

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 621 280**

51 Int. Cl.:

C08B 37/08 (2006.01)

C08L 5/08 (2006.01)

C08L 71/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.03.2013 E 13161184 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.03.2017 EP 2644623**

54 Título: **Material de implantación que comprende un polímero biocompatible**

30 Prioridad:

26.03.2012 KR 20120030540

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

03.07.2017

73 Titular/es:

**GENEWEL CO., LTD (100.0%)
6F, Star Tower 223-25, Sangdaewon-dong
Jungwon-gu Seongnam-si
Gyeonggi-do 462-807, KR**

72 Inventor/es:

**LEE, YOUNG WOO;
CHO, WAN JIN y
JANG, JI YEON**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 621 280 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

Material de implantación que comprende un polímero biocompatible

5 Antecedentes de la invención

Campo de la invención

10 La presente invención se refiere a una película de derivado de epóxido de ácido hialurónico, y más particularmente, a una película de derivado de epóxido de ácido hialurónico que se prepara permitiendo que un reticulante de epóxido reaccione con una mezcla de ácido hialurónico y un polímero que contiene un grupo terminal hidroxilo (-OH) y que tiene resistencia física mejorada, estabilidad *in vivo*, flexibilidad, adhesividad a tejido biológico y biocompatibilidad.

15 Descripción del estado de la técnica

20 El ácido hialurónico, aislado por primera vez del humor vítreo por Meyer y Palmer en 1934, es un mucopolisacárido polianiónico y es un biopolímero que se encuentra muy extendido en la naturaleza (Meyer K. et al., Journal of Biology and Chemistry 107 629-34 (1934)). El ácido hialurónico se encuentra abundantemente en placentas de animales, ojos y tejidos conjuntivos tales como articulaciones, y también se produce en microorganismos de *Streptococcus* sp., *Streptococcus equi*, *Streptococcus zooepidemicus* y similares. Tiene una estructura en la que unidades de repetición de ácido glucurónico y N-acetilglucosamina, que están unidas por enlaces glucosídicos $\beta(1,3)$, se unen ininterrumpidamente entre sí por enlaces glucosídicos $\beta(1,4)$ para formar una estructura de cadena larga (Balazs E. A. et al., Biochemical Journal, 235, 903, 1986; Toole B.P. et al., Journal of Internal Medicine, 242, 35-40 (1997)).

30 El ácido hialurónico tiene excelente biocompatibilidad y es altamente viscoelástico en un estado en solución. Gracias a tales propiedades, el uso del ácido hialurónico está muy extendido no solo en aplicaciones cosméticas, que incluyen aditivos cosméticos, sino también en diversas aplicaciones farmacéuticas, que incluyen adyuvantes quirúrgicos oftálmicos, agentes que mejoran la función de la articulación, materiales de administración de fármacos y colirios. Sin embargo, debido a que el ácido hialurónico se degrada fácilmente *in vivo* o en condiciones ácidas o alcalinas, el uso del mismo está limitado. Por tanto, ha habido muchos esfuerzos por desarrollar derivados de ácido hialurónico estructuralmente estables (Laurent T.C. et al., Portland Press Ltd., Londres, 1998).

35 Los derivados de ácido hialurónico tienen excelente biocompatibilidad, estabilidad física y biodegradabilidad, y así se han desarrollado para su uso en diversas aplicaciones, que incluyen implantes para cirugía plástica, agentes que mejoran la función de la articulación, materiales de administración de fármacos, armazones de cultivo celular y materiales para prevenir la adhesión posquirúrgica.

40 Entre los métodos de obtención de derivados de ácido hialurónico, se han desarrollado métodos que emplean reticulantes de epóxido para proporcionar productos en diversas formas, entre las que se incluyen, soluciones, geles, fibras, esponjas y películas. En las patentes de EE.UU. N.º 4.500.676, 4.713.448, 4.716.224, 4.716.154, 4.886.787, 4.963.666, 5.827.937, etc, se desvelan métodos de producción de estos productos.

45 Sin embargo, las películas de derivado de epóxido de ácido hialurónico tienen problemas porque durante el secado se produce encogimiento, dificultando la producción de películas uniformes, y porque durante la purificación la resistencia física de las películas se reduce.

50 En un intento por vencer estos problemas que se producen en la producción de películas de derivado de epóxido de ácido hialurónico, la publicación de patente coreana abierta a consulta al público N.º 2009-0012439 desvela una película que tiene flexibilidad y resistencia física mejoradas, que se produce por reticulación superficial de ácido hialurónico (HA) y carboximetilcelulosa (CMC). Sin embargo, si el contenido de HA es elevado, la película tendrá baja resistencia física, y así se enrollará en un estado húmedo, y si el contenido de CMC es elevado, la película tendrá una velocidad de biodegradación lenta, de manera que permanecerá durante un tiempo más largo del requerido, causando así reacciones de cuerpos extraños.

Sumario de la invención

60 Por consiguiente, la presente invención se ha creado en vista de los problemas que se producen en el estado de la técnica, y es un objetivo de la presente invención proporcionar una película de derivado de epóxido de ácido hialurónico que tenga una forma uniforme y resistencia física excelentes, que no comprenda un resto de derivado de CMC y se prepare mientras que se evitan los problemas que se producen durante el secado y la purificación del derivado de ácido hialurónico.

65 La película de derivado de epóxido de ácido hialurónico de la presente invención se caracteriza por su excelente resistencia física, estabilidad *in vivo*, flexibilidad, adhesividad a tejido biológico y biocompatibilidad.

Los objetivos anteriores y otros de la presente invención, pueden llevarse a cabo por la misma como se describe a continuación.

5 La presente invención se ha creado con el fin de resolver los problemas que se producen en el estado de la técnica y proporciona una película de derivado de epóxido de ácido hialurónico que tiene una forma uniforme y excelente resistencia física, estabilidad *in vivo*, flexibilidad, adhesividad a tejido biológico y biocompatibilidad, que se prepara usando un polímero que comprende un grupo terminal de hidroxilo para impedir el encogimiento y una disminución en la resistencia física que se producen durante el secado y la purificación del derivado de ácido hialurónico.

