

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 988 784**

51 Int. Cl.:

A61L 31/06	(2006.01) A61L 31/16	(2006.01)
A61F 13/00	(2014.01) A61L 33/06	(2006.01)
A61K 9/70	(2006.01) A61P 25/00	(2006.01)
A61K 31/714	(2006.01)	
A61L 15/26	(2006.01)	
A61L 15/44	(2006.01)	
A61L 27/18	(2006.01)	
A61L 27/54	(2006.01)	
A61L 27/58	(2006.01)	
A61L 31/14	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.01.2021 PCT/JP2021/000985**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **22.07.2021 WO21145362**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.01.2021 E 21741244 (4)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.07.2024 EP 4091643**

54 Título: **Lámina médica**

30 Prioridad:

14.01.2020 JP 2020000097 U
15.01.2020 JP 2020004189
25.02.2020 JP 2020029404
25.02.2020 JP 2020000615 U

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.11.2024

73 Titular/es:

NIPPON ZOKI PHARMACEUTICAL CO., LTD.
(100.0%)
2-3, Hiranomachi 4-chome
Chuo-ku, Osaka-shi, Osaka 541-0046, JP

72 Inventor/es:

KONISHI, TAKAFUMI;
NAIKI, MITSURU;
UJITA, TOSHIKO y
YAMAMOTO, HITOSHI

74 Agente/Representante:

CURELL SUÑOL, S.L.P.

ES 2 988 784 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

Lámina médica

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a una lámina que presenta una acción supresora de la infiltración celular, y se refiere además a una lámina médica que presenta una acción neuroprotectora y/o estimuladora de la regeneración nerviosa (en adelante, puede denominarse simplemente "la presente lámina") en el tratamiento del daño a nervios periféricos.

Antecedentes de la técnica

Al producirse daños en un tejido debido a traumatismo, cirugía, enfermedad o similar y producirse inflamación, se libera una sustancia productora de dolor, una sustancia potenciadora de dolor, una citocina inflamatoria o similar en el sitio del daño o a partir de células inflamatorias, de manera que ocurre dolor espontáneo y además se induce una reacción inflamatoria mediante un reflejo axónico y continúa la inflamación y el dolor. Dependiendo del grado del daño, el daño en nervios periféricos se clasifica en: (1) daño transitorio a la conducción que no implica ruptura de axones y se recupera por completo, (2) ruptura de axones, aunque se mantiene la continuidad de los tubos de Schwann y el perineuro y se regeneran gradualmente los nervios, y (3) ruptura de axones y epineurio y no existe una continuidad macroscópica, o si la existe, se ha perdido la continuidad de los axones debido a la cicatrización, y no se produce una recuperación espontánea. Entre ellos, el daño a nervios periféricos que no se cura espontáneamente por su propia fuerza de recuperación se trata básicamente mediante neurorrafia extremo a extremo del nervio dañado. Sin embargo, en el caso de que requiera un tiempo prolongado para recuperarse, se produce un cambio irreversible en el tejido muscular, por lo que es importante estimular la regeneración del axón nervioso (regeneración nerviosa). Sin embargo, tal como se ha indicado anteriormente, se induce una reacción inflamatoria en el sitio del daño, y la cicatrización neural producida por células inflamatorias, tales como los macrófagos, es uno de los factores que perjudica la regeneración nerviosa. Por lo tanto, en el tratamiento de la lesión nerviosa periférica mediante regeneración nerviosa una estrategia terapéutica importante es la supresión de la cicatrización neural causada por células inflamatorias.

El documento de patente nº 1 divulga una lámina de regeneración nerviosa realizada en un material biodegradable para regenerar fibras nerviosas relativamente delgadas, tales como nervios autonómicos, aunque no describe o sugiere que la cicatrización neural debida a células inflamatorias se suprima para estimular la regeneración nerviosa.

El documento de patente nº 2 divulga la utilización de una envoltura de nanofibras para minimizar la inflamación y la cicatrización del tejido nervioso. El constructo de nanofibras es poroso y está compuesto por nanofibras orientadas aleatoriamente preparadas utilizando un método de electrohilado. El constructo de nanofibras impide que las células inflamatorias migren al sitio de coaptación nerviosa, permitiendo sin embargo la difusión de factores de crecimiento y nutrientes esenciales.

Documentos de la técnica anterior

Documentos de patente

Documento de patente nº 1: patente japonesa abierta al público nº 2010-115393.

Documento de patente nº 2: WO2015/157485.

Sumario de la invención

Problema que debe resolver la invención

Un objetivo de la presente invención es proporcionar una lámina médica (la presente lámina) que se envuelve o aplica en el sitio de daño en nervio periférico en el cuerpo vivo, protegiendo de esta manera los nervios frente a la acción dañina de las células inflamatorias, suprimiendo la cicatrización neural y estimulando la regeneración nerviosa. Además, con el fin de potenciar la acción estimuladora de la regeneración nerviosa, la presente lámina puede contener apropiadamente un fármaco o similar, por ejemplo, un fármaco que presente un efecto terapéutico sobre la lesión nerviosa, un fármaco que presente una acción antiinflamatoria, o similar. La presente lámina puede estar formada por un tejido no tejido biodegradable que desaparece naturalmente durante el tiempo, por lo que no resulta necesario retirar la lámina después de la aplicación en el cuerpo vivo.

Medios para resolver el problema

El alcance de la presente invención se define mediante las reivindicaciones. Cualquier "forma de realización" o

"ejemplo" que se divulgue en la descripción pero no esté cubierta por las reivindicaciones debe considerarse como presentada a título únicamente ilustrativo. Las formas de realización en la descripción referidas a métodos de tratamiento no están cubiertas por las reivindicaciones.

- 5 Como resultado de estudios exhaustivos para conseguir el objetivo, los presentes inventores han descubierto que el objetivo puede conseguirse mediante la lámina según las reivindicaciones 1 a 13.

Ventajas de la invención

- 10 Según la presente invención, resulta posible proporcionar una lámina que presenta una excelente acción neuroprotectora y/o estimuladora de la regeneración nerviosa, que protege los nervios suprimiendo la infiltración de células inflamatorias, tales como macrófagos, y sin proporcionar estimulación que afecte adversamente a los nervios debido a que pasan líquidos corporales por los mismos, mediante envoltura alrededor de un nervio en el sitio de daño de nervio periférico.

Breve descripción del dibujo

La figura 1 es una micrografía electrónica de barrido de las láminas A y B producidas en el ejemplo 1.

