentes han terminado en fracaso. Con objeto de solucionar lo anterior, es necesario considerar elementos tales como que se evite la invasión de tejidos conjuntivos del exterior durante la regeneración de haces nerviosos, que es necesario el intercambio de sustancias dentro y fuera de los canales o la neogénesis de vasos sanguíneos capilares en las paredes de los canales, que es necesaria una sustancia que actúe como un andamio adecuado para el crecimiento de células de Schwann y axones en el canal y que, después de la regeneración, se degrade y absorba el material empleado. Teniendo en cuenta estas condiciones, a partir de entonces se han llevado a cabo estudios para un tubo artificial conector de nervios mediante un material biodegradable y bioabsorbible.

30 En cuanto a la regeneración del nervio periférico, desde que en 1982 se presentó un modelo de tubo de silicona, se han realizado intentos para ampliar la distancia entre los muñones que pueden ser regenerados usando un tubo de silicona. Sin embargo, puesto que no se pueden filtrar nutrientes a través de la pared del tubo de silicona, se presenta el problema de que los nutrientes no son suficientemente proporcionados al axón nervioso, por lo que no se puede producir un vaso sanguíneo capilar en silicona, y no se ha dispuesto de una regeneración nerviosa satisfactoria ni siquiera cuando se ha empleado un tubo de silicona. Además, incluso si se puede regenerar el nervio, está el problema de que el tubo de silicona es en cualquier caso una sustancia extraña que debe ser eliminada por medio de otra operación quirúrgica, etcétera.

35 Por otro lado, se ha intentado la regeneración del nervio periférico utilizando un tubo que comprende un polímero biodegradable en lugar de un tubo de silicona. Cuando se utiliza un tubo para regeneración nerviosa que comprende un polímero biodegradable, el tubo para regeneración nerviosa es gradualmente degradado y absorbido *in vivo* por hidrólisis o por la acción de enzimas una vez que se ha regenerado el nervio, por lo que no hay necesidad de extraerlo por un medio tal como otra operación quirúrgica.

40 En cuanto a un tubo para regeneración nerviosa que comprende un polímero biodegradable como tal, hay una descripción en, por ejemplo, el Documento 1 de Patente de un material auxiliar para regeneración nerviosa que comprende haces de fibra de colágeno revestida con laminina y fibronectina. En el Documento 2 de Patente hay una descripción de un tubo que comprende materiales biodegradables y bioabsorbibles y, en la luz del tubo, un cuerpo de colágeno que tiene huecos y que penetra en el tubo casi en paralelo a la línea axial de dicho tubo, en donde el hueco está lleno de un gel matricial que contiene colágeno, laminina, etcétera. En el Documento 3 de Patente hay una descripción de un tubo nervioso artificial que comprende un tubo que comprende materiales biodegradables y bioabsorbibles y haces de fibra de colágeno revestida con laminina insertados en la luz del tubo casi en paralelo a la línea axial del tubo. En el Documento 4 de Patente hay una descripción de un material sustrato para la reconstrucción de nervios que tiene una estructura en la que fibras que comprenden un material bioabsorbible forman haces. En el Documento 5 de Patente hay una descripción de un soporte tal como una esponja, tubo o rollo que comprende colágeno. En el Documento 6 de Patente hay una descripción de un soporte que está compuesto de una matriz fina y esponjosa que comprende un material biodegradable o un material bioabsorbible y una vía de inducción de tejidos lineal o una vía de inducción de órganos lineal. En el Documento 7 de Patente hay una descripción de un tubo para regeneración nerviosa que contiene una esponja que comprende un material de polímero biodegradable y un material de refuerzo que comprende un polímero biodegradable que tiene un periodo de degradación y absorción más prolongado que el de dicha esponja, en donde la cara interior del mismo comprende esponja.

En todos esos tubos para regeneración nerviosa se utiliza colágeno como un andamio para la regeneración nerviosa, pero la propiedad adhesiva, la propiedad de crecimiento celular y la propiedad inductora de diferenciación del colágeno con respecto a las células nerviosas no son satisfactorias.

Documento 1 de Patente: Solicitud de Patente Japonesa (JP-A) abierta a inspección pública, nº 237139/93.

5 Documento 2 de Patente: WO 98/22155.

Documento 3 de Patente: WO 99/63908.

Documento 4 de Patente: Solicitud de Patente Japonesa (JP-A) abierta a inspección pública, nº 2000-325463.

Documento 5 de Patente: Solicitud de Patente Japonesa (JP-A) abierta a inspección pública, nº 2001-70436.

Documento 6 de Patente: Solicitud de Patente Japonesa (JP-A) abierta a inspección pública, nº 2002-320630.

10 Documento 7 de Patente: Solicitud de Patente Japonesa (JP-A) abierta a inspección pública, nº 2003-19196.

Descripción de la invención

Problema que ha de solventar la invención

15 La presente invención ha sido ideada a la vista del estado actual de la técnica previa como tal, y su objeto es proporcionar un tubo inductor de la regeneración nerviosa en el que, como un andamio para la regeneración nerviosa, se emplee un colágeno que tenga una propiedad adhesiva, una propiedad de crecimiento celular y una propiedad inductora de diferenciación excelentes con respecto a las células nerviosas.

Medio para solventar el problema

20 Con la finalidad de alcanzar dicho objeto, el presente inventor ha investigado un método para producir el colágeno que se emplea como un andamio de regeneración nerviosa y, como resultado, el presente inventor ha hallado que el cloruro sódico que está inevitablemente contaminando en las fases de lavado y precipitación salina durante la producción de colágeno a partir de materiales tales como la piel de cerdo afecta negativamente a la regeneración de las células nerviosas y que, cuando se emplea colágeno en el que está reducida la concentración de cloruro sódico, se potencian el crecimiento de las células nerviosas y la elongación de la neurita, con lo cual se ha completado la presente invención.

25 Por lo tanto, la presente invención se refiere, en un tubo inductor de la regeneración nerviosa de acuerdo con la Reivindicación 1 en el que se emplea colágeno como un andamio para la regeneración nerviosa, a un tubo inductor de la regeneración nerviosa que se caracteriza por que se utiliza un colágeno que ha sido purificado con objeto de hacer que la concentración del cloruro sódico contenido en él no sea superior a 2,0% en peso o, preferiblemente, de 0,1 a 1,5% en peso en estado seco.

30 En una realización preferida del tubo inductor de la regeneración nerviosa de la presente invención, la purificación del colágeno se lleva a cabo por medio de una precipitación isoeléctrica en la que el pH es 6,0 o superior y es inferior a 10,0, el tubo inductor de la regeneración nerviosa se forma revistiendo con colágeno un cuerpo tubular que comprende un polímero biodegradable y llenando el cuerpo tubular con el colágeno, el polímero biodegradable se selecciona del grupo que consiste en poli(ácido glicólico), poli(ácido láctico) y un copolímero de ácido láctico con caprolactona, y el cuerpo tubular tiene un diámetro interno de 0,1 a 20 mm, un diámetro externo de 0,15 a 25 mm y una longitud de 1,0 a 150 mm.

Ventajas de la invención

40 De acuerdo con la presente invención, se utiliza colágeno puro en el que la concentración del cloruro sódico que está inevitablemente contaminando durante las operaciones de producción de colágeno está reducida a no más de 2% en peso, por lo que ahora es posible proporcionar un tubo inductor de la regeneración nerviosa que tenga una propiedad adhesiva, una propiedad de crecimiento celular y una propiedad inductora de diferenciación excelentes con respecto a las células nerviosas.

Breve descripción de los dibujos

45 La Figura 1 es una fotografía microscópica que muestra el estado de células en gel de colágeno en el ejemplo de la invención.

La Figura 2 es una fotografía microscópica que muestra el estado de células en gel de colágeno en el ejemplo comparativo.

La Figura 3 es un gráfico de la absorción (valores relativos) medida en el Experimento 1.

La Figura 4 es un gráfico de la absorción (valores relativos) medida en el Experimento 2.

En la Figura 5 se muestran los detalles de los revestimientos de colágeno 1 a 6 usados en el Experimento 3.

La Figura 6 es un gráfico de la absorción (valores relativos) medida en el Experimento 3.

La Figura 7 es un gráfico de la absorción (valores relativos) medida en el Experimento 3.

5 La Figura 8 es una fotografía microscópica que muestra el estado de la diferenciación de células cultivadas en una placa con revestimiento de colágeno (pH de 5,5) del Experimento 4.

La Figura 9 es una fotografía microscópica que muestra el estado de la diferenciación de células cultivadas en una placa con revestimiento de colágeno (pH de 8,5) del Experimento 4.

La Figura 10 es una fotografía microscópica que muestra el estado de la diferenciación de células cultivadas en una placa con revestimiento de colágeno (pH de 10,2) del Experimento 4.

10 La Figura 11 es un gráfico de la proporción de diferenciación celular después de un cultivo durante cuatro días, medida en el Experimento 4.

La Figura 12 es un gráfico de la proporción de diferenciación celular después de un cultivo durante once días, medida en el Experimento 4.