10 Breve descripción de los dibujos

Los objetivos, características y ventajas anteriores y otros de la presente invención se entenderán más claramente a partir de la siguiente descripción detallada tomada conjuntamente con el dibujo adjunto, en el que:

15 la FIG. 1 es una vista esquemática que muestra una estructura en la que un polímero que contiene un grupo terminal de hidroxilo se une físicamente a ácido hialurónico reticulado según la presente invención, y una estructura que queda después de la purificación y de la que se eliminó en su mayoría el polímero que contiene el grupo terminal de hidroxilo;

20 la FIG. 2 es un conjunto de fotografías obtenidas en el Ejemplo de prueba 1 de la presente invención y que muestra una comparación de forma entre una película que comprende un polímero que contiene grupo terminal de hidroxilo y una película que no comprende el polímero que contiene grupo terminal de hidroxilo;

la FIG. 3 muestra el espectro de IR de una película de derivado de epóxido de ácido hialurónico que comprende un polímero que contiene grupo terminal de hidroxilo, medido en el Ejemplo de prueba 2 de la presente invención;

25 la FIG. 4 muestra una comparación de resistencia a la tracción entre las películas de derivado de epóxido de ácido hialurónico (grupos experimentales 1, 2 y 3), la barrera de adhesión comercialmente disponible Interceed (grupo de comparación 1) y la membrana de regeneración ósea guiada Bio-Gide (grupo de comparación 2), llevada a cabo en el Ejemplo de prueba 4 de la presente invención;

30 la FIG. 5 muestra una comparación de resistencia a la tracción entre una película de derivado de epóxido de ácido hialurónico tratada con un disolvente orgánico y una película de derivado de epóxido de ácido hialurónico no tratada con un disolvente orgánico, llevada a cabo en el Ejemplo de prueba 4 de la presente invención;

la FIG. 6 es un conjunto de fotografías que muestran los resultados de la tinción de tejido llevada a cabo para determinar el tiempo de residencia *in vivo* de las películas de derivado de ácido hialurónico en el Ejemplo de prueba 5 de la presente invención;

35 la FIG. 7 es un conjunto de gráficos que muestran el grado de adhesión y la resistencia de adhesión en tres grupos experimentales tratados con películas de derivado de epóxido de ácido hialurónico de la presente invención, un grupo de comparación 1 tratado con la barrera de adhesión comercialmente disponible Interceed y un grupo de control no tratado con un agente anti-adhesión, medido para evaluar el rendimiento anti-adhesión en el Ejemplo de prueba 6 de la presente invención; y

40 la FIG. 8 es un conjunto de fotografías que muestran el grado de regeneración ósea en el grupo experimental 3 tratado con una película de epóxido de ácido hialurónico de la presente invención, el grupo de comparación 2 tratado con la membrana de regeneración ósea guiada Bio-Gide, y un grupo de control cuyo defecto óseo no se trató con nada, medido en el Ejemplo de prueba 7 de la presente invención.

45 Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona una película de derivado de epóxido de ácido hialurónico que comprende 50-90 % en peso de ácido hialurónico y 10-50 % en peso de un polímero que contiene un grupo terminal hidroxilo (-OH), en la que dicho polímero se une físicamente a un derivado de epóxido de ácido hialurónico reticulado, y es uno o más seleccionado del grupo que consiste en poli(óxido de etileno), poli(óxido de propileno), un copolímero de poli(óxido de etileno)-poli(óxido de propileno), un copolímero de poli(óxido de etileno)-ácido poliláctico, un copolímero de poli(óxido de etileno)-ácido poliláctico-glicólico, un copolímero de poli(óxido de etileno)-policaprolactona, poli(óxido de butileno), poli(oxietileno alquil éteres), derivados de aceite de ricino con polioxietileno, ésteres de ácidos grasos de sorbitano con polioxietileno y poli(estearatos de etileno), y en la que el derivado de ácido hialurónico se prepara permitiendo que un reticulante de epóxido reaccione con ácido hialurónico o hialuronato solo o en combinación con un polímero capaz de formar un enlace covalente de éter con ácido hialurónico.

La invención también proporciona una película de derivado de epóxido de ácido hialurónico como se define anteriormente en este documento para su uso como una barrera de adhesión o una membrana de regeneración ósea guiada.

En lo sucesivo, la presente invención se describirá en detalle.

65 Específicamente, en la presente invención, ácido hialurónico y un polímero que contiene un grupo terminal de hidroxilo se mezclan entre sí, y el ácido hialurónico se reticula con un reticulante de epóxido que tiene al menos dos grupos epóxido. Como se muestra en la FIG. 1, el polímero que contiene el grupo terminal de hidroxilo sirve para

El reticulante de epóxido que se usa en la presente invención es uno o más seleccionado del grupo que consiste en diglicidil éter de polietilenglicol, diglicidil éter de 1,4-butanodiol, diglicidil éter de etilenglicol, diglicidil éter de 1,6-hexanodiol, diglicidil éter de propilenglicol, diglicidil éter de poli(propilenglicol), diglicidil éter de poli(tetrametilenglicol), diglicidil éter de neopentilglicol, poliglicidil éter de poliglicerol, poliglicidil éter de diglicerol, poliglicidil éter de glicerol, poliglicidil éter de trimetilpropano, 1,2-(bis(2,3-epoxipropoxi)etileno), poliglicidil éter de pentaeritritol y poliglicidil éter de sorbitol.

El reticulante que contiene al menos dos grupos funcionales epoxi sirve para reaccionar con los grupos terminales de hidroxilo (-OH) para formar un enlace éter que reticula el ácido hialurónico.

El reticulante de epóxido puede usarse en una cantidad de 1-100 partes en peso, y preferentemente 5-50 partes en peso, basadas en 100 partes en peso de unidades de repetición del ácido hialurónico. Si el reticulante se usa en una cantidad inferior a 5 partes en peso, la película resultante se deformará debido a su alta capacidad de absorción de agua y será difícil de purificar, y si el reticulante se usa en una cantidad superior a 50 partes en peso, la película se romperá fácilmente y quedará una gran cantidad de reticulante en la película.