Modo para poner en práctica la invención

- La presente invención proporciona una lámina (la presente lámina) que comprende un tejido no tejido formado por fibra que contiene un poliéster alifático y presenta una porosidad de entre 60 % y 80 %, lo que resulta preferido para mostrar una acción supresora de la infiltración celular. Debido a la estructura del tejido no tejido o similar, la presente lámina presenta una acción neuroprotectora y/o estimuladora de la regeneración nerviosa, al permitir que un líquido corporal permee, aunque suprimiendo la infiltración celular. La presente lámina realizada en un tejido no tejido formado de fibras que contiene un poliéster alifático biodegradable que presenta una distribución de pesos moleculares en la que existe un valor máximo en por lo menos dos o más regiones de la distribución de pesos moleculares. La lámina presenta una excelente biodegradabilidad y puede ajustar el periodo de la acción neuroprotectora y/o de estimulación de la regeneración nerviosa por la presente lámina a un periodo apropiado. En el tejido no tejido según la presente lámina, las fibras están orientadas en una dirección o aleatoriamente en una lámina de fibras, una malla o una almohadilla, excluyendo papel, tejido no tejido, tejido de punto, tela de pelo y fieltro compactado. Además, las fibras individuales pueden encontrarse en una forma apilada, en una forma entrelazada, o fusionadas o unidas entre sí, o pueden encontrarse en una combinación de dichas formas. Además, mediante la inclusión de un fármaco, tal como un agente terapéutico para la lesión nerviosa, en la presente lámina, puede mejorarse adicionalmente el efecto de neuroprotección y/o de estimulación de la regeneración nerviosa.

- Entre los ejemplos del poliéster alifático contenido en la fibra que forma el tejido no tejido según la presente lámina se incluyen poliésteres alifáticos biodegradables, tales como policaprolactona, ácido poliláctico, ácido poliglicólico, ácido poliglicerol, ácido polihidroxialcanoico, succinato de polibutileno, copolímeros de los mismos, o derivados de los mismos, y preferentemente incluye policaprolactona o un copolímero de los mismos, ácido poliláctico o un copolímero de los mismos, ácido poliglicólico o un copolímero de los mismos, o una mezcla de los mismos.

- Además, como el poliéster alifático, asimismo pueden utilizarse los que utilizan un iniciador de polimerización arbitrario, tal como diol, hidroxilácido o ácido dicarboxílico, y entre los ejemplos específicos del mismo se incluyen poli(ϵ -caprolactona)diol (puede denominarse simplemente "policaprolactona diol") utilizando propilenglicol o dietilenglicol como iniciador de polimerización; ácido poliláctico, ácido dicarboxílico utilizando ácido fumárico como un iniciador de polimerización, y similares. Entre los ejemplos del poliéster alifático contenido en la fibra que forma el tejido no tejido según la presente lámina más preferentemente se incluyen policaprolactona, policaprolactona diol o un copolímero de las mismas, o una mezcla de las mismas.

- Además, la fibra que forma el tejido no tejido según la presente lámina solo se requiere que contenga por lo menos uno o más de los poliésteres alifáticos, y puede contener un copolímero de un polímero biodegradable diferente del poliéster alifático, y el poliéster alifático. Además, la fibra que forma el tejido no tejido según la presente lámina puede contener un copolímero que contiene una pluralidad de los poliésteres alifáticos. En el caso de un copolímero, la forma de copolimerización puede ser cualquiera de entre copolimerización en bloque, copolimerización aleatoria, copolimerización alternante y copolimerización de injerto.

- El poliéster alifático presenta por lo menos o más valores máximos en la distribución de pesos moleculares. En este caso, cada valor máximo (pico de la distribución de pesos moleculares) presenta valores diferentes, y presenta por lo menos dos picos: un pico en el lado de peso molecular más bajo (en adelante asimismo denominado "pico X") y un pico en el lado de peso molecular más alto (en adelante, asimismo denominado "pico Y"). La distribución de pesos moleculares del poliéster alifático que forma las fibras del tejido no tejido según la presente lámina puede obtenerse por comparación con el patrón de polietilenglicol/óxido de polietileno mediante cromatografía de permeación en gel (CPG) en la que se utiliza THF como fase móvil.

El componente de peso molecular relativamente bajo (en adelante, asimismo denominado "componente de bajo peso molecular") que constituye el pico X del poliéster alifático se supone que reduce la temperatura de fusión de la fibra de poliéster alifático y/o reduce la cristalinidad de la fibra de poliéster alifático. De acuerdo con lo anterior, la presente lámina presenta excelente biodegradabilidad. Además, debido a que una parte del componente de bajo peso molecular se localiza sobre la superficie de la fibra, es probable que se produzca la descomposición de la fibra desde la superficie. Por otra parte, un componente del peso molecular relativamente alto (en adelante, asimismo denominado "componente de alto peso molecular") que constituye el pico Y del poliéster alifático mejora las características mecánicas del tejido no tejido, por lo que la presente lámina presenta una excelente estabilidad estructural.

El poliéster alifático de un componente de bajo peso molecular y el poliéster alifático de un componente de alto peso molecular pueden mezclarse habitualmente. En este caso, resulta preferido utilizar el mismo tipo de poliéster alifático de un componente de bajo peso molecular y poliéster alifático de un componente de alto peso molecular en términos de afinidad. En el poliéster alifático indicado anteriormente, la policaprolactona diol sintetizada utilizando un diol como iniciador de polimerización puede considerarse como del mismo tipo que la policaprolactona.

El peso molecular del componente de bajo peso molecular no se encuentra particularmente limitado, aunque el peso molecular medio en número antes del tratamiento de esterilización es, por ejemplo, de entre 1000 y 7000, preferentemente de entre 2000 y 6000, más preferentemente de entre 2500 y 5000. Además, el peso molecular medio en peso antes del tratamiento de esterilización es, por ejemplo, de entre 1500 y 12000, preferentemente de entre 3000 y 10000, más preferentemente de entre 4000 y 9000.

Por otra parte, el peso molecular del componente de alto peso molecular no se encuentra particularmente limitado, aunque el peso molecular medio en número antes del tratamiento de esterilización es, por ejemplo, de entre 40000 y 150000, preferentemente de entre 50000 y 140000, más preferentemente de entre 60000 y 130000. Además, el peso molecular medio en peso antes del tratamiento de esterilización es, por ejemplo, de entre 60000 y 260000, preferentemente de entre 80000 y 240000, más preferentemente de entre 100000 y 220000.