Mejor modo de llevar la invención a cabo

15 El tubo inductor de la regeneración nerviosa de la presente invención se caracteriza por que en él se emplea, como un andamio para la regeneración nerviosa, un colágeno que ha sido purificado con objeto de hacer que la concentración del cloruro sódico que lo contamina durante las operaciones de producción de colágeno no sea superior a 2% en peso en estado seco.

20 Puesto que el colágeno desempeña un papel de sustrato para diversas clases de células, su afinidad por los tejidos es buena cuando se aplica a cuerpos vivos como un material médico, por lo que ya ha sido empleado como un andamio para el crecimiento de células nerviosas.

25 El colágeno convencional utilizado como un andamio para la regeneración nerviosa se prepara normalmente del modo siguiente. De esta manera, se emplea como material de partida la piel de cerdo recogida y congelada en una factoría para análisis de carne, se añade a la misma una proteasa neutra, lo que va seguido de calentamiento, la mezcla se lava repetidamente con una disolución de cloruro sódico, se deshidrata, se lava con isopropanol y acetona y se seca *in vacuo*, se añade el trocito desgrasado resultante a una disolución de ácido acético, se ajusta el pH empleando ácido clorhídrico, se añade pepsina a la mezcla para descomposición, se añade una disolución de hidróxido sódico para ajustar el pH a un valor elevado (operación 1 para inactivación de virus), se añade ácido clorhídrico para ajustar el pH a un valor bajo (operación 2 para inactivación de virus), se ajusta el pH a un valor de 2 a 3 utilizando hidróxido sódico, lo que va seguido de filtración, se añade una disolución de cloruro sódico al producto de filtración para precipitación salina, se lleva a cabo una operación de concentración por medio de separación centrífuga, se añade el producto concentrado a agua pura y se disuelve en ella, se añade a la disolución una disolución de cloruro sódico una vez más para precipitación salina y se concentra la mezcla por medio de separación centrífuga, lo que va seguido de liofilización.

35 El colágeno convencionalmente utilizado incluye como tal las operaciones de lavado con una disolución de cloruro sódico y de precipitación salina usando una disolución de cloruro sódico durante su proceso de fabricación, por lo que la concentración de cloruro sódico en el colágeno, incluyendo aquél que está disponible en el mercado, es 4% en peso o más. Los presentes inventores pensaron que la concentración de cloruro sódico en el colágeno afecta a la vida y el crecimiento de las células nerviosas y que, cuando la concentración es demasiado elevada, la membrana celular resulta destruida a causa de la presión osmótica. Por lo tanto, cuando el colágeno que se purifica con objeto de reducir la concentración del cloruro sódico contenido en él se emplea para un tubo inductor de la regeneración nerviosa, el resultante tubo inductor de la regeneración nerviosa alcanza una propiedad de adhesión celular y una propiedad de crecimiento celular mucho mejores que las de uno en que se emplea el colágeno convencional. Basándose en el hallazgo como tal, en la presente invención se utiliza colágeno puro en el que la concentración del cloruro sódico contenido en él, en términos de un estado seco, ha sido reducida a 2,0% en peso o menos, preferiblemente de 0,1 a 1,5% en peso, como un andamio del tubo inductor de la regeneración nerviosa. La concentración de cloruro sódico se mide por medio de espectrofotometría de absorción atómica (por conversión en ceniza). Con la finalidad de prevención de la destrucción de la membrana celular por reducción de la presión osmótica, cuanto menor sea la concentración de cloruro sódico, mejor. Sin embargo, teniendo en cuenta el punto de vista técnico y la estabilidad del colágeno, el límite inferior será aproximadamente 0,1% en peso. Como un método para reducir la concentración de sal, están un método de precipitación (concentración) isoeléctrica como el descrito más adelante y un método de diálisis.

55 La medición de la concentración de cloruro sódico por medio de espectrofotometría de absorción atómica se lleva a cabo de tal modo que se ponen de 1 a 4 g de una muestra en un vaso de precipitados de cuarzo, la muestra se carboniza mediante una elevación gradual de la temperatura sobre un calentador eléctrico y se transforma

finalmente en cenizas por tratamiento en un horno de mufla durante un periodo de 6 a 8 horas (500 °C), se redisuelve el residuo en una disolución acuosa de ácido clorhídrico al 10% en peso y se diluye la disolución para llevar la concentración final a 1% en peso, y luego se lleva a cabo la medición por medio de una espectrofotometría de absorción atómica con llama usando acetileno y aire. La longitud de onda de medición es 589,6 nm.

5 El colágeno utilizado en el tubo inductor de la regeneración nerviosa de la presente invención puede ser producido mediante cualquiera de los métodos convencionalmente conocidos y, por ejemplo, puede ser producido de tal modo que se utiliza como material de partida el colágeno convencional que ha estado disponible en el mercado para uso médico, como se mencionó anteriormente, y se disuelve en agua destilada para inyección bajo enfriamiento a una temperatura de 2 a 10 °C, se somete la disolución a un ajuste del pH dentro de un intervalo de 6,0 a menos de 10,0
10 usando una disolución de hidróxido sódico, se somete la disolución a una precipitación isoelectrónica y se centrifuga, se desecha el líquido sobrenadante y se liofiliza el precipitado. Los presentes inventores hallaron que se puede presentar una propiedad inductora de la diferenciación celular muy superior al utilizar un colágeno que tiene dicho intervalo de puntos isoelectrónicos, con lo cual se completa la presente invención. Aunque no está clara la razón detallada de por qué la propiedad inductora de la diferenciación celular resulta potenciada mediante el uso de un colágeno que tiene un punto isoelectrónico de 6,0 a menos de 10,0 como un andamio para la regeneración nerviosa, existe la posibilidad de que la fracción precipitada cuando el pH es inferior a 6,0 o es 10,0 o más contenga un factor que tiene baja afinidad por las células y, por el contrario, es también probable que el colágeno precipitado cuando el pH es de 6,0 a menos de 10,0 tenga una afinidad particularmente elevada por las células. Alternativamente, el colágeno no purificado está constituido por colágeno de tipo I y colágeno de tipo III en una proporción de aproximadamente 7:3, y puede haber una influencia al cambiar esta proporción constitutiva de tipo I a tipo III. En la presente invención, el intervalo de puntos isoelectrónicos es más preferiblemente un pH de 7,0 a menos de 9,5, y más preferiblemente un pH de 8,0 a menos de 9,0.

El tubo inductor de la regeneración nerviosa de la presente invención puede ser fabricado mediante los métodos convencionalmente conocidos y, por ejemplo, puede ser formado de tal modo que se reviste con colágeno un cuerpo tubular que comprende un polímero biodegradable y luego se llena el área interna del cuerpo tubular con el colágeno. Aunque el tamaño del cuerpo tubular puede variar dependiendo del sitio del nervio que se va a regenerar y también de la resistencia necesaria para el mismo, es habitual que el diámetro interno sea de 0,1 a 20 mm, el diámetro externo sea de 0,15 a 25 mm y la longitud sea de 1,0 a 150 mm. En realidad, se prefiere preparar previamente en diversos tamaños los tubos inductores de la regeneración nerviosa que comprenden cuerpos tubulares a la vista de la restricción temporal y el coste de producción.

Los ejemplos del polímero biodegradable que constituye el cuerpo tubular incluyen poli(ácido glicólico), poli(ácido láctico), un copolímero de ácido láctico-caprolactona, un copolímero de ácido glicólico-caprolactona, polidioxanona y ácido glicólico-ácido trimetilencarboxílico. A la vista de su disponibilidad y su manipulación sencillas, se prefiere emplear poli(ácido glicólico), poli(ácido láctico) o un copolímero de ácido láctico-caprolactona, y se prefiere emplear particularmente poli(ácido glicólico). Cada uno de estos polímeros biodegradables puede ser utilizado solo, o se pueden utilizar dos o más de los mismos mediante mezclado. Si el colágeno utilizado en la preparación del tubo inductor de la regeneración nerviosa es purificado por medio de una precipitación isoelectrónica como se define en las reivindicaciones, el polímero biodegradable que constituye el cuerpo tubular es entonces un único polímero biodegradable seleccionado de entre poli(ácido glicólico), poli(ácido láctico), un copolímero de ácido láctico-caprolactona, un copolímero de ácido glicólico-caprolactona, polidioxanona, y ácido glicólico-ácido trimetilencarboxílico.

En cuanto al cuerpo tubular, se puede utilizar un cuerpo en donde el polímero biodegradable anteriormente mencionado se ha convertido en un cuerpo tubular poroso o un cuerpo en donde múltiples fibras ultrafinas del polímero biodegradable anteriormente mencionado han sido dispuestas en haces y luego han sido tejidas en forma tubular. El tamaño de los poros y la fracción de huecos del elemento poroso y el tipo de punto (mallas) se pueden ajustar apropiadamente dependiendo del uso y la resistencia pretendidos.