El disolvente orgánico que se usa para mejorar la resistencia física de la película de derivado de epóxido de ácido hialurónico en la presente invención puede ser sulfóxido de dimetilo (DMSO), dimetilformamida (DMF), acetonitrilo, tetrahidrofurano (THF), acetona, una solución acuosa de acetona, un alcohol C₁-C₆ tal como metanol o etanol, o una solución acuosa de alcohol.

El derivado de epóxido de ácido hialurónico puede secarse en un estado hidratado para preparar una película, una membrana, esponja o polvo.

La película de derivado de epóxido de ácido hialurónico según la presente invención tiene una alta capacidad para absorber agua, y así puede promover la hemostasia y cicatrización absorbiendo exudados y sangre de la herida.

Además, la película de derivado de epóxido de ácido hialurónico tiene alta resistencia física (véase la FIG. 4), y así es fácil de operar y puede proteger una parte afectada de los tejidos circundantes.

Además, debido a que es estable a las enzimas, formará una barrera física durante un tiempo dado, y entonces se degradará completamente y absorberá *in vivo* (véase la FIG. 6).

Gracias a estas propiedades, la película de derivado de epóxido de ácido hialurónico puede usarse como material de reparación de tejido, una membrana de regeneración ósea guiada o una barrera de adhesión, pero no se limita a esto.

Además, la membrana de regeneración ósea guiada o barrera de adhesión de la presente invención puede comprender además una sustancia natural antibacteriana o antiinflamatoria que puede ser un extracto de té verde, cúrcuma, cubiertas de semilla de judía negra, hojas de la flor de la rosa, *Paeonia radix*, raíces de *Platydodon grandiflorum*, brotes de judía, cubiertas de semilla de cebada coloreadas, flores de camelia, trigo sarraceno, pomelos, regaliz, *Coptis chinensis*, *Astragalus membranaceus*, *Phellodendron amurense*, *Scutellaria baicalensis*, canela, vinagre de madera, *Rubus coreanus*, *Galla rhois*, *Juniperus chinensis*, *Forsythia*, hojas de *Capsicum annuum*, *Mentha arvensis*, *Duchesnea chrysanthe*, mora, *Saururus chinensis*, pino, *Artemisia capillaries*, *Houttuynia cordata*, *Prunus yedoensis* o *Sasa borealis*.

En lo sucesivo, la presente invención se describirá en detalle con referencia a los ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos son para fines ilustrativos, y aquellos expertos en la materia apreciarán que son posibles diversas modificaciones, adiciones y sustituciones, sin apartarse del alcance y espíritu de la invención como se desvela en las reivindicaciones adjuntas.

Ejemplos

Ejemplos 1 a 4: Formación de reticulaciones en polímeros que pueden usarse en una mezcla con ácido hialurónico

En los Ejemplos 1 a 4, con el fin de determinar si polímeros que pueden usarse en una mezcla con ácido hialurónico se reticulan o no para formar un enlace covalente de éter, se mezcló 1 % en peso de cada uno de ácido hialurónico, ácido algínico, gelatina y colágeno con una solución al 1 % en peso de ácido hialurónico a una relación de 50:50, y se añadió 5 % en peso de poli(óxido de etileno) a la misma. Entonces, cada uno de los reticulantes de epóxido (diglicidil éter de 1,4-butanodiol), diglicidil éter de polietilenglicol, diglicidil éter de polipropileno y neopentil diglicidil éter) se añadió a cada una de las mezclas en una cantidad de 5 partes en peso basadas en 100 partes en peso de unidades de repetición de la mezcla de polímero. Entonces, cada uno de la mezcla se sometió a una reacción de reticulación a temperatura ambiente durante 12 horas, y los materiales sólidos formados se almacenaron en agua desionizada durante 1 hora. Se examinó si los materiales sólidos se disolvieron o no en agua desionizada para determinar si se formaron o no reticulaciones.

Tabla 1

Ejemplos	Polímeros	Reticulantes	Disuelto o no disuelto
Ejemplo 1	Ácido hialurónico	Glicidil éter de 1,4-butanodiol	No disuelto
		Diglicidil éter de polietilenglicol	No disuelto
		Diglicidil éter de polipropilenglicol	No disuelto
		Neopentil diglicidil éter	No disuelto
Ejemplo 2	Ácido algínico	Glicidil éter de 1,4-butanodiol	No disuelto
		Diglicidil éter de polietilenglicol	No disuelto
		Diglicidil éter de polipropilenglicol	No disuelto
		Neopentil diglicidil éter	No disuelto
Ejemplo 3	Gelatina	Glicidil éter de 1,4-butanodiol	No disuelto
		Diglicidil éter de polietilenglicol	No disuelto
		Diglicidil éter de polipropilenglicol	No disuelto
		Neopentil diglicidil éter	No disuelto
Ejemplo 4	Colágeno	Glicidil éter de 1,4-butanodiol	No disuelto
		Diglicidil éter de polietilenglicol	No disuelto
		Diglicidil éter de polipropilenglicol	No disuelto
		Neopentil diglicidil éter	No disuelto

Como puede apreciarse en la Tabla 1 anterior, los materiales sólidos preparados mezclando cada uno de ácido hialurónico, ácido algínico, gelatina y colágeno, con cada uno del reticulante de epóxido, se hincharon sin disolverse en agua desionizada. Estos resultados sugieren que, cuando se mezcla ácido hialurónico, ácido algínico, gelatina o colágeno con el reticulante de epóxido, se forma un enlace covalente de éter en su interior de manera que el polímero esté establemente presente en agua desionizada.