La presente lámina preferentemente se esteriliza para su uso pretendido, aunque se ha encontrado que el peso molecular del poliéster alifático como materia prima para producir la presente lámina resulta disminuido por la esterilización por haz de electrones. Es decir, al comparar el peso molecular del poliéster alifático antes de la esterilización con el peso molecular del poliéster alifático después de la esterilización, cuando la dosis de radiación de haz de electrones es de entre 20 y 30 kGy, se ha confirmado una reducción del peso molecular del componente de bajo peso molecular de aproximadamente 5 % a 10 %, y del componente de alto peso molecular de aproximadamente 15 % a 30 %, y se ha encontrado que el peso molecular del componente de alto peso molecular especialmente se reduce significativamente. El grado en que se redujo el peso molecular del poliéster alifático fue mayor que el peso molecular medio en peso y el peso molecular medio en número en aproximadamente 5 % a 10 %. Por lo tanto, se supone que los pesos moleculares en los picos X e Y de la presente lámina después de ser sometida al tratamiento de esterilización son inferiores a los de antes del tratamiento de esterilización en aproximadamente 5 % a 10 % en el pico X y en aproximadamente 15 % a 30 % en el pico Y.

El peso molecular del poliéster alifático contenido en la fibra que forma el tejido no tejido según la presente lámina puede fijarse apropiadamente en un valor preferido según el grado de daño nervioso en el que se aplique la presente lámina, el periodo hasta la desaparición después de la aplicación, el tipo de fármaco como agente terapéutico para la lesión nerviosa en caso de que contenga fármaco, la velocidad y periodo de liberación del fármaco, y similares. Incluso cuando se mezclan un componente de bajo peso molecular y un componente de alto peso molecular como el poliéster alifático, el peso molecular de cada componente y su proporción de mezcla no están particularmente limitados y pueden modificarse apropiadamente según la utilización de la presente lámina y el fármaco que debe contener la presente lámina indicado posteriormente. Mediante la implantación de la presente lámina en un sitio de daño en nervio periférico y una periferia del mismo o la envoltura de la presente lámina en torno del nervio y, en caso necesario, el control del periodo de liberación del fármaco a partir de la presente lámina, o el periodo hasta que la presente lámina se biodegrada y desaparece, puede mostrarse más exactamente el efecto de protección y regeneración nerviosos de la presente lámina. En ese caso, la relación de masa del contenido del componente de bajo peso molecular respecto a la suma de los contenidos del componente de bajo peso molecular y el contenido del componente de alto peso molecular en el tejido no tejido es, por ejemplo, de 0.01 o superior y de 0.3 o inferior, preferentemente de 0.2 o superior y de 0.2 o inferior. Además, en el caso de que el componente de bajo peso molecular y el componente de alto peso molecular se encuentren dentro de los intervalos anteriormente indicados, puede obtenerse un tejido no tejido que presenta una uniformidad más excelente (en particular, un diámetro de fibra uniforme).

El poliéster alifático puede presentar tres o más valores máximos en la distribución de pesos moleculares y el valor límite superior del número de valores máximos no está particularmente limitado. Incluso cuando se dispone de tres o más valores máximos, resulta preferido que cada uno de los pesos moleculares de los picos X e Y se encuentre comprendido dentro de los intervalos anteriormente indicados.

El contenido del poliéster alifático en la fibra del tejido no tejido según la presente lámina no se encuentra particularmente limitado, aunque es preferentemente de entre 0.01 % y 100 % en peso, más preferentemente de entre 0.5 % y 100 % en peso, más preferentemente de entre 25 % y 100 % en peso respecto al peso total de la fibra.

5

El diámetro de fibra medio de la fibra del tejido no tejido según la presente lámina no está particularmente limitado, aunque es preferentemente de entre 300 y 1500 nm, más preferentemente de entre 400 y 1300 nm, todavía más preferentemente de entre 500 y 1000 nm. En el caso de que el diámetro de fibra medio sea de 100 nm o mayor, la presente lámina presenta excelente estabilidad estructural, y en el caso de que el diámetro de fibra medio sea de 1500 nm o inferior, la presente lámina presenta excelentes flexibilidad, biodegradabilidad y acción supresora de la infiltración celular. El diámetro de fibra medio de las fibras del tejido no tejido según la presente lámina puede determinarse mediante el cálculo de la media aritmética de las anchuras en una dirección sustancialmente perpendicular a la dirección longitudinal de aproximadamente 10 fibras mediante observación del tejido no tejido con un microscopio electrónico de barrido.

10

15

El peso (peso por unidad de superficie) de la presente lámina no está particularmente limitado. Sin embargo, por ejemplo en el caso de que se utilice la presente lámina con el fin del tratamiento de una lesión de nervio periférico, el peso de la presente lámina es preferentemente de entre 0.5 y 10 mg/cm², más preferentemente de entre 0.8 y 5 mg/cm², todavía más preferentemente de entre 1 y 3 mg/cm², en términos de supresión de la cicatrización neural debido a células inflamatorias, protección de nervios y/o estimulación de la regeneración nerviosa.

20

La densidad (peso por unidad de volumen) de la presente lámina no está particularmente limitada. Sin embargo, por ejemplo, en el caso de que se utilice la presente lámina para el fin del tratamiento del daño de nervio periférico, la densidad de la presente lámina es preferentemente de entre 100 y 1000 mg/cm³, más preferentemente de entre 200 y 800 mg/cm³, todavía más preferentemente de entre 250 y 600 mg/cm³, en términos de supresión de la cicatrización neural debido a células inflamatorias, protección de nervios y/o estimulación de la regeneración nerviosa.

25

El grosor de la presente lámina es de entre 30 y 70 μm, más preferentemente de entre 35 y 65 μm, todavía más preferentemente de entre 40 y 60 μm, en términos de supresión de la cicatrización neural debida a células inflamatorias, protección de nervios y/o estimulación de la regeneración nerviosa, y en términos de aplicación en un sitio de lesión nerviosa, tal como la envoltura en torno a un nervio. El grosor de la lámina puede determinarse mediante medición del grosor en tres puntos con un micrómetro y el cálculo de la media aritmética de los valores medidos.

30

35

Por ejemplo, en el caso de que la presente lámina se utilice para el tratamiento del daño en nervios periféricos, la porosidad de la presente lámina es de entre 60 % y 80 %, preferentemente de entre 65 % y 75 %, en términos de supresión de la cicatrización neural debida a células inflamatorias, protección de nervios y/o estimulación de la regeneración nerviosa. La porosidad de la presente lámina puede calcularse mediante la fórmula siguiente a partir del peso por unidad de superficie (1 cm²) de la presente lámina y el grosor de la presente lámina, y la gravedad específica (por ejemplo, 1.15 g/cm³ para la policaprolactona) del poliéster alifático.