Se prefiere que el diámetro de la fibra ultrafina que comprende el polímero biodegradable sea de 1 a 50 μm . Cuando el diámetro de la fibra es demasiado pequeño, el espacio de las fibras se vuelve denso, por lo que puede suceder que el colágeno apenas se filtre en el cuerpo tubular o que disminuya la flexibilidad del cuerpo tubular. Por el contrario, cuando el diámetro de la fibra es demasiado grande, la cantidad retenida de colágeno se vuelve pequeña, por lo que puede suceder que no aumente la velocidad de crecimiento del nervio o que la resistencia del cuerpo tubular se vuelva insuficiente. Más preferiblemente, el diámetro de la fibra ultrafina es de 3 a 40 μm , y más preferiblemente de 6 a 30 μm .

En la formación del cuerpo tubular, se prefiere que de 5 a 60 de las fibras ultrafinas que comprenden el polímero biodegradable y que tienen el anterior diámetro se dispongan en haces y se tejan alternativamente en forma de urdimbres y tramas. Cuando los números de las fibras ultrafinas que se van a disponer en haces son demasiado pequeños, puede suceder que la resistencia del cuerpo tubular se vuelva insuficiente o que no se pueda asegurar una suficiente cantidad retenida de colágeno. Por el contrario, cuando los números de las fibras ultrafinas que se van a disponer en haces son demasiados, puede suceder que no se pueda preparar un cuerpo tubular de diámetro fino o que no se pueda asegurar la flexibilidad del cuerpo tubular. Más preferiblemente, los números de las fibras ultrafinas son de 10 a 50, y más preferiblemente de 20 a 40.

5 Cuando se forma un cuerpo tubular mediante una tejedura alterna de los haces de fibras ultrafinas, se prefiere que el tamaño de los poros de la red sea aproximadamente de 5 a 300 μm , y más preferiblemente de 10 a 200 μm . Cuando el tamaño de los poros de la red es demasiado pequeño, puede suceder que el crecimiento de las células y los tejidos resulte inhibido a causa de la reducción de la invasión de vasos sanguíneos capilares o a causa de la reducción de la permeabilidad del agua. Cuando es superior a aproximadamente 300 μm , la invasión de los tejidos se vuelve excesiva, por lo que el crecimiento de las células y los tejidos puede resultar inhibido.

10 En la presente invención, se reviste la superficie externa del cuerpo tubular aplicando varias veces una disolución de colágeno mediante un método que es conocido entre las personas expertas en la técnica, mientras que se llena la zona interna (la luz) del cuerpo tubular cargando colágeno en ella. La disolución de colágeno utilizada en este proceso puede contener laminina, proteoglicano de sulfato de heparán, entactina y factor de crecimiento. Los ejemplos del factor de crecimiento incluyen el factor de crecimiento epidérmico (EGF; del inglés, epidermal growth factor), el factor de crecimiento de fibroblastos (β FGF; del inglés, fibroblast growth factor), el factor de crecimiento nervioso (NGF; del inglés, nerve growth factor), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF; del inglés, platelet-derived growth factor), el factor 1 de crecimiento de tipo insulina (IGF-1; del inglés, insulin-like growth factor 1) y el factor β de crecimiento transformante (TGF- β ; del inglés, transforming growth factor- β). Con respecto a la disolución de colágeno, se prefiere que, después de cada aplicación de la misma en forma de una disolución en ácido clorhídrico usando una brocha o un pincel, se deje que se seque completamente la disolución y luego se lleve a cabo la siguiente aplicación, por medio de lo cual se realiza una pluralidad de aplicaciones.

20 Se prefiere que el cuerpo tubular que se reviste o llena de colágeno sea sometido a tratamientos de congelación, liofilización y entrecruzamiento para entrecruzar el colágeno. La congelación se lleva a cabo bajo la condición de preferiblemente -10 a -196 $^{\circ}\text{C}$, y más preferiblemente de -20 a -80 $^{\circ}\text{C}$, durante un periodo de 3 a 48 horas. Como resultado de la congelación, se forma un fino hielo entre las moléculas de colágeno y en la disolución de colágeno se produce una separación de fases que da lugar a una esponja. Después de esto, la anterior disolución de colágeno congelada es liofilizada *in vacuo* a una temperatura inicial de -40 a -80 $^{\circ}\text{C}$ y durante un periodo de aproximadamente 25 12 a 48 horas. Como resultado de la liofilización, se evapora el fino hielo entre las moléculas de colágeno y, al mismo tiempo, la esponja de colágeno se vuelve fina. Los ejemplos del método de entrecruzamiento incluyen entrecruzamiento por rayos γ , entrecruzamiento por radiación ultravioleta, entrecruzamiento por rayos electrónicos, entrecruzamiento por deshidratación térmica, entrecruzamiento con glutaraldehído, entrecruzamiento epoxídico y entrecruzamiento con carbodiimida soluble en agua, y, entre estos, se prefiere un entrecruzamiento por 30 deshidratación térmica en el que el grado de entrecruzamiento puede ser fácilmente controlado y el cuerpo vivo no resulta afectado ni siquiera al llevarse a cabo el tratamiento de entrecruzamiento. El entrecruzamiento por deshidratación térmica se lleva a cabo *in vacuo* a una temperatura, por ejemplo, de aproximadamente 105 a 150 $^{\circ}\text{C}$, más preferiblemente de aproximadamente 120 a 150 $^{\circ}\text{C}$, y más preferiblemente de aproximadamente 140 $^{\circ}\text{C}$, durante un periodo de aproximadamente 6 a 24 horas, más preferiblemente de aproximadamente 6 a 12 horas, y 35 más preferiblemente de aproximadamente 12 horas. Cuando la temperatura de entrecruzamiento es demasiado elevada existe la posibilidad de que se reduzca la resistencia del material biodegradable y bioabsorbible, mientras que, cuando es demasiado baja, existe la posibilidad de que no tenga lugar una suficiente reacción de entrecruzamiento.

Ejemplos

40 A continuación se mostrarán experimentos que demuestran realmente la superioridad del colágeno de la presente invención.

Medición de la concentración de cloruro sódico

45 La medición de la concentración de cloruro sódico por espectrometría de absorción atómica se lleva a cabo de tal modo que se ponen de 1 a 4 g de una muestra en un vaso de precipitados de cuarzo, y la muestra se carboniza sobre un calentador eléctrico elevando gradualmente la temperatura y se transforma finalmente en cenizas en un horno de mufla durante un periodo de 6 a 8 horas (500 $^{\circ}\text{C}$). El residuo es rediseuelto en una disolución acuosa de ácido clorhídrico al 10% en peso, y la disolución es diluida para llevar la concentración final a 1% en peso y es sometida a la medición por medio de un método de absorción atómica con llama usando acetileno-aire. Por cierto, la longitud de onda de medición es 589,6 nm.

50 Experimento 1: Experimento para la incubación de gel de colágeno

1. Objeto de este experimento

55 Normalmente, en los experimentos de incubación de células es fundamental una incubación bidimensional sobre el fondo de una placa de pocillos. Sin embargo, se ha dicho que, cuando se lleva a cabo una incubación tridimensional, el comportamiento de las células es muy diferente de aquél en el caso de la incubación bidimensional y, al evaluar la regeneración nerviosa, se ha creído que la incubación tridimensional es un sistema que está más próximo al sistema real. En consecuencia, en este experimento se lleva a cabo una incubación tridimensional usando gel de colágeno con la finalidad de confirmar si el comportamiento de las células incubadas es diferente dependiendo del tipo del colágeno.

2. Colágeno utilizado en este experimento

(1) Colágeno para los ejemplos comparativos

5 Como un colágeno para los ejemplos comparativos se usó "NMP Collagen PS", fabricado por Nippon Ham. Este colágeno para los ejemplos comparativos se fabrica de tal modo que se emplea piel de cerdo como material de partida y se somete a los tratamientos de desgrase y purificación. El tratamiento de desgrase incluye repetidas operaciones de lavado usando una disolución de cloruro sódico, mientras que el tratamiento de purificación incluye una operación de precipitación salina usando cloruro sódico. Cuando este colágeno para los ejemplos comparativos fue sometido a medición por medio de una espectrometría de absorción atómica (mediante conversión en cenizas), contenía 4,0% en peso de cloruro sódico en su estado seco.

10 (2) Colágeno de los ejemplos de la invención

Se utilizó como material de partida una parte del anterior colágeno para los ejemplos comparativos y se purificó por medio de una precipitación isoelectrica en donde el pH era 8 o más e inferior a 9, con lo cual se preparó el colágeno de los ejemplos de la invención. Cuando este colágeno de los ejemplos de la invención fue sometido a medición por medio de una espectrometría de absorción atómica (mediante conversión en cenizas), contenía 1,0% en peso de cloruro sódico en su estado seco.

3. Preparación de medio de gel de colágeno

20 Cada una de las dos clases de colágeno anteriormente preparadas fue disuelta en ácido clorhídrico de acuerdo con el método convencional para preparar una disolución de colágeno al 0,5% en peso en ácido clorhídrico. Se añadieron 300 μ l de la disolución de colágeno de los anteriores ejemplos de la invención a cada uno de ocho pocillos de una microplaca de 24 pocillos (fabricada por Iwaki), mientras que se añadieron 300 μ l de la disolución de colágeno de los ejemplos comparativos a cada uno de otros ocho pocillos de la misma placa. Después de eso, se dejó la placa en reposo a 37 °C en una incubadora durante 30 minutos.