Ejemplo 5: Preparación de una película de derivado de epóxido de ácido hialurónico que comprende un polímero que contiene un grupo terminal de hidroxilo

En este ejemplo, se usó óxido de propileno como polímero que contiene un grupo terminal de hidroxilo. Se dispuso una solución obtenida mezclando 10 % en peso de ácido hialurónico con 30 % en peso de óxido de propileno en NaOH 0,25 N en cada uno de tres reactores. Se añadió polietileno diglicidil éter a la solución en cada reactor en cantidades de 5, 10 y 25 partes en peso basadas en 100 partes en peso del ácido hialurónico de cada solución. Cada una de las mezclas se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 24 horas, y cada uno de los productos de reacción se extendió uniformemente en un plato rectangular, y entonces se secó a temperatura ambiente durante 12 horas, preparando así películas primarias. Las películas primarias se lavaron con agua purificada para eliminar los materiales sin reaccionar y el poli(óxido de propileno), y entonces precipitaron en etanol y se encogieron, preparando así películas secundarias. Las películas secundarias se hincharon en agua purificada y se secaron, preparando así las películas de derivado final. Las películas de derivado preparadas para su uso en los Ejemplos de prueba de la presente invención se llamaron "grupo experimental 1" (5 partes en peso), "grupo experimental 2" (10 partes en peso) y "grupo experimental 3" (25 partes en peso) según la cantidad de reticulante usada.

Ejemplo comparativo 1: Preparación de una película de derivado de epóxido de ácido hialurónico que no comprende un polímero que contiene un grupo terminal de hidroxilo

Se disolvió 10 % en peso de ácido hialurónico en NaOH 0,25 N para preparar una solución de ácido hialurónico. Se añadió diglicidil éter de polietilenglicol a la solución en una cantidad de 25 partes en peso basadas en 100 partes en peso del ácido hialurónico, y la mezcla se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 24 horas. La solución de reacción se extendió uniformemente en un plato rectangular y se secó a temperatura ambiente a temperatura ambiente durante 12 horas para preparar una película primaria que entonces se lavó con agua purificada para eliminar materiales sin reaccionar. El derivado hidratado resultante se precipitó en etanol y se encogió para preparar una película secundaria que entonces se hinchó en agua purificada y se secó, preparando así una película de derivado final. La película de derivado preparada en el Ejemplo comparativo 1 se llamó "grupo experimental 4".

Ejemplos de prueba

Ejemplo de prueba 1: Comparación de la forma entre una película que comprende un polímero que contiene grupo terminal de hidroxilo y una película que no comprende polímero que contiene grupo terminal de hidroxilo

Con el fin de examinar la uniformidad de la película que comprende el polímero que contiene el grupo terminal de hidroxilo, se compararon entre sí la forma de la película primaria preparada en el Ejemplo 5 y Ejemplo comparativo 1 por fotografías.

Como se muestra en la FIG. 2, la película que no comprende polímero que contiene grupo terminal de hidroxilo se encogió significativamente y se enrolló después del secado, mientras que la película que comprendía el polímero que contenía grupo terminal de hidroxilo se encogió ligeramente en el borde, pero no se enrolló. Estos resultados sugieren que el polímero que contiene grupo terminal de hidroxilo funciona previniendo el encogimiento durante el

proceso en el que la solución solidifica en la película.

Ejemplo de prueba 2: Análisis de la estructura de película de derivado de epóxido de ácido hialurónico

5 Se disolvió 1 % en peso de ácido hialurónico en agua desionizada para preparar una solución de ácido hialurónico, y se disolvió 10 % en peso de un polímero que contenía un grupo terminal de hidroxilo en agua desionizada para preparar una solución. Cada una de las soluciones preparadas se dispuso en un plato rectangular y se secó a temperatura ambiente durante 12 horas, preparando así una película de ácido hialurónico y una película de polímero que contenía grupo terminal de hidroxilo. Se analizaron por ATR-IR las estructuras de la película de ácido hialurónico, la película de polímero que contenía grupo terminal de hidroxilo, grupo experimental 3 y grupo experimental 4.

15 La FIG. 3 muestra los espectros de IR de las películas. Como puede apreciarse en esta, la película de polímero que contiene grupo terminal de hidroxilo mostró un pico fuerte a 2885 cm^{-1} (C-H, metileno), y similar a éste, el grupo experimental 3 que comprende el polímero que contiene grupo terminal de hidroxilo también mostró un pico fuerte a 2925 cm^{-1} , sugiriendo que el ácido hialurónico se mezcló con el polímero que contenía grupo terminal de hidroxilo. Estos resultados revelan que, en el caso del derivado de ácido hialurónico que comprende el polímero que contiene grupo terminal de hidroxilo, queda una cantidad específica del polímero que contiene grupo terminal de hidroxilo incluso después de la purificación.

20 Ejemplo de prueba 3: Medición de la resistencia física del derivado de epóxido de derivado de ácido hialurónico

25 Se midieron comparativamente las resistencias físicas de los grupos experimentales 1, 2 y 3 en el Ejemplo 5, la barrera de adhesión comercialmente disponible Interceed (J&J, EE.UU.) como grupo de comparación 1 y la membrana de regeneración ósea guiada Bio-Gide (Geistlich Pharma AG, Suiza) como grupo de comparación 2. Para la medición, cada una de las muestras se cortó en un tamaño de 3 cm x 1 cm y se dispuso en la sujeción de un medidor de material universal (Instron, EE.UU.), y entonces se midió la fuerza aplicada a cada una de las muestras a una velocidad de tracción de 10 mm/min.

30 La FIG. 4 muestra una comparación de resistencia a la tracción (N) entre los grupos experimentales y los grupos de comparación. Como puede apreciarse en esta, a medida que aumentaba el contenido de reticulante, aumentaba la resistencia física, y todos los grupos experimentales mostraron resistencias a la tracción más altas que el grupo de comparación 1 (Interceed). Sin embargo, el grupo experimental 1 mostró una resistencia a la tracción ligeramente más baja en comparación con el grupo de comparación 2 (Bio-Gide), pero esta diferencia no fue estadísticamente significativa.