40

Porosidad (%) = (Grosor – Peso por 1 cm² / Gravedad específica de poliéster alifático) / Grosor x 100

45

Se midió la resistencia al doblado de la presente lámina de acuerdo con la norma JIS L1096 A utilizando un probador de resistencia al doblado Gurley disponible comercialmente. Como resultado, debido a que la presente lámina es muy blanda, la resistencia al doblado era inferior al mínimo en la escala de lectura (por ejemplo, de 0.2 mN), y no pudo medirse la resistencia al doblado. Es decir, la presente lámina presenta una flexibilidad tan alta que no puede medirse la resistencia al doblado. Por lo tanto, la presente lámina puede involucrarse fácilmente en torno a un nervio en un sitio de daño en nervio periférico o aplicarse para cubrir el sitio, por ejemplo. Incluso en tal caso, la presente lámina presenta la ventaja de que la estimulación que afecta adversamente a los nervios y tejidos circundantes no se produce.

50

La presente lámina puede contener componentes diferentes de los anteriormente indicados, y entre los ejemplos de los mismos se incluyen un fármaco. En particular, la presente invención puede proporcionar una lámina que contiene un agente terapéutico para la lesión nerviosa con el fin de potenciar adicionalmente el efecto neuroprotector y/o de estimulación de la regeneración nerviosa. En el caso de que la presente lámina que contiene un fármaco se aplique como un dispositivo médico implantado en un cuerpo vivo o insertado en el cuerpo para el uso, puede liberarse el fármaco en el cuerpo vivo junto con la descomposición del tejido no tejido. La presente lámina que contiene un fármaco puede mantener la forma del tejido no tejido en el cuerpo vivo durante un periodo de tiempo deseado, de manera que el fármaco se libera a medida que se descompone y además, el tejido no tejido puede descomponerse por completo después de transcurrir un periodo de tiempo deseado. El periodo durante el que la forma del tejido no tejido se mantiene en el cuerpo vivo no está particularmente limitado, pero puede ser, por ejemplo, un periodo de 1 a 12 meses. El periodo hasta que el tejido no tejido se descomponga por completo en el cuerpo vivo es, por ejemplo, un periodo de 6 a 24 meses. En el caso de que contenga un fármaco, tal como un agente terapéutico para daño nervioso, la presente lámina puede diseñarse fijando apropiadamente el periodo

55

60

65

de mantenimiento de la forma del tejido no tejido en el cuerpo vivo, el periodo hasta que el tejido no tejido se descompone por completo en el cuerpo vivo y similares, según el grado de daño nervioso, el tipo de fármaco, la velocidad y periodo de liberación del fármaco, y similares.

5 El fármaco que debe contener la presente lámina no está particularmente limitado, aunque, por ejemplo, en el caso de un agente terapéutico para la lesión nerviosa, entre los ejemplos se incluyen la vitamina B12 (incluyendo una sal farmacéuticamente aceptable en el caso de que esté presente la sal. Lo mismo se aplica en adelante). La vitamina B12 incluye la cobalamina y derivados de la misma. Entre los ejemplos más específicos de la misma se incluyen metilcobalamina, cianocobalamina, hidroxocobalamina, sulfocobalamina, adenosilcobalamina y similares, y resultan preferidas las metilcobalamina, cianocobalamina e hidroxocobalamina, y resulta más preferida la metilcobalamina. El contenido de vitamina B12 no está particularmente limitado, aunque, por ejemplo, es preferentemente de entre 0.005 y 0.5 mg, más preferentemente de entre 0.0075 y 0.4 mg, todavía más preferentemente de entre 0.01 y 0.3 mg por 1 cm² de la presente lámina. Además, el contenido de vitamina B12 respecto a 100 % en peso de la presente lámina no se encuentra particularmente limitado, aunque, por ejemplo, es preferentemente de entre 0.3 % y 30 % en peso, más preferentemente de entre 0.45 % y 24 % en peso, todavía más preferentemente de entre 0.6 % y 18 % en peso. El fármaco puede estar contenido solo o puede estar contenido en una combinación de dos o más de los mismos. El contenido del fármaco que debe estar contenido en la presente lámina puede fijarse apropiadamente según el grado de la enfermedad que debe tratarse, el tipo del fármaco, el periodo de liberación, y similares.

20 La presente lámina puede utilizarse, por ejemplo, mediante implantación en un sitio de lesión nerviosa y la periferia del mismo o mediante envoltura de un nervio. Tal como se ha indicado anteriormente, debido a que la presente lámina está formada para presentar flexibilidad, puede seleccionarse apropiadamente el modo de uso. Específicamente, por ejemplo, cuando la presente lámina se aplica en un paciente con daño nervioso mediante cirugía, resulta preferido que la circunferencia del nervio de una zona afectada se pele para exponer el nervio y después se envuelva la presente lámina en torno a la circunferencia del nervio o se aplique de manera que cubra el nervio. Mediante la aplicación de la presente lámina en un nervio dañado de esta manera resulta posible suprimir la infiltración de células inflamatorias en el tejido nervioso, impedir la cicatrización de tejido nervioso debido a la acción dañina de células inflamatorias y estimular la protección y/o regeneración del nervio dañado. Después de dicha aplicación, se restauran los tejidos circundantes y se sutura la piel. La presente lámina se forma flexiblemente y la presente lámina suprime la infiltración de células inflamatorias, pero no proporciona estimulación que afecte adversamente los nervios y tejidos circundantes aunque se aplique en un sitio de lesión nerviosa, debido a que fluye a través líquido corporal que mantiene los tejidos en un estado normal. De esta manera, la presente lámina puede utilizarse mediante envoltura en torno a un nervio o mediante implantación en una periferia del sitio de lesión nerviosa y no necesita extraerse tras el tratamiento del sitio de lesión. En particular, en el caso de que se aplique la presente lámina en un cuerpo vivo y se utilice, resulta preferido realizar el tratamiento de esterilización. Como método de esterilización, resulta preferido seleccionar un método en el que el fármaco contenido no se descomponga y la forma y las propiedades físicas de la lámina no resulten perjudicadas, y entre los ejemplos del mismo se incluyen la esterilización con haz de electrones, un método de esterilización por radiación y esterilización con gas óxido de etileno (EOG).