4. Incubación de las células PC12 con gel de colágeno

25 (1) Se cultivaron previamente células PC12 (células procedentes del feocromocitoma adrenal de ratas desarrollado por Dainippon Pharmaceutical Laboratory Products) en un medio DMEM hasta seis subcultivos, las células se recuperaron por separación centrífuga y se suspendieron en 15 ml del medio DMEM para ajustar los números celulares a 1×10^6 células, y luego se añadieron a las mismas 15 μ l de una disolución de 50 μ g/ml de NGF (factor de crecimiento celular fabricado por R&D Systems Inc.; un tampón de fosfato), con lo cual se preparó una disolución de cultivo.

30 Por cierto, el medio DMEM es uno en el que se añaden 25 ml de suero bovino fetal (fabricado por Dainippon Pharmaceutical Laboratory Products), 50 ml de suero equino (fabricado por Dainippon Pharmaceutical Laboratory Products) y 5 ml de una disolución 200 mM de glutamina (fabricada por Dainippon Pharmaceutical Laboratory Products; 29,23 mg/ml) a, y se mezclan con, 500 ml de un medio líquido RPMI 1640 (fabricado por Dainippon Pharmaceutical Laboratory Products; que no contiene ácido glutámico y contiene bicarbonato sódico).

35 (2) Se echaron gota a gota 300 μ l de la disolución de cultivo preparada de tal modo al pocillo del medio de colágeno previamente preparado.

(3) La placa de pocillos fue incubada en una incubadora (37 °C; concentración de CO₂: 5,0%) durante cuatro días.

5. Observación del estado de las células

40 Después de la incubación durante cuatro días, se observó el estado de las células en el gel de colágeno bajo un microscopio y se tomaron fotografías de los ejemplos representativos de dicho estado. Los resultados se muestran en la Figura 1 y la Figura 2.

6. Medición de los números de células vivas

45 (1) Con objeto de medir los números de células vivas después de la incubación durante cuatro días, se echaron gota a gota 50 μ l de una disolución de colagenasa al 1% en peso a cada pocillo y se agitó suavemente la mezcla junto con el pocillo, con lo cual se disolvió el gel de colágeno a 37 °C en menos de 30 minutos.

(2) Una vez disuelto el gel de colágeno, se añadieron 50 μ l de una disolución de ensayo de MTT a cada pocillo y se dejó luego la placa en reposo en una incubadora durante 30 minutos.

50 (3) Tras ser dejada la placa en reposo durante 30 minutos, se midió la absorbancia a 450 nm y se determinaron el valor medio y la desviación estándar para cada gel de colágeno a partir de los valores de la absorbancia en ocho pocillos, y el resultado se muestra en la Figura 3 en forma de gráfico. Por cierto, en el gráfico de la Figura 3, la absorbancia del colágeno de los ejemplos de la invención se expresa en términos de un valor relativo, definiéndose como 100 la absorción media de los geles de colágeno de los ejemplos comparativos. Mientras tanto, la absorción

corre en paralelo a los números de células vivas.

7. Consideración de este experimento

(1) Observación del estado de las células

5 Como resulta evidente de la comparación de la Figura 1 con la Figura 2, la incubación en que se usa el colágeno de los ejemplos de la invención (Figura 1) muestra mejor crecimiento de las células que la incubación en que se usa el colágeno de los ejemplos comparativos (Figura 2), y la elongación de la neurita también es significativa.

(2) Medición de números de células vivas

10 Como resulta evidente de la Figura 3, la absorbancia de la incubación en que se emplea el colágeno de los ejemplos de la invención es mayor que la absorbancia de la incubación en que se emplea el colágeno de los ejemplos comparativos en un grado de 39% de media, y la diferencia como tal es además una diferencia significativa a la vista de la estadística ($p < 0,01$). En consecuencia, a partir del resultado de la Figura 3, se advierte que el colágeno de los ejemplos de la invención tiene una capacidad de crecimiento celular significativamente mayor que el colágeno de los ejemplos comparativos.

15 (3) A partir de los resultados anteriores se concluye que el colágeno de los ejemplos de la invención es mejor que el colágeno convencional de los ejemplos comparativos en términos de capacidad de crecimiento celular y capacidad para inducir diferenciación.

Experimento 2: Experimento sobre la propiedad adhesiva del revestimiento de colágeno

1. Objeto de este experimento

20 Un objeto del mismo es que, para comparar la propiedad de adhesión celular entre el colágeno de los ejemplos de la invención y el colágeno convencional, las células flotantes después de la incubación en ambos colágenos fueron aspiradas y eliminadas usando un aspirador, sólo se midieron las células adheridas a la placa y se compararon sus números para confirmar si había una diferencia significativa en la propiedad adhesiva de las células dependiendo del tipo del colágeno.

2. Preparación del revestimiento de colágeno

25 (1) Se diluyeron el colágeno de los ejemplos de la invención y el colágeno de los ejemplos comparativos con ácido clorhídrico para llevar la concentración a 0,05% en peso y se pusieron 300 μ l de cada una de esas disoluciones de colágeno en cada uno de ocho pocillos de una microplaca de 24 pocillos (fabricada por Iwaki), dejándose luego reposar la microplaca en un frigorífico durante una hora.

30 (2) Tras ser dejada la microplaca en reposo durante una hora, se aspiró la disolución de colágeno de cada pocillo usando un aspirador y se sometió el revestimiento de colágeno adherido al pocillo a un secado natural durante 1 hora en una cámara limpia.

3. Incubación de las células PC12 con el revestimiento de colágeno

35 (1) Se cultivaron previamente células PC12 (células procedentes del feocromocitoma adrenal de ratas desarrollado por Daiippon Pharmaceutical Laboratory Products) en un medio DMEM hasta seis subcultivos, las células se recuperaron por separación centrifuga y se suspendieron en 25 ml del medio DMEM para ajustar los números celulares a 5×10^6 células, y luego se añadieron a las mismas 25 μ l de una disolución de 50 μ g/ml de NGF (factor de crecimiento celular fabricado por R&D Systems Inc.; un tampón de fosfato), con lo cual se preparó una disolución de cultivo.

40 (2) Se echaron gota a gota 300 μ l de la disolución de cultivo preparada de tal modo al pocillo del medio de colágeno previamente preparado.

(3) La placa de pocillos fue incubada en una incubadora (37 °C; concentración de CO₂: 5,0%) durante cinco días.

4. Medición de los números de células adheridas

45 (1) Con objeto de eliminar las células flotantes y las células que no estaban firmemente adheridas, se aspiraron todos los medios inclinando la placa de pocillos en un ángulo de 85°. En todo momento se prestó la máxima atención para no aspirar las células adheridas.

(2) Después de esto, se añadieron 300 μ l de un medio DMEM y 30 μ l de una disolución de ensayo de MTT a cada pocillo y se dejó luego la placa en reposo en una incubadora durante 30 minutos.

50 (3) Tras ser dejada la placa en reposo durante 30 minutos, se midió la absorbancia a 450 nm y se determinaron el valor medio y la desviación estándar para cada revestimiento de colágeno a partir de los valores de la absorbancia en ocho pocillos, y el resultado se muestra en la Figura 4 en forma de gráfico. Por cierto, en el gráfico de la Figura 4,

la absorbancia del revestimiento de colágeno de los ejemplos de la invención se expresa en términos de un valor relativo, definiéndose como 100 la absorción media del revestimiento de colágeno de los ejemplos comparativos.

5. Consideración de este experimento

5 Como resulta evidente de la Figura 4, la absorbancia que expresa los números de células adheridas del revestimiento de colágeno de los ejemplos de la invención era mayor que la absorbancia del revestimiento de colágeno de los ejemplos comparativos en un grado de 49% de media, y la diferencia como tal fue además una diferencia que era significativa en términos de estadística ($0,01 < p < 0,05$). La propiedad de adhesión celular es un factor muy importante para el andamio en la medicina de regeneración y, del resultado de la Figura 4, se advierte que el colágeno de la presente invención es adecuado para utilizar como un andamio para la regeneración nerviosa en comparación con el colágeno convencional.

10 Experimento 3: Experimento de incubación del revestimiento de colágeno en el que se cambia la concentración de cloruro sódico

1. Objeto de este experimento

15 Un objeto del mismo es comprobar el grado de influencia de la diferencia en las concentraciones del cloruro sódico contenido en el colágeno, sobre la vida y el crecimiento de las células.

2. Preparación del revestimiento de colágeno

20 (1) Se prepararon el colágeno de los ejemplos de la invención empleado en el Experimento 1, en el que se llevó la concentración de cloruro sódico a 5% en peso o 10% en peso mediante la adición de cloruro sódico al colágeno; y el colágeno de los ejemplos comparativos empleado en el Experimento 1, en el que se llevó la concentración de cloruro sódico a 5% en peso o 10% en peso mediante la adición de cloruro sódico al colágeno (véanse los revestimientos 1 a 6 de colágeno de la Figura 5). Se preparó cada uno de los colágenos en una disolución al 0,01% en peso en ácido clorhídrico y se echaron gota a gota 300 μ l de cada colágeno en cuatro pocillos usando dos microplacas de 24 pocillos (fabricadas por Iwaki), dejándose luego reposar las microplacas en un frigorífico durante una hora.