35 Estos resultados sugieren que la película de derivado de ácido hialurónico tiene resistencia física adecuada de manera que puede usarse como una barrera de adhesión o una membrana de regeneración ósea guiada.

40 Ejemplo de prueba 4: Comparación entre resistencia física entre película tratada con disolvente orgánico y película no tratada con disolvente orgánico

45 Con el fin de comparar la resistencia física de la película, obtenida tratando el ácido hialurónico (HA) hidratado con etanol en el Ejemplo 5, con la de la película no tratada con etanol, se prepararon muestras del mismo modo que el Ejemplo 5, excepto que los derivados de HA hidratados no se precipitaron en etanol. Se midió la resistencia física de cada una de las muestras preparada como se describe en el Ejemplo 5.

50 Como puede apreciarse en la FIG. 5, las muestras tratadas con etanol mostraron resistencias físicas más altas que las muestras no tratada con etanol. Estos resultados indican que el proceso para tratar el derivado de ácido hialurónico con un disolvente orgánico tal como etanol aumenta la resistencia física del derivado de ácido hialurónico.

Ejemplo de prueba 5: Evaluación del tiempo de residencia *in vivo* de la película de derivado de ácido hialurónico

55 Con el fin de evaluar el tiempo de residencia *in vivo* de las muestras preparadas en el Ejemplo 5, se realizó una prueba en animales usando ratas SD de 8 semanas de vida. Específicamente, las ratas se anestesiaron inyectando un anestésico en la región abdominal inferior de las ratas, y cada muestra, que tenía un tamaño de 5 mm x 10 mm, se implantó en la porción de lomo de cada rata. 2, 4 y 12 semanas después de la implantación, se realizó análisis histológico (tinción H & E) para evaluar si la muestra seguía.

60 La FIG. 6 muestra los resultados del análisis histológico. Como puede apreciarse en esta, el grupo experimental 1 se detectó *in vivo* hasta 2 semanas, pero no se detectó a las 4 y 12 semanas. Estos resultados sugieren que el tiempo de residencia *in vivo* de la película de derivado de epóxido de ácido hialurónico cambia dependiendo del contenido del reticulante, pero el derivado de epóxido de ácido hialurónico se mantiene establemente *in vivo* durante un tiempo específico sin ser degradarse fácilmente.

65 Ejemplo de prueba 6: Evaluación del efecto anti-adhesión de la película de derivado de epóxido de ácido hialurónico

Usando modelos animales (ratas SD), se evaluó el efecto anti-adhesión de las muestras preparadas en el Ejemplo 5. Específicamente, las ratas se anestesiaron inyectando un anestésico en la región abdominal inferior de las ratas. Se hizo una incisión en el abdomen de cada una de las ratas anestesiadas, y se formó una herida que tenía un tamaño de 1 cm x 2 cm en la porción epidérmica del peritoneo usando una fresa de hueso, y se hirió el ciego que estaba en contacto con la herida de forma que se desprendiera ligeramente la epidermis. Se comparó la adhesión de tejido entre un grupo de control, en el que no se usó barrera de adhesión entre las heridas, grupo de comparación 1 (Interceed) y los grupos experimentales 1, 2 y 3 preparados en el Ejemplo 5. Cada una de las muestras se cortó en un tamaño de 2 cm x 3 cm antes de su uso. Basándose en una escala de 4 grados (0, 1, 2 y 3; valores mayores indican adhesión más grave), se evaluó el grado de adhesión de tejido usando un sistema de clasificación de la adhesión (A. A. Luciano, et al., "Evaluation of commonly used adjuvants in the prevention of postoperative adhesions", Am. J. Obstet. Gynecol., 146, 88-92 (1983)).

Además, para los animales en los que se produjo adhesión de tejido, la resistencia de la adhesión se evaluó basándose en una escala de 3 grados (1, 2 y 3; mayores valores indican resistencias de adhesión más fuertes).

La FIG. 7 muestra los resultados de la evaluación de la adhesión de tejido y la intensidad de adhesión, obtenidos en la prueba de animales. Como puede apreciarse en esta, los grados de adhesión de tejido en los grupos experimentales 1, 2 y 3 fueron $0,67 \pm 0,82$, $1,25 \pm 0,96$, y 0, respectivamente, que fueron más bajos que $2,6 \pm 0,54$ para el grupo de control y $2,5 \pm 0,58$ para el grupo de comparación. Además, las intensidades de adhesión en los grupos experimentales 1, 2 y 3 fueron $0,5 \pm 0,54$, $1 \pm 0,8$ y 0, respectivamente, que fueron más bajas que $1,6 \pm 0,54$ para el grupo de control y $1,75 \pm 0,5$ para el grupo de comparación 1.

Los resultados de la prueba del efecto anti-adhesión indican que el efecto anti-adhesión de la película de derivado de epóxido de ácido hialurónico de la presente invención cambió ligeramente dependiendo del contenido del reticulante, pero la película de la presente invención mostró una gravedad de la adhesión más baja en comparación con el grupo de control y el grupo de comparación 1, sugiriendo que es eficaz para impedir la adhesión de tejido.

Ejemplo de prueba 7: Evaluación del grado de regeneración ósea resultante de la película de derivado de epóxido de ácido hialurónico

Con el fin de examinar el efecto de regeneración del enlace del grupo experimental 3 preparado en el Ejemplo 5, se usaron ratas SD de 8 semanas de vida como modelos animales. Los animales se anestesiaron, y después se hizo una incisión de aproximadamente 4 cm en la piel del centro de la ceja, después de lo cual se hizo una incisión del periostio, y en este estado, se formó un área de defecto que tenía un diámetro de 8 mm (defecto de tamaño crítico) de forma que no se dañaran los vasos sanguíneos que pasaban a través de la duramadre y la línea media craneal (J. P Schmitz et al., Clin. Orthop. Relat. Res., 205, 299 (1986)). Después, cada uno del grupo experimental 3 y grupo de comparación 2, se cortó en una forma circular que tenía un tamaño de Φ 12 mm, y el área de defecto se cubrió con cada una de las muestras cortadas, y se suturaron el periostio y la piel. Además, también se probó el grupo de control en el que el área de defecto óseo no se trató con nada. Después de haberse criado los animales durante 12 semanas, los animales se sacrificaron, y se recogió el área de defecto óseo de los animales y se analizó por micro-CT y rayos X suaves para evaluar los efectos de regeneración ósea de las muestras.