45 Debido a que la presente lámina presenta una acción neuroprotectora y/o de estimulación de regeneración nerviosa, resulta muy útil en el aspecto de que puede tratarse tanto la lesión nerviosa continua que presenta continuidad en el sitio del daño como la lesión nerviosa discontinua en el que se interrumpe la continuidad en el sitio del daño. Entre los ejemplos de la lesión nerviosa continuo se incluyen la neuropatía por atrapamiento (un estado en el que un nervio está comprimido por tejidos circundantes), tal como el síndrome del túnel carpiano. Además, la presente lámina asimismo resulta eficaz para estimular la regeneración de un nervio después de la sutura del nervio (sutura directa después de la lesión nerviosa), un nervio después de neurólisis y un nervio después del implante neural (en el que el sitio de lesión nerviosa que presenta un defecto se somete a injerto nervioso para proporcionar continuidad). Además, la presente lámina asimismo presenta un efecto de estimulación del tratamiento de la lesión nerviosa discontinuo mediante su uso por sí solo o en combinación con un nervio artificial o similar.

55 El método para producir el tejido no tejido según la presente lámina no se encuentra particularmente limitado, y puede utilizarse un método conocido. Por ejemplo, la presente lámina puede producirse mediante preparación de una solución que contiene un poliéster alifático biodegradable, y un fármaco, tal como vitamina B12, según resulte necesario, y producción de fibra y formación de un tejido no tejido mediante un método conocido, tal como un método de electrohilado, un método de autoensamblaje o un método de separación de fases. Para la preparación de la solución (solución de material en bruto) puede utilizarse un disolvente apropiado. Entre los ejemplos del disolvente se incluyen trifluoroetanol (TFE), 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP), cloroformo, N,N-dimetilformamida (DMF) y similares, y estos pueden utilizarse individualmente o en combinación. El disolvente utilizado en la solución de material en bruto se elimina en la etapa de hilado y no se mantiene en el tejido no tejido. Además, asimismo pueden utilizarse diversos aditivos para ajustar la conductividad eléctrica, la viscosidad y similares. El método de electrohilado con TFE como disolvente es uno de los métodos de producción preferidos ya que se obtiene un tejido no tejido que presenta un efecto más excelente de la presente invención.

En el método de electrohilado, la composición para electrohilado se carga eléctricamente mediante aplicación de un voltaje elevado para producir fibra y después se apilan las fibras para producir un tejido no tejido. El método para cargar la composición para electrohilado se lleva a cabo mediante conexión de un electrodo conectado a un dispositivo de fuente de alimentación de alto voltaje a la composición para el electrohilado de la misma, o un recipiente y la aplicación de un voltaje. El voltaje que debe aplicarse no está particularmente limitado y es, por ejemplo, de entre 10 y 50 kV, más preferentemente de entre 15 y 45 kV, todavía más preferentemente de entre 20 y 40 kV. El tipo de voltaje puede ser corriente continua o corriente alterna. El caudal de la composición para electrohilado no está particularmente limitado y es, por ejemplo, de entre 0.2 y 0.8 ml/h, más preferentemente de entre 0.3 y 0.7 ml/h, todavía más preferentemente de entre 0.4 y 0.6 ml/h. Además, el tamaño de aguja no está particularmente limitado y es, por ejemplo, de entre 24 y 30 G, más preferentemente de entre 25 y 29 G, todavía más preferentemente de entre 26 y 28 G. Además, la distancia (distancia de hilado) entre la aguja y el electrodo diana no está particularmente limitado, sino que es, por ejemplo, de entre 5 y 30 cm, más preferentemente de entre 8 y 25 cm, todavía más preferentemente de entre 10 y 20 cm.

5 Ejemplos

A continuación en la presente memoria se describe en detalle la presente invención basándose en los ejemplos, aunque el alcance de la presente invención no debe interpretarse como limitado por los ejemplos siguientes. Es decir, el alcance de la presente invención no está definido por la descripción anterior o los ejemplos siguientes, sino por las reivindicaciones.

20 Ejemplo 1. Producción de la presente lámina.

Se preparó policaprolactona con un peso molecular medio en número de 101000 medido mediante un método de cromatografía de permeación en gel (valor medio de $n=2$) (asimismo denominado "101 kPCL" en el presente ejemplo) y policaprolactona diol con un peso molecular medio en número de 3865 medido mediante el mismo método (valor medio de $n=2$) (asimismo denominado "3.9 kPCL diol" en el presente contexto).

Se disolvió 101 kPCL y 3.9 kPCL en trifluoroetanol (TFE) en una proporción de (A) 9:1 y (B) 8:2 de manera que la concentración total de 101 kPCL y 3.9 kPCL diol era (A) 7.2 % en peso y (B) 8.1 % en peso respecto a 100 % en peso de TFE, respectivamente, para preparar composiciones para electrohilado. Además, se preparó por separado una composición para electrohilado en la que se había añadido, por ejemplo, metilcobalamina como fármaco, que es un agente terapéutico para la lesión nerviosa, en una cantidad correspondiente a 0.3 % a 30 % en peso respecto a un total de 101 kPCL y 3.9 kPCL diol. En ambos casos, A y B, el contenido de metilcobalamina por 1 cm² de la lámina producida es de entre 0.005 y 0.5 mg, y el contenido de metilcobalamina respecto a 100 % en peso de la lámina producida era de entre 0.3 y 30 % en peso.

Las composiciones preparadas para electrohilado A y B se hilaron utilizando un dispositivo de electrohilado para producir las láminas A y B realizadas en tejidos no tejidos. En este momento, se utilizó una aguja (27 G) como eyector; se fijó una distancia entre la aguja y el electrodo diana en 17 cm; la velocidad de eyección era de 0.5 ml/h y el voltaje aplicado se fijó en 30 kV. Como resultado de la medición del grosor, el peso y la densidad de las láminas producidas, el grosor, peso y densidad de cada una de las láminas A y B fueron de 30 a 70 μm, 0.5 a 10 mg/cm² y 100 a 1000 mg/cm³, respectivamente. Además, al calcular la porosidad basándose en la fórmula indicada en el párrafo anterior [0026] utilizando los resultados de medición de los grosores y el peso por 1 cm² de las láminas A y B, la porosidad de cada una de las láminas A y B era de 50 % a 90 %.

45 Ejemplo 2. Observación mediante microscopía electrónica de barrido.

En la figura 1 se muestran micrografías electrónicas de barrido de las láminas A y B producidas en el ejemplo 1. Además, como resultado de la medición de los diámetros de 10 fibras de las láminas A y B en las micrografías electrónicas, el diámetro de fibra de la lámina A era de 319.2 a 1974.0 nm, y el diámetro de fibra de la lámina B era de 336.5 a 1333.0 nm. Se calculó para cada una el diámetro de fibra medio (\pm desviación estándar). Como ejemplo del resultado, el diámetro de fibra medio de la lámina A era de 933.6 (\pm 457.9) nm y el diámetro de fibra medio de la lámina b era de 799.0 (\pm 328.7) nm.