25 (2) Tras ser dejadas las microplacas en reposo durante una hora, se aspiró la disolución de colágeno de cada pocillo usando un aspirador y se sometió el revestimiento de colágeno adherido al pocillo a un secado natural durante 1 hora en una cámara limpia.

3. Incubación de las células PC12 con el revestimiento de colágeno

30 (1) Se cultivaron previamente células PC12 (células procedentes del feocromocitoma adrenal de ratas desarrollado por Dainippon Pharmaceutical Laboratory Products) en un medio DMEM hasta seis subcultivos, las células se recuperaron por separación centrífuga y se suspendieron en 15 ml del medio DMEM para ajustar los números celulares a 1×10^5 células, y luego se añadieron a las mismas 15 μ l de una disolución de 50 μ g/ml de NGF (factor de crecimiento celular fabricado por R&D Systems Inc.; un tampón de fosfato), con lo cual se preparó una disolución de cultivo.

35 (2) Se echaron gota a gota 300 μ l de la disolución de cultivo preparada de tal modo al pocillo del medio de colágeno previamente preparado.

(3) La placa de pocillos fue incubada en una incubadora (37 °C; concentración de CO₂: 5,0%) durante cinco días.

4. Medición de los números de células vivas

40 (1) Se añadieron 30 μ l de una disolución de ensayo de MTT a cada pocillo y se dejó luego la placa en reposo en una incubadora durante 30 minutos.

45 (2) Tras ser dejada la placa en reposo durante 30 minutos, se midió la absorbancia a 450 nm y se determinaron el valor medio y la desviación estándar para cada revestimiento de colágeno a partir de los valores de la absorbancia en ocho pocillos, y el resultado se muestra en las Figuras 6 y 7 en forma de gráficos. Por cierto, en los gráficos de las Figuras 6 y 7, la absorbancia del revestimiento de colágeno de los ejemplos de la invención se expresa en términos de un valor relativo, definiéndose como 100 la absorción media del revestimiento de colágeno de los ejemplos comparativos.

5. Consideración de este experimento

50 Como resulta evidente de las Figuras 6 y 7, existe la tendencia de que, cuanto mayor es la absorbancia, menor es la concentración de cloruro sódico en el colágeno y de que la absorbancia del cultivo al utilizar el colágeno de los ejemplos de la invención [revestimiento 1 de colágeno (concentración de cloruro sódico: 1% en peso)] era mayor que la absorbancia del cultivo al usar el colágeno de los ejemplos comparativos [revestimiento 6 de colágeno (concentración de cloruro sódico: 10% en peso)] en un grado de 27% de media, siendo además dicha diferencia una

diferencia que era significativa en términos de estadística ($p < 0,01$). A partir de los resultados de las Figuras 6 y 7, se advierte que el colágeno de los ejemplos de la invención que contiene baja concentración de cloruro sódico es superior al colágeno de los ejemplos comparativos en cuanto a capacidad de crecimiento celular.

5 Experimento 4: Experimento para evaluar la diferenciación celular por incubación de células de crestas neurales usando colágenos que tienen diferentes puntos isoeléctricos

1. Objeto de este experimento

Un objeto del mismo es comprobar el grado de influencia de la diferencia en los puntos isoeléctricos del colágeno sobre la diferenciación celular.

2. Preparación de polvo de colágeno concentrado por medio del punto isoeléctrico

10 (1) Se añadió agua Milli Q a 6 g de NMP Collagen PS para preparar 1000 ml, en total, de una disolución de colágeno al 0,6% en peso.

(2) Se agitó la mezcla sobre hielo durante un periodo de uno a tres días para que se disolviera completamente el colágeno en el agua.

15 (3) Se añadió gota a gota una disolución 1 N de NaOH a la disolución y se recuperaron en otro recipiente 200 ml de una disolución de colágeno que contenía el precipitado en un estado de pH de 5,5.

(4) Se continuó la adición gota a gota de la disolución 1 N de NaOH y, similarmente, se recuperaron en otros recipientes 200 ml de disolución en cada uno de los estados de pH de 8,5 y 10,2.

(5) Cada una de las tres muestras resultantes fue transferida a un tubo de centrifuga y fue centrifugada a 3000 rpm durante 45 minutos.

20 (6) El líquido sobrenadante de cada tubo de centrifuga fue desechado y el precipitado fue congelado a $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante la noche y fue tratado durante dos días en una máquina liofilizadora.

(7) Las muestras resultantes fueron sucesivamente denominadas "muestra 1" (pH de 5,5), "muestra 2" (pH de 8,5) y "muestra 3" (pH de 10,2).

En cada una de las muestras de colágeno la concentración de cloruro sódico era 1,2% en peso.

25 3. Preparación de la disolución de colágeno

(1) Se añadió una disolución 0,001M de HCl a 300 mg de cada una de las anteriores muestras 1, 2 y 3 para preparar 10 ml, en total, de una disolución de colágeno al 0,3% en peso.

(2) Se llevó un mezclamiento a cabo utilizando un aparato Voltex y luego se dejó reposar la mezcla a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante la noche para que se disolviera completamente ese colágeno.

30 (3) Se añadieron 9 ml de una disolución 0,001M de HCl a 1 ml de cada muestra de concentración 0,3% en peso, lo que fue seguido de un buen mezclamiento para preparar una disolución de colágeno al 0,03% en peso.

(4) Se pusieron 200 μl de cada una de las anteriores disoluciones de colágeno al 0,03% en peso en cada pocillo de una microplaca de 24 pocillos (fabricada por Iwaki) y luego se dejó reposar la microplaca a temperatura ambiental ($20\text{ }^{\circ}\text{C}$) durante diez minutos.

35 (5) Se aspiró la disolución de colágeno, se añadió 1 ml de PBS (-) a los pocillos y se aspiró la mezcla, realizándose repetidos lavados.

(6) La microplaca fue simplemente dejada reposar en una cámara limpia para que se secase.

4. Incubación de las células

40 (1) Se diluyeron células pigmentarias procedentes de la cresta neural (desarrolladas por Kurabo Industries; nº de código: KM-4009MP) con un medio exclusivo para ellas (fabricado por Kurabo Industries; nº de código: M-254-500 + nº de código: S-002-5) para obtener $3,75 \times 10^4$ células por ml y luego se sembraron 500 μl de la dilución en cada pocillo.

(2) Se llevó a cabo una incubación durante cuatro días a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, siendo 5,0% la concentración de CO_2 .

45 (3) Una vez aspirado el medio, se añadieron en seguida 500 μl del medio exclusivo a las células y, después de eso, se llevó a cabo una incubación durante tres días a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, siendo 5,0% la concentración de CO_2 .

(4) Una vez aspirado el medio, se añadieron en seguida 500 μl del medio exclusivo a las células, se llevó a cabo una

incubación durante cuatro días más a 37 °C, siendo 5,0% la concentración de CO₂, y, después de eso, se observó el grado de diferenciación celular en cada pocillo.

5. Consideración de este experimento

5 Como resulta evidente de las Figuras 8 a 10, se advirtieron diferencias significativas en los niveles de diferenciación celular dependiendo de las diferencias en el punto isoeléctrico del colágeno y se pudo confirmar, a partir de la observación de la forma celular, que la diferenciación estaba significativamente activada en la muestra 2 (pH de 8,5).

Se confirmó además de las Figuras 11 y 12 que, cuando se calculaba la proporción de las células diferenciadas en las células vivas totales, la proporción de diferenciación celular (%) era mayor cuando el pH era 8,5 que en los casos en que los pHs eran 5,5 y 10,2.

10 Proporción de diferenciación celular (%) = (número de células diferenciadas)/(número total de células vivas).

15 A la vista del hecho de que, en general, el colágeno se metaboliza/absorbe *in vivo* en un plazo de aproximadamente dos semanas, se cree que, si se dispone de una proporción de diferenciación celular de 40% o más después de la incubación durante 11 días, se alcanza un buen resultado en el campo real de la regeneración nerviosa. La proporción de diferenciación celular es más preferiblemente no inferior a 50%, más preferiblemente no inferior a 60% y más preferiblemente no inferior a 70%.

Aplicabilidad industrial

Puesto que el tubo inductor de la regeneración nerviosa de acuerdo con la presente invención es excelente en términos de propiedad de adhesión celular, capacidad de crecimiento celular y capacidad para inducir diferenciación celular, su aplicación en la medicina de regeneración nerviosa se amplía y es bastante útil.