Los resultados del análisis se muestran en la FIG. 8. Como puede apreciarse en esta, el efecto de regeneración ósea del grupo experimental 1 fue superior al del grupo de control e igual al de la membrana de regeneración ósea guiada comercialmente disponible Bio-Gide (grupo de comparación 2). Estos resultados indican que la película de derivado de epóxido de ácido hialurónico tiene excelente capacidad para regenerar hueso.

Como se ha descrito anteriormente, la presente invención proporciona la película de derivado de epóxido de ácido hialurónico que tiene uniformidad mejorada, resistencia física, estabilidad *in vivo*, flexibilidad, adhesión a tejido biológico y biocompatibilidad.

Además, la película de derivado de epóxido de ácido hialurónico de la presente invención, tiene una excelente biocompatibilidad, biodegradabilidad, estabilidad física y similares, y por tanto puede usarse en diversas aplicaciones entre las que se incluyen apósitos para heridas, armazones celulares, materiales de administración de fármacos, membrana de regeneración ósea guiada y barrera de adhesión.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una película de derivado de epóxido de ácido hialurónico que comprende 50-90 % en peso de ácido hialurónico y 10-50 % en peso de un polímero que contiene un grupo terminal hidroxilo (-OH), en la que dicho polímero se une físicamente a un derivado de epóxido de ácido hialurónico reticulado, y es uno o más seleccionado del grupo que consiste en poli(óxido de etileno), poli(óxido de propileno), un copolímero de poli(óxido de etileno)-poli(óxido de propileno), un copolímero de poli(óxido de etileno)-ácido poliláctico, un copolímero de poli(óxido de etileno)-ácido poliláctico-glicólico, un copolímero de poli(óxido de etileno)-poli-caprolactona, poli(óxido de butileno), polioxietilén alquil éteres, derivados de aceite de ricino con polioxietileno, ésteres de ácidos grasos de sorbitano con polioxietileno, y poli(estearatos de etileno), y en la que el derivado de ácido hialurónico se prepara permitiendo que un reticulante de epóxido reaccione con ácido hialurónico o hialuronato solo o en combinación con un polímero capaz de formar un enlace covalente de éter con ácido hialurónico.
- 15 2. La película de derivado de epóxido de ácido hialurónico de la reivindicación 1, en la que la película de derivado tiene una densidad de reticulación del 1-100 % en moles.
- 20 3. La película de derivado de epóxido de ácido hialurónico de la reivindicación 1, en la que el hialuronato es uno o más seleccionado del grupo que consiste en hialuronato de sodio, hialuronato de potasio, hialuronato de calcio, hialuronato de magnesio, hialuronato de cinc, hialuronato de cobalto e hialuronato de tetrabutylamonio.
- 25 4. La película de derivado de epóxido de ácido hialurónico de la reivindicación 1, en la que el polímero capaz de formar el enlace covalente de éter con ácido hialurónico es uno o más seleccionado del grupo que consiste en ácido hialurónico, colágeno, ácido algínico, heparina, gelatina, elastina, fibrina, laminina, fibronectina, proteoglicano, sulfato de heparano, sulfato de condroitina, sulfato de dermatano y sulfato de queratina.
- 30 5. La película de derivado de epóxido de ácido hialurónico de la reivindicación 1, en la que el reticulante de epóxido es uno o más seleccionado del grupo que consiste en diglicidil éter de polietilenglicol, glicidil éter de 1,4-butanodiol, diglicidil éter de etilenglicol, diglicidil éter de 1,6-hexanodiol, diglicidil éter de propilenglicol, diglicidil éter de poli(propilenglicol), diglicidil éter de poli(tetrametilenglicol), diglicidil éter de neopentilglicol, poliglicidil éter de poliglicerol, poliglicidil éter de diglicerol, poliglicidil éter de glicerol, poliglicidil éter de trimetilpropano, 1,2-(bis(2,3-epoxipropoxi)etileno), poliglicidil éter de pentaeritritol y poliglicidil éter de sorbitol.
- 35 6. La película de derivado de epóxido de ácido hialurónico de la reivindicación 1, en la que el reticulante se usa en una cantidad de 1-100 partes en peso basadas en 100 partes en peso de unidades de repetición del ácido hialurónico.
- 40 7. La película de derivado de epóxido de ácido hialurónico de la reivindicación 1, en la que la película de derivado se prepara por precipitación en un disolvente orgánico después de la purificación del derivado de epóxido de ácido hialurónico.
- 45 8. La película de derivado de epóxido de ácido hialurónico de la reivindicación 1 para su uso como una barrera de adhesión o una membrana de regeneración ósea guiada.
9. La película de derivado de epóxido de ácido hialurónico para su uso según la reivindicación 8, en la que la película de derivado comprende además una sustancia natural antibacteriana y antiinflamatoria.