55 Ejemplo 3. Ensayo de inhibición de la infiltración celular.

Para las tres láminas con diferentes números de producción (lotes de producción) (producción nº 1, producción nº 2 y producción nº 3) de la lámina A producida en el ejemplo 1 y la lámina A' obtenida mediante inmersión de la lámina en solución salina tamponada con fosfato (PBS) durante un mes (en adelante, asimismo denominada "lámina de inmersión en PBS"), respectivamente, se confirmó la capacidad de inhibición de la infiltración celular mediante el método de ensayo siguiente.

60 (1) Preparación de lámina de inmersión en PBS (lámina A')

65 La presente lámina se sumergió en 100 ml de PBS por lámina a 37 °C \pm 1 °C (humedad consecuente) durante 1

mes bajo condiciones de protección contra la luz.

La cantidad total de la lámina y el líquido de inmersión en PBS después de la inmersión se aplicaron en una parte de capa superior del filtro del sistema de filtración (nº de serie: 430770, Corning Incorporated) y se filtró lentamente mediante succión. Se lavó la superficie de pared interior de la parte de capa superior del sistema de filtración y la lámina sobre el filtro con aproximadamente 10 ml de agua purificada y esterilizada (Farmacopea japonesa) 10 veces bajo filtración con succión suave. La lámina se colocó sobre papel de filtro esterilizado y se secó naturalmente en una campana limpia durante 12 horas o más.

(2) Preparación de inserto.

Se desprendió la membrana adherida al inserto de cultivo celular (nº de producción: CBA-102 (parte nº 10201), Cell Biolabs, Inc.). A continuación, la lámina A o la lámina A' recortada en una forma circular con un diámetro de aproximadamente 2.5 cm se adhirió con vaselina blanca (Kenei Pharmaceutical Co., Ltd.) de manera que cubriese la superficie inferior de la superficie lateral del inserto y se envolvió Parafilm en torno a la superficie lateral del inserto para sujetar cada lámina. De manera similar, como control negativo se prepararon tres insertos a los que se unió una membrana con un tamaño de poro de 0.4 µm, y se prepararon tres insertos a los que se unió una membrana con un tamaño de poro de 5 µm a modo de control positivo.

(2) Ensayo de inhibición de la invasión celular.

Se preparó una suspensión celular utilizando un medio libre de suero (RPMI 1640, suero de feto bovino al 10 % (FBS)) de manera que la concentración de células THP-1 (estirpe celular derivada de monocitos humanos, American Type Culture Collection) fuese de 1.5×10^6 células/ml. Se aplicaron 500 µl de medio que contenía suero de feto bovino (factor quimiotáctico) (RPMI 1640, FBS al 10 %) en cada pocillo de una placa de 24 pocillos; se superpuso sobre lo anterior cada inserto (cada uno de los 3 insertos) y se añadieron 100 µl de suspensión celular a la capa superior de cada inserto. En cada una de la lámina A, la lámina A', el control negativo y el control positivo, se preparó como control de blanco para cada una, una lámina mediante la adición de un medio sin suero a la capa superior del inserto. Estas placas de 24 pocillos se protegieron de la luz con papel de aluminio según se necesitase, se introdujeron en un incubador con gas dióxido de carbono (37.0 °C, 5 % de CO₂) y se cultivaron durante 18 horas.

Después del cultivo, la capa inferior de cada inserto se observó utilizando un microscopio de contraste de fases. Se eliminó la suspensión celular de la superficie superior del inserto y el inserto se transfirió a una nueva placa de 24 pocillos que contenía 400 µl de solución de desprendimiento celular y se incubó bajo las condiciones de 37.0 °C y 5 % de CO₂ durante 30 minutos y después se suspendieron las células adheridas a la superficie inferior del inserto. A continuación, se añadieron 400 µl del medio de cultivo que contenía células invasivas que permanecía en la placa después del cultivo, al pocillo del que se había sacado el inserto, y se mezclaron. Se transfirieron 180 µl de cada solución mezclada a una placa de 96 pocillos y se añadieron a cada pocillo 60 µl de la solución mixta preparada de 4x tampón de lisis/colorante Cyquant GR (colorante Cyquant GR: 4 x tampón de lisis=1:74), y la placa se dejó en reposo a temperatura ambiente bajo condiciones de protección de la luz durante 20 minutos. Tras el reposo, se midió la intensidad de fluorescencia de la solución mixta de cada pocillo utilizando un lector de microplacas de fluorescencia (SpectraMax Gemini XPS, Molecular Devices Japan K.K.) bajo la condición de excitación/emisión=480/520, y se calculó el número de células de cada una de lámina A, lámina A', control negativo y control positivo. Después del ensayo de inhibición de la infiltración celular, se aplicó una cantidad apropiada de una solución de azul de metileno al 0.1 % sobre la capa superior del inserto a la que estaba unida la lámina y se confirmó que no había fugas de solución de azul de metileno desde la superficie lateral del inserto. Como un ejemplo del resultado, se muestra en la tabla 1 el número de células infiltrantes en la lámina A y en la tabla 2 se muestra el número de células infiltrantes en la lámina A'.

Tabla 1

	Número de células desplazadas a capa inferior del inserto de la lámina A (células)		
Producción nº 1	Inferior a 2.50×10^3	Inferior a 2.50×10^3	Inferior a 2.50×10^3
Producción nº 2	Inferior a 2.50×10^3	Inferior a 2.50×10^3	Inferior a 2.50×10^3
Producción nº 3	Inferior a 2.50×10^3	Inferior a 2.50×10^3	Inferior a 2.50×10^3
Control negativo	Inferior a 2.50×10^3	Inferior a 2.50×10^3	Inferior a 2.50×10^3
Control positivo	2.53×10^4	2.70×10^4	2.96×10^4

Tabla 2

	Número de células desplazadas a capa inferior del inserto de la lámina A (células)		
Producción nº 1	Inferior a 2.50×10^3	2.94×10^3	Inferior a 2.50×10^3
Producción nº 2	3.09×10^3	Inferior a 2.50×10^3	2.66×10^3
Producción nº 3	2.83×10^3	Inferior a 2.50×10^3	2.53×10^3
Control negativo	Inferior a 2.50×10^3	Inferior a 2.50×10^3	Inferior a 2.50×10^3
Control positivo	3.62×10^4	3.69×10^4	3.57×10^4