20

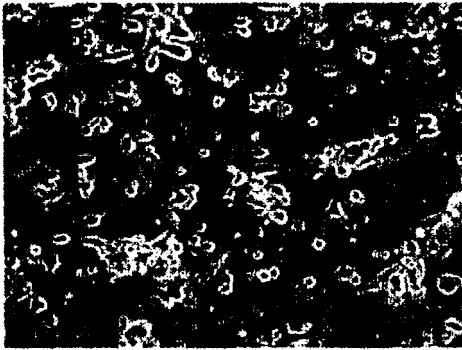
REIVINDICACIONES

1. Un método para preparar un tubo inductor de la regeneración nerviosa, en donde se utiliza colágeno como un andamio para la regeneración nerviosa y en donde la concentración de cloruro sódico del colágeno en estado seco no es superior a 2,0% en peso, método que:
 - 5 (i) comprende la operación de purificar el colágeno por medio de una precipitación isoelectrica en la que el pH es 6,0 o superior y es inferior a 10,0, y comprende además la operación de formar el tubo inductor de la regeneración nerviosa revistiendo con el colágeno un cuerpo tubular que comprende un polímero biodegradable y llenando el cuerpo tubular con el colágeno, en donde el polímero biodegradable que constituye el cuerpo tubular es un único polímero biodegradable seleccionado de entre poli(ácido glicólico),
10 poli(ácido láctico), un copolímero de ácido láctico-caprolactona, un copolímero de ácido glicólico-caprolactona, polidioxanona y ácido glicólico-ácido trimetilencarboxílico; o
 - (ii) comprende la operación de purificar el colágeno por medio de un método de diálisis.
2. El método para preparar el tubo inductor de la regeneración nerviosa según la Reivindicación 1, en donde se utiliza colágeno como un andamio para la regeneración nerviosa y en donde la concentración de cloruro sódico
15 del colágeno en estado seco no es superior a 2,0% en peso, método que comprende la operación de purificar el colágeno por medio de una precipitación isoelectrica en la que el pH es 6,0 o superior y es inferior a 10,0, y comprende además la operación de formar el tubo inductor de la regeneración nerviosa revistiendo con el colágeno un cuerpo tubular que comprende un polímero biodegradable y llenando el cuerpo tubular con el colágeno, en donde el polímero biodegradable que constituye el cuerpo tubular es un único polímero
20 biodegradable seleccionado de entre poli(ácido glicólico), poli(ácido láctico), un copolímero de ácido láctico-caprolactona, un copolímero de ácido glicólico-caprolactona, polidioxanona y ácido glicólico-ácido trimetilencarboxílico.
3. El método para preparar el tubo inductor de la regeneración nerviosa según la Reivindicación 1, en donde se utiliza colágeno como un andamio para la regeneración nerviosa y en donde la concentración de cloruro sódico
25 del colágeno en estado seco no es superior a 2,0% en peso, método que comprende la operación de purificar el colágeno por medio de un método de diálisis.
4. El método según la Reivindicación 3, que comprende además la operación de formar el tubo inductor de la regeneración nerviosa revistiendo con el colágeno un cuerpo tubular que comprende un polímero biodegradable y llenando el cuerpo tubular con el colágeno.
- 30 5. El método según cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 4, en donde la concentración de cloruro sódico del colágeno en estado seco es de 0,1 a 1,5% en peso.

Figura 1

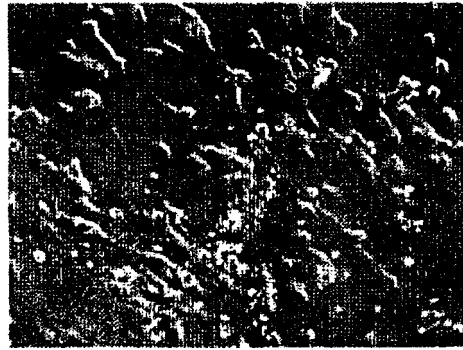
Estado de las células en el gel de colágeno de los ejemplos de la invención después de una incubación durante cuatro días

(1)



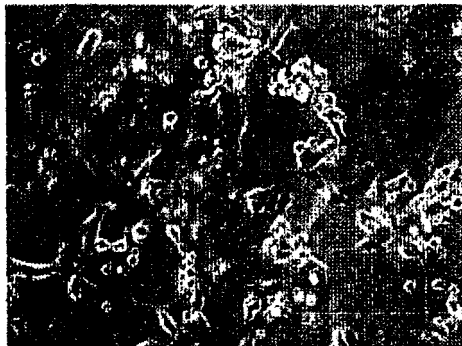
Las células crecen y las neuritas se alargan

(2)



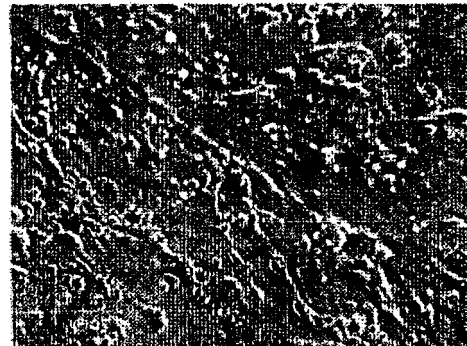
Las neuritas se alargan en cierta dirección

(3)



Las neuritas se alargan en tres dimensiones

(4)

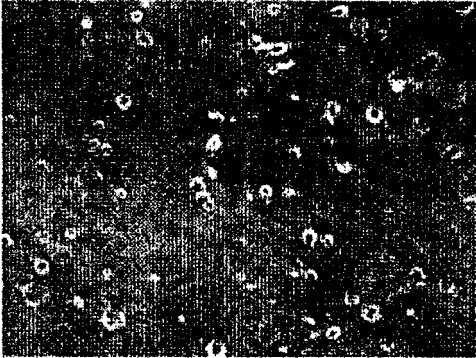


Las células y las neuritas se alargan en cierta dirección

Figura 2

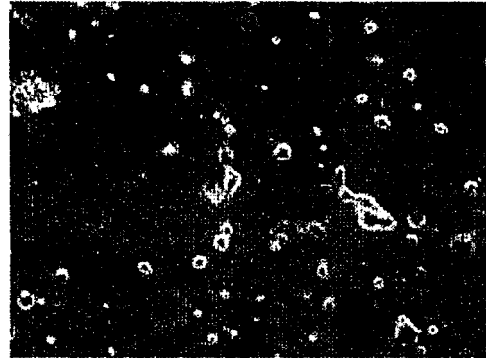
Estado de las células en el gel de colágeno de los ejemplos comparativos después de una incubación durante cuatro días

(1)



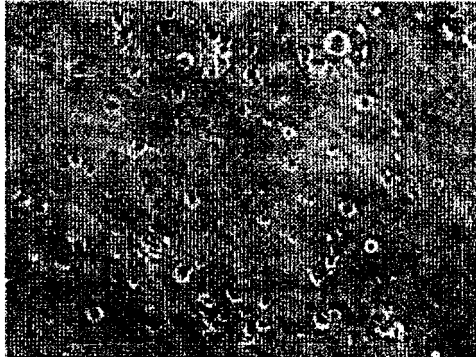
Las células no crecen bien y casi no existen neuritas

(2)



Las células no crecen bien y casi no existen neuritas

(3)