Fig. 01

—cadena de ácido hialurónico — reticulante de epóxido ...cadena de polímero que contiene grupo terminal de hidroxilo

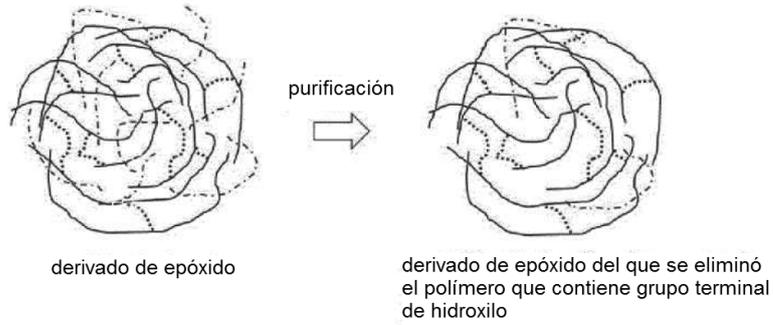


Fig. 02

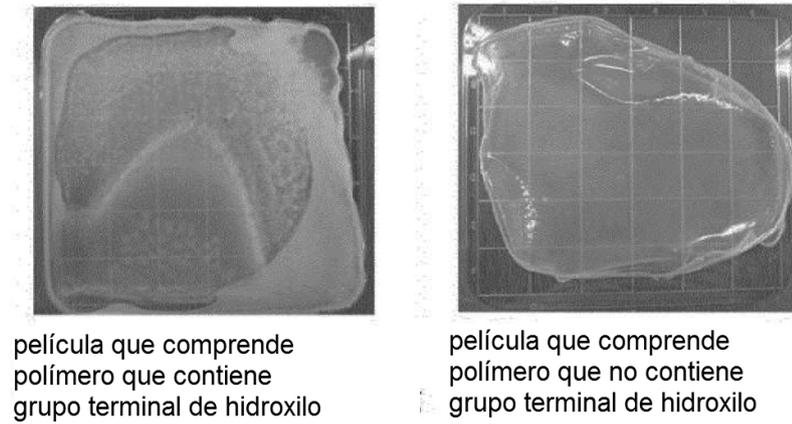


Fig. 03

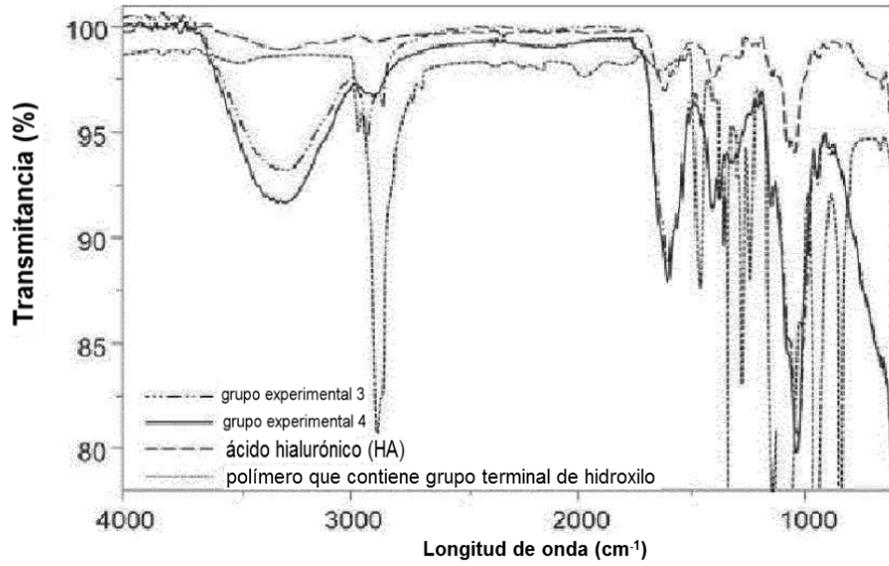