5 Tal como resulta evidente a partir de la tabla 1, para las láminas A no utilizadas, se suprimió la permeación celular igual que en el control negativo. Además, tal como resulta evidente a partir de la tabla 2, para las láminas A' sumergidas en PBS bajo la premisa de estar implantadas en el cuerpo vivo durante 1 mes, se observó una tendencia a permear ligeramente células en comparación con el control negativo, aunque, debido a que el número de células permeadas era 1/10 o inferior al número en el control positivo, se confirmó que tanto la lámina A como la lámina A' suprimían la permeación de células. A partir de los resultados anteriores se confirmó que, al aplicar la presente lámina en un nervio en un sitio de daño a nervio periférico y la periferia del mismo, la presente lámina presenta utilidad de impedir la cicatrización neural mediante supresión de la infiltración de células inflamatorias, tales como macrófagos, y muestra una acción neuroprotectora y/o de estimulación de la regeneración nerviosa. Además, a partir de la comparación de los resultados de la lámina A y la lámina A', se confirmó que, con respecto a la acción de supresión de la infiltración de la presente lámina sobre las células inflamatorias, se confirmó la acción más fuerte en el estadio inicial, cuando se aplicó la presente lámina en el cuerpo vivo, y se confirmó que la acción tendía a debilitarse débilmente a medida que progresaba la biodegradación.

Ejemplo 4. Ensayo de permeabilidad de líquidos corporales.

20 Con respecto a las presentes láminas de nº de producción 1 a 3 (las mismas láminas que la lámina A del ejemplo 3), se confirmó la permeabilidad de líquidos corporales mediante el método de ensayo siguiente para medir la permeabilidad de una solución de albúmina.

25 De la misma manera que en el ejemplo 3, se unió a cada inserto la presente lámina de cada número de producción y una membrana de tamaño de poro de $0.4 \mu\text{m}$ a modo de muestra de comparación. Se introdujeron $500 \mu\text{l}$ de solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS) en cada pocillo de una placa de 24 pocillos y se superpuso sobre el mismo cada inserto. Desde la capa superior del inserto, se añadieron $100 \mu\text{l}$ de una solución de albúmina y suero humano (HSA) al 3 % preparada utilizando DPBS. Esta placa de 24 pocillos se protegió de la luz con papel de aluminio según resultase necesario, se introdujo en un incubador con gas dióxido de carbono ($37.0 \text{ }^\circ\text{C}$, 5 % de CO_2) y se dejó en reposo durante 18 horas. Tras el reposo, la solución en la capa inferior de cada inserto se recogió como solución de muestra. Además, para cada muestra (las láminas de los nº de producción 1 a 3 y la muestra de comparación), se preparó una muestra obtenida mediante adición de $100 \mu\text{l}$ de DPBS a la capa superior del inserto, y se dejó la muestra en reposo bajo las mismas condiciones y después se utilizó la solución de la capa inferior del inserto como solución de blanco. Además, se utilizó una solución obtenida mediante adición de $500 \mu\text{l}$ de DPBS y $100 \mu\text{l}$ de una solución de HSA al 3 % a una placa de 24 pocillos sin superposición del inserto, y dejando la placa en reposo bajo las mismas condiciones a las utilizadas para la solución diana (considerada solución de muestra, equilibrando con HSA dentro y fuera del inserto).

40 Para cada una de la solución patrón (cada solución diluida a una concentración de una solución madre patrón de HSA), la solución de muestra, la solución de blanco y la solución diana, se llevó a cabo una cuantificación colorimétrica utilizando el kit de ensayo de proteína BCA (Thermo Fisher Scientific), se preparó una curva de calibración utilizando la absorbancia de la solución patrón y se calculó la concentración de proteína en la solución de medición (valor medio de $n=2$). Tras completar el ensayo, se introdujo una cantidad apropiada de una solución de azul de metileno al 0.1 % sobre la capa superior del inserto al que estaba unida la lámina, y se confirmó que no se había producido fuga de la solución de azul de metileno desde la superficie lateral del inserto. Como un ejemplo de los resultados, se muestran en la tabla 3 las concentraciones de HSA de las soluciones de muestra y la solución diana. El resultado de la concentración de HSA de la solución de blanco en cada muestra era igual o inferior al límite inferior de cuantificación ($25 \mu\text{g/ml}$).

50 Tabla 3

	Concentración de HSA ($\mu\text{g/ml}$)
Producción nº 1	3895
Producción nº 2	3819
Producción nº 3	3945
Muestra de comparación	2162
Solución de control	4320

5 Tal como resulta evidente a partir de la tabla 3, debido a que las concentraciones de HSA de las soluciones de muestra de las presentes láminas de los nº de producción 1 a 3 eran más altas que la de la solución de muestra o la muestra de comparación, se confirmó que la presente lámina tiende a permear más HSA que la muestra de comparación. Además, debido a que la concentración de HSA de las soluciones de muestra de la presente lámina no era significativamente diferente de la concentración de HSA de la solución de control, se confirmó que la permeabilidad de HSA prácticamente no experimentó cambios según la presencia o ausencia de la presente lámina. A partir de los resultados anteriormente proporcionados se ha confirmado que la presente lámina permea 10 suficientemente un líquido corporal en el cuerpo vivo, y de esta manera, presenta la utilidad de no proporcionar una estimulación que afecte adversamente a los nervios en la neuroprotección y/o estimulación de la regeneración nerviosa.