Las células no crecen bien y casi no existen neuritas

Figura 3

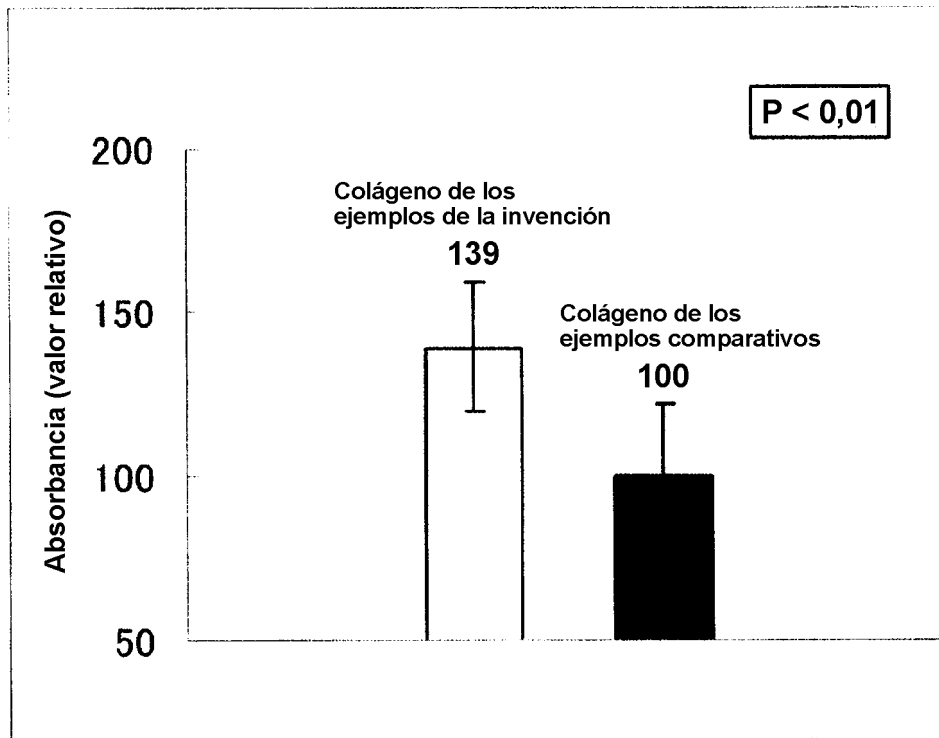


Figura 4

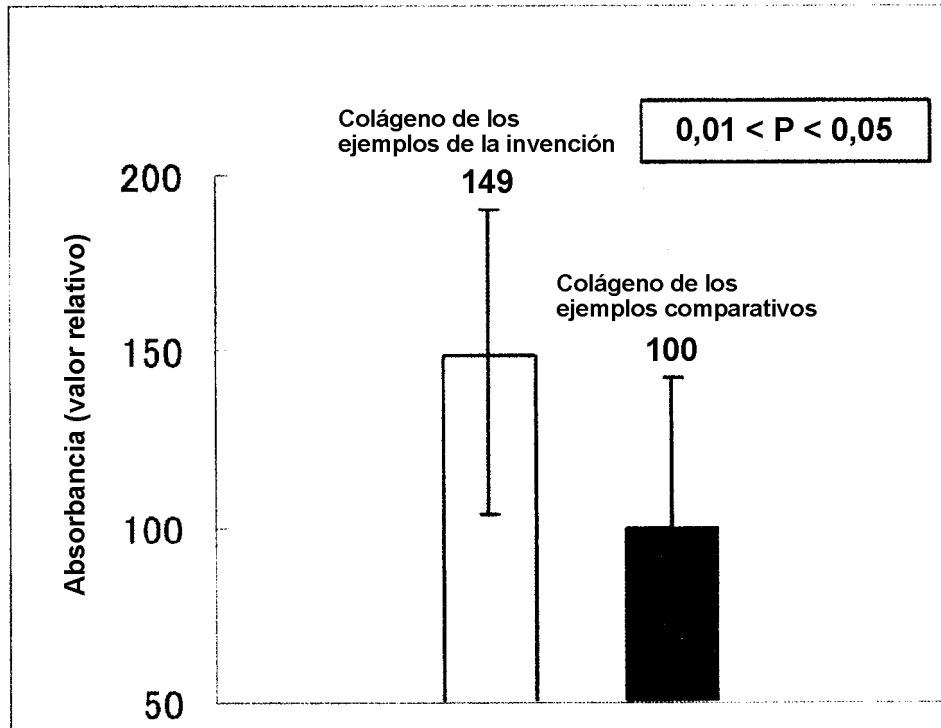


Figura 5

	Tipo de colágeno	Concentración de cloruro sódico
Revestimiento 1 de colágeno	Colágeno de los ejemplos de la invención	1%
Revestimiento 2 de colágeno	Colágeno de los ejemplos de la invención	5%
Revestimiento 3 de colágeno	Colágeno de los ejemplos de la invención	10%
Revestimiento 4 de colágeno	Colágeno de los ejemplos comparativos	4%
Revestimiento 5 de colágeno	Colágeno de los ejemplos comparativos	5%
Revestimiento 6 de colágeno	Colágeno de los ejemplos comparativos	10%