Fig. 04

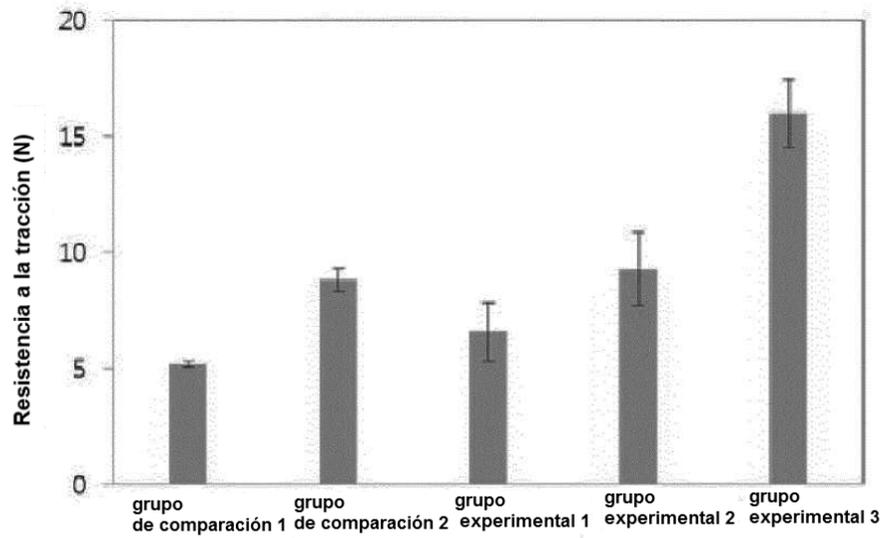


Fig. 05

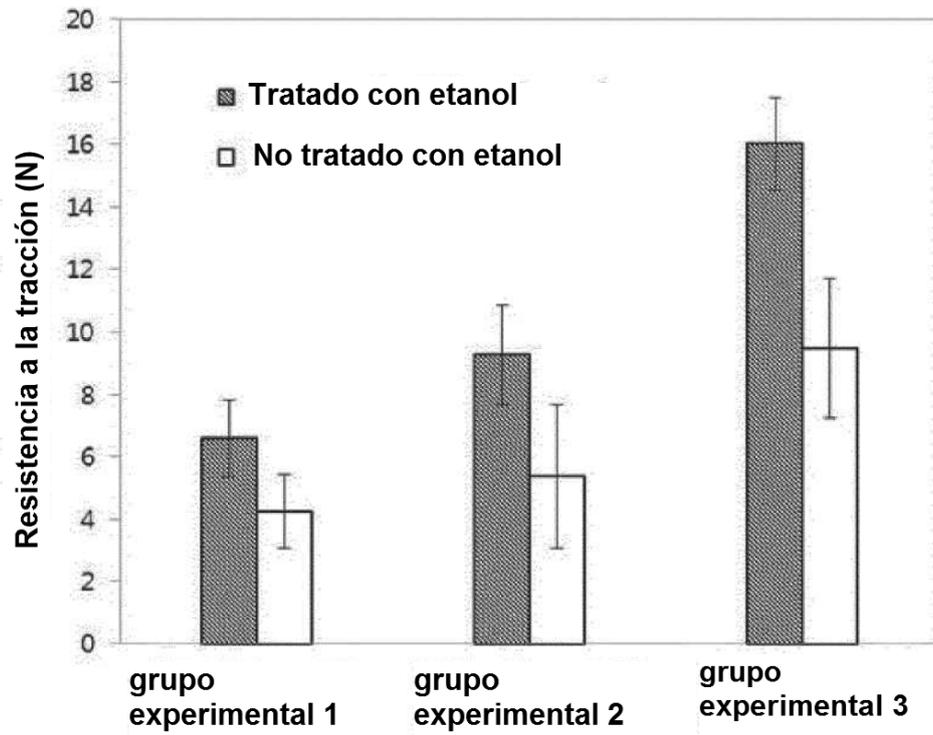


Fig. 06

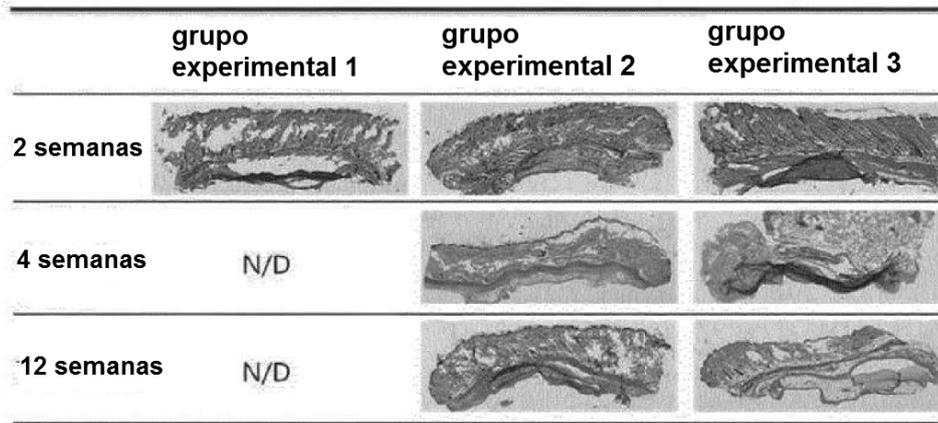


Fig. 07

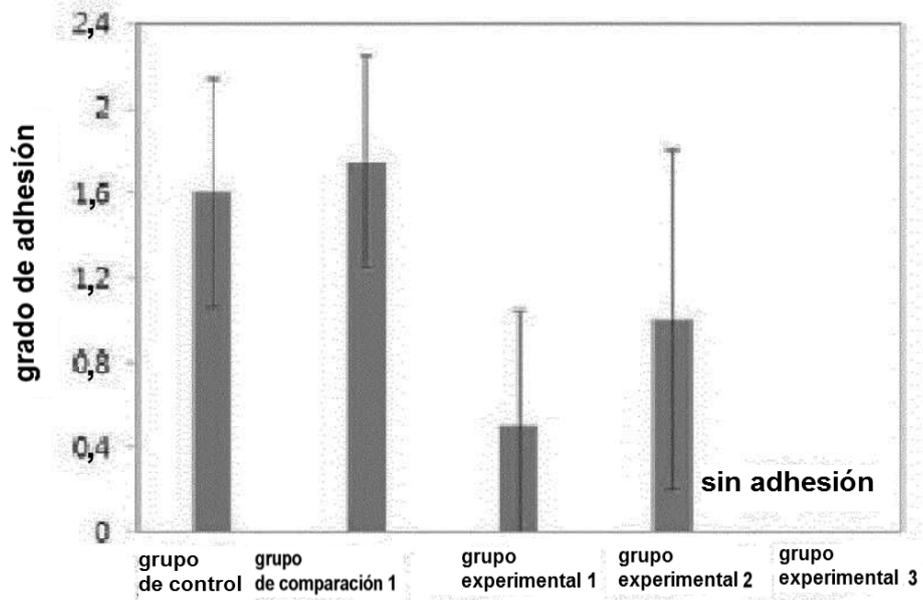
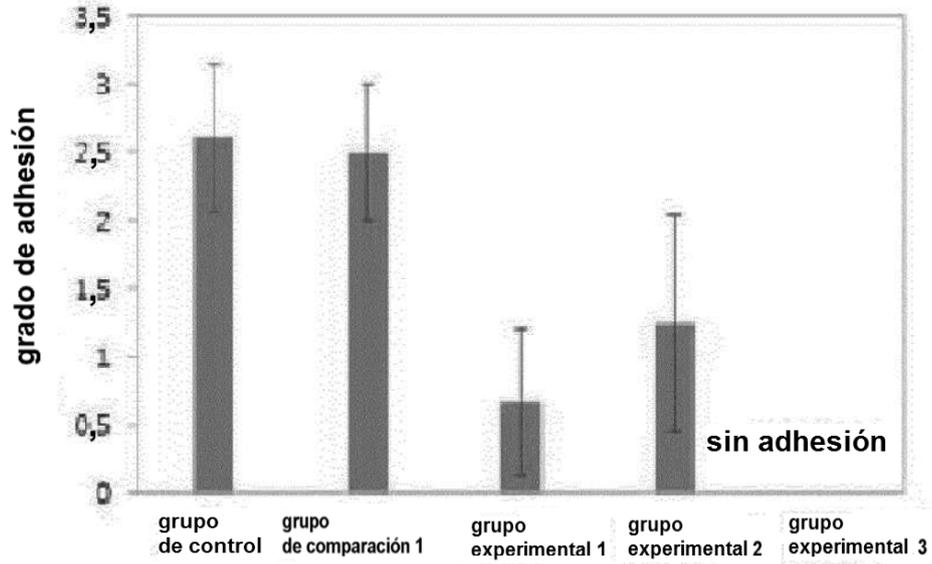


Fig. 08