REIVINDICACIONES

1. Lámina que:
- 5 - comprende un tejido no tejido formado de fibra que contiene un poliéster alifático biodegradable que presenta una distribución de peso molecular en la que existe un valor máximo en por lo menos dos o más zonas del peso molecular,
- 10 - presenta una porosidad de 60 a 80 %, y
- 10 - presenta un grosor de 30 a 70 μm , y
- 15 - presenta una acción supresora de infiltración celular.
- 15 2. Lámina según la reivindicación 1, en la que:
- 15 - el peso de la lámina es 0.5 a 10 mg/cm^2 , y/o
- 20 - la densidad de la lámina es 100 a 1,000 mg/cm^3 , y/o
- 20 - la fibra presenta un diámetro de fibra medio de 300 a 1500 nm.
- 25 3. Lámina según la reivindicación 1 o 2, en la que por lo menos una de las zonas del peso molecular es una zona de un peso molecular medio en número de 1,000 a 7,000 antes del tratamiento de esterilización.
- 25 4. Lámina según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que por lo menos una de las zonas del peso molecular es una zona de un peso molecular medio en número de 40,000 a 150,000, preferentemente 50,000 a 140,000, antes del tratamiento de esterilización.
- 30 5. Lámina según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la zona del peso molecular son por lo menos dos zonas de una zona de un peso molecular medio en número de 1,000 a 7,000 y una zona de un peso molecular medio en número de 40,000 a 150,000, preferentemente 50,000 a 140,000, antes del tratamiento de esterilización.
- 35 6. Lámina según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que, cuando el poliéster alifático biodegradable que presenta un valor máximo sobre un lado de peso molecular más bajo de entre los poliésteres alifáticos biodegradables contenidos en la fibra que forman el tejido no tejido se define como un componente de peso molecular bajo, y el poliéster alifático biodegradable que presenta un valor máximo sobre un lado de peso molecular más alto de entre los poliésteres alifáticos biodegradables contenidos en la fibra que forman el tejido no tejido se define como un componente de peso molecular alto, la relación de masa del contenido del componente de peso molecular bajo respecto a la suma del contenido del componente de peso molecular bajo y un contenido del componente de peso molecular alto en el tejido no tejido es 0.01 a 0.3, preferentemente 0.02 a 0.2.
- 40 7. Lámina según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que el poliéster alifático biodegradable es por lo menos uno de policaprolactona, policaprolactona diol, ácido poliláctico, ácido poliglicólico, y copolímeros de los mismos, y más preferentemente por lo menos uno de policaprolactona, policaprolactona diol, y copolímeros de las mismas.
- 45 8. Lámina según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que la célula es una célula inflamatoria.
- 50 9. Lámina según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que la lámina presenta además una acción neuroprotectora y/o estimuladora de la regeneración nerviosa, preferentemente resultando dicha acción a partir de la supresión de la cicatrización neural.
- 55 10. Lámina según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la que la lámina contiene además un fármaco, preferentemente un agente terapéutico para la lesión nerviosa, más preferentemente vitamina B12, y todavía más preferentemente metilcobalamina.
- 60 11. Lámina según la reivindicación 10, que contiene vitamina B12 en una cantidad de 0.005 a 0.5 mg, preferentemente 0.0075 a 0.4 mg, por 1 cm^2 de la lámina.
- 60 12. Lámina según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, que se ha sometido a un tratamiento de esterilización, preferentemente a esterilización por haz de electrones o esterilización por EOG.
- 65 13. Lámina según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 para la utilización en un método terapéutico, en la que la lámina se implanta en la periferia de un sitio de lesión nerviosa o se enrolla alrededor de un nervio en un sitio de lesión nerviosa en un cuerpo vivo, preferentemente un cuerpo vivo humano.

[Fig. 1]

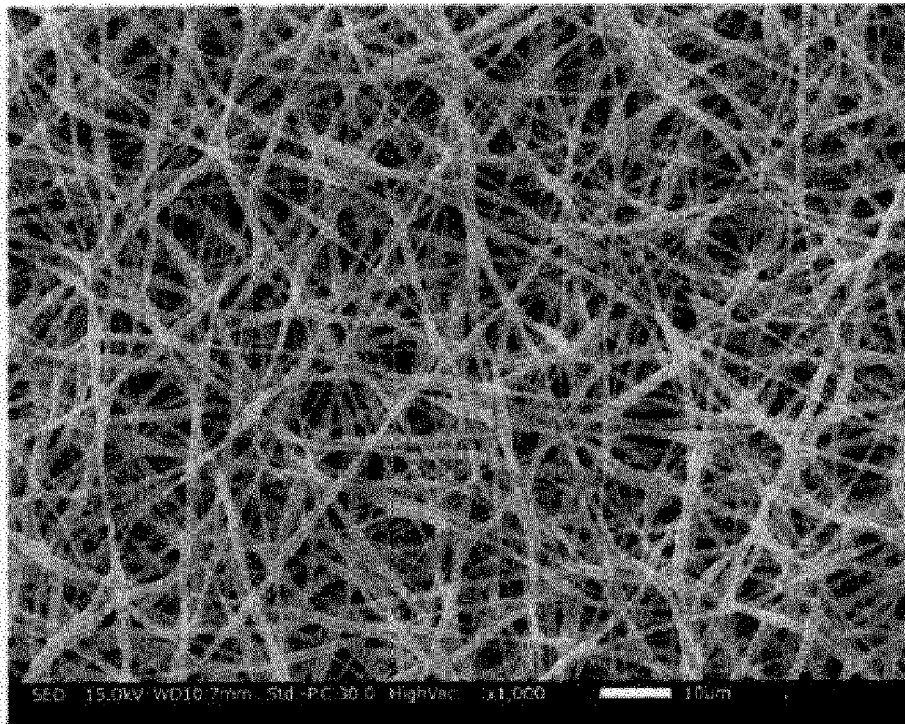


Lámina A

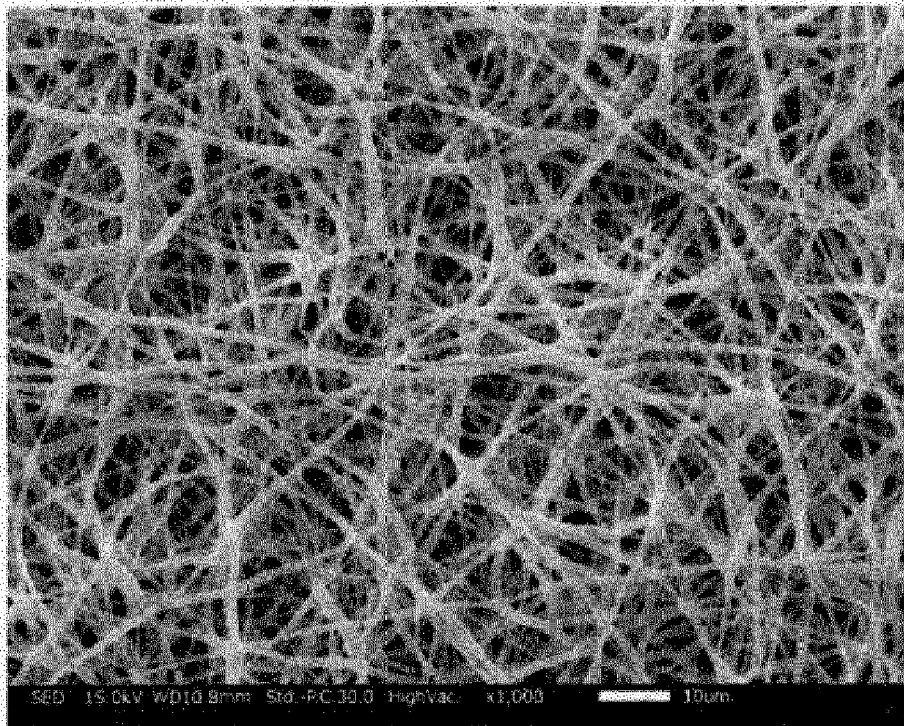


Lámina B