Figura 6

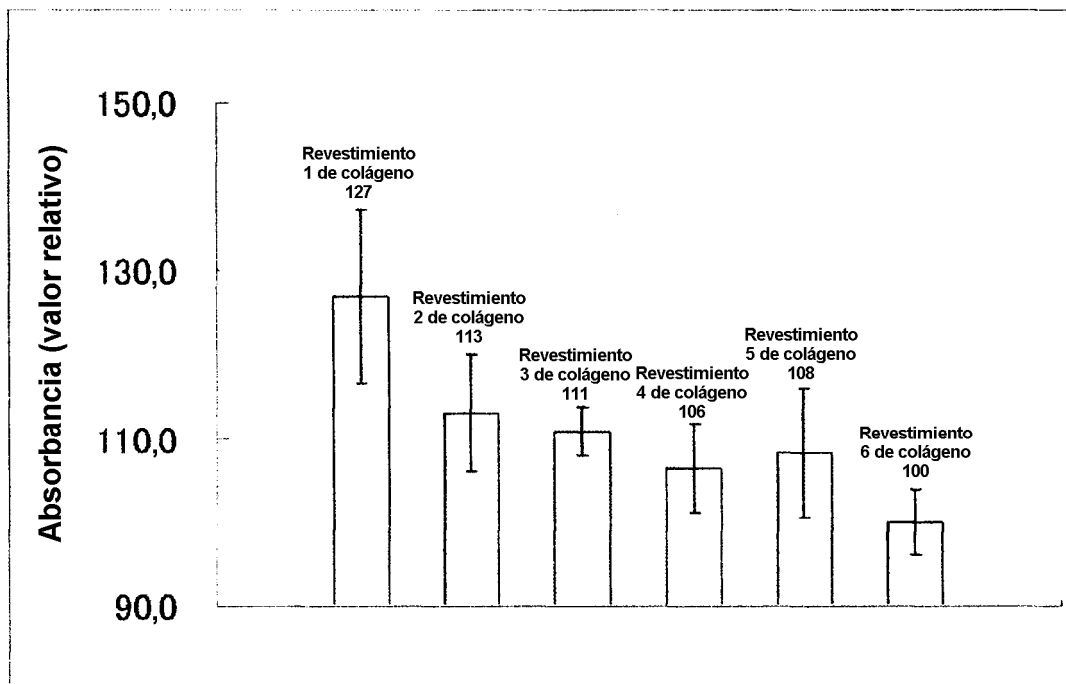


Figura 7

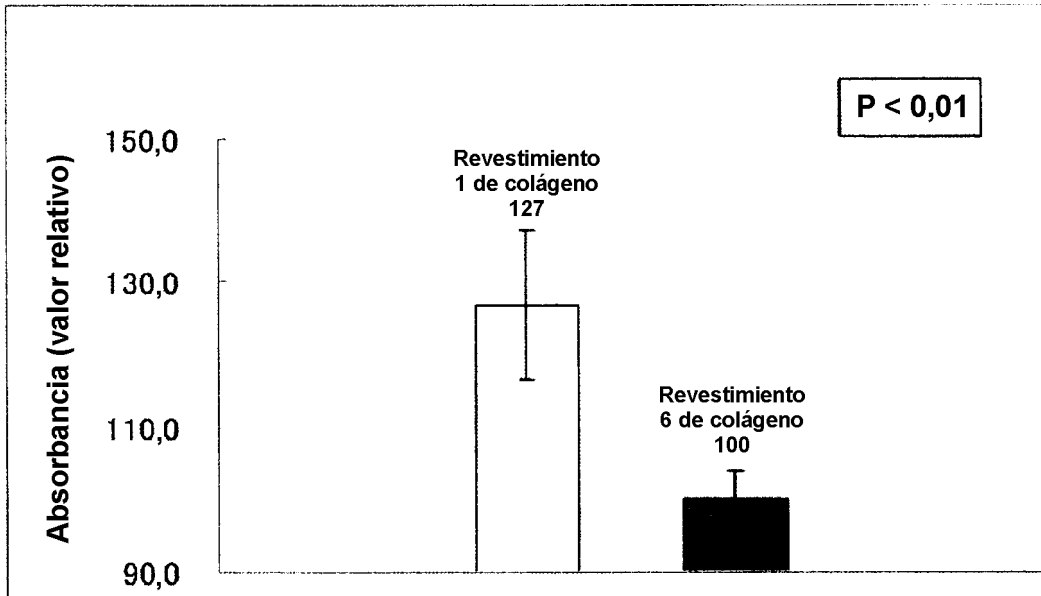


Figura 8

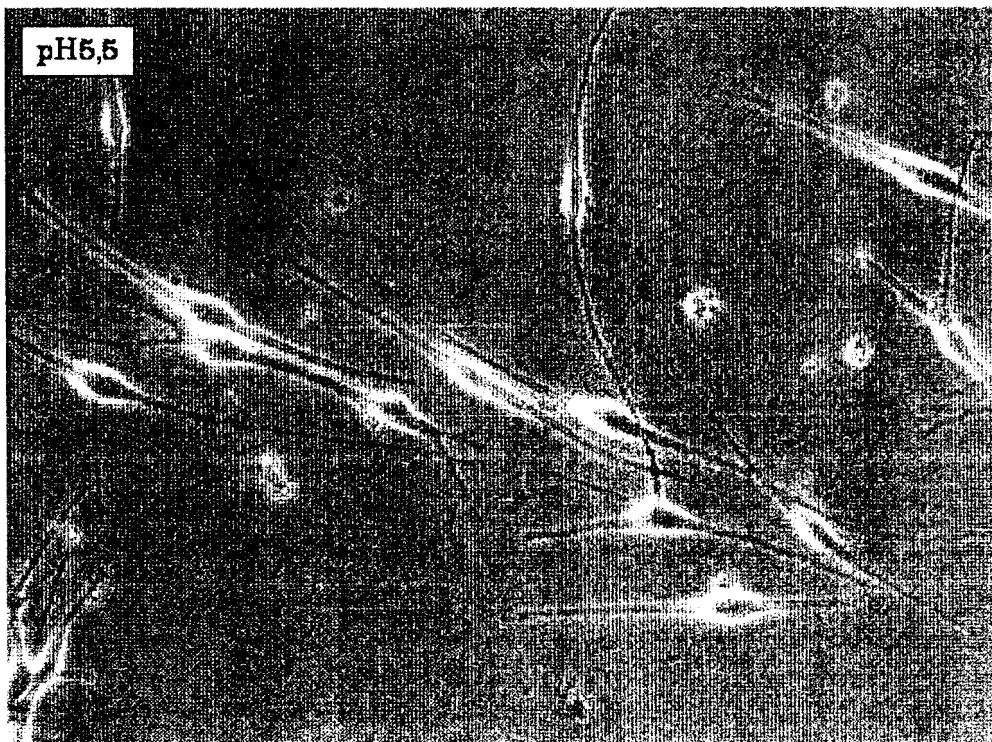


Figura 9

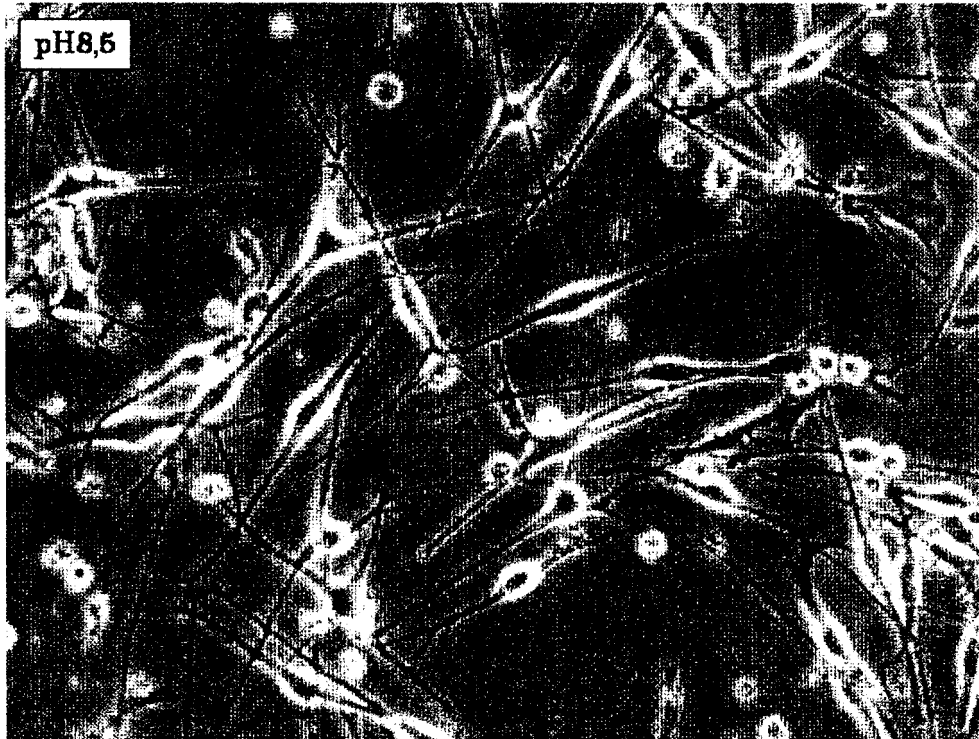


Figura 10

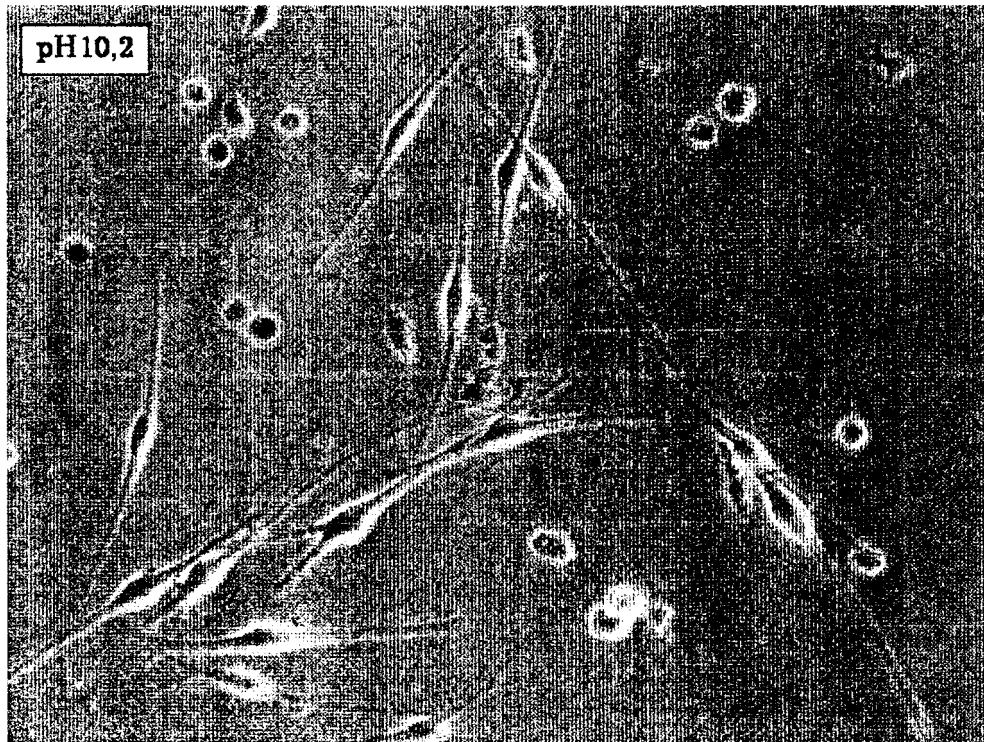


Figura 11

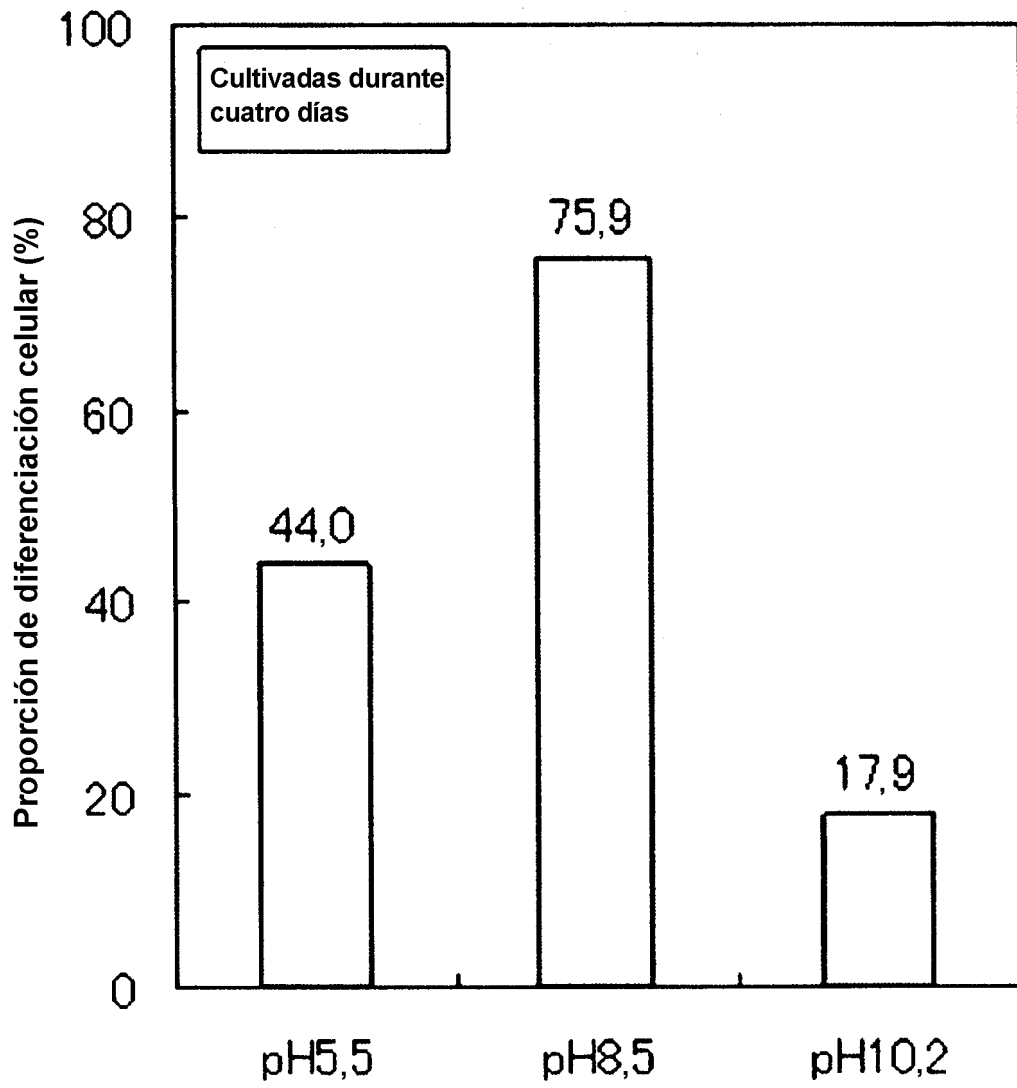


Figura 12

