

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 767 717**

51 Int. Cl.:

A61L 31/10 (2006.01)

A61L 31/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.04.2016 PCT/KR2016/003451**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.10.2016 WO16159734**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.04.2016 E 16773515 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.11.2019 EP 3278820**

54 Título: **Aguja de inyección sin sangrado recubierta con quitosano reticulado en el que se introducen un grupo catecol y un grupo catecol oxidado**

30 Prioridad:

03.04.2015 KR 20150047329

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

18.06.2020

73 Titular/es:

**INNOTHERAPY INC. (100.0%)
No.1209 ACE Hi-Tech City 2 25 Seonyu-ro 13-gil
Yeongdeungpo-gu
Seoul 07282, KR**

72 Inventor/es:

**LEE, HAESHIN;
SHIN, MIKYUNG;
LEE, MOON SUE y
OH, SUK SONG**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 767 717 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

Aguja de inyección sin sangrado recubierta con quitosano reticulado en el que se introducen un grupo catecol y un grupo catecol oxidado

5

Campo técnico

La presente invención se refiere a una aguja de inyección hemostática recubierta con un quitosano en el que se introducen y se reticulan un grupo catecol y un grupo catecol oxidado.

10

Antecedentes en la técnica

El desarrollo de productos hemostáticos y adhesivos convencionales se ha centrado en su uso en operaciones quirúrgicas. Los agentes y adhesivos hemostáticos médicos típicos incluyen adhesivos a base de cianoacrilato aprobados por la FDA y pegamento de fibrina a base de proteína de coagulación sanguínea *in vivo*. Sin embargo, tales productos hemostáticos y adhesivos no satisfacen toda la fuerza adhesiva, propiedades de larga duración después de la aplicación, baja toxicidad, respuestas inmunes *in vivo*, etc. Por lo tanto, en el desarrollo de agentes hemostáticos, el desarrollo de materiales que tienen biocompatibilidad y tienen una excelente adhesión al tejido se ha convertido en un tema importante.

15

20

La patente US2013261567 desvela agujas de fístula de hemodiálisis con un material coagulante en la base de la aguja.

25

Mientras tanto, el quitosano es ampliamente conocido como un biopolímero que tiene una excelente capacidad hemostática. Sin embargo, el quitosano tiene desventajas porque tiene una solubilidad significativamente baja en soluciones neutras y es soluble solo en soluciones ácidas. Debido a tales desventajas, el uso de quitosano como material médico es limitado.

30

En consecuencia, se han informado estudios sobre la introducción del importante grupo funcional catecol que contribuye a la adhesión del mejillón, aumentando así la solubilidad del quitosano y la adhesión del quitosano a la mucosa y al tejido. Por ejemplo, la Publicación Internacional de Patentes n.º WO2013-077475 desvela una composición adhesiva de hidrogel que comprende: un quitosano acoplado al grupo catecol; y un Pluronic que tiene un grupo tiol acoplado a su extremo. Más particularmente, desvela una composición adhesiva, que es estable *in vivo* e *in vitro*, es sensible a la temperatura, tiene un excelente efecto hemostático y, por lo tanto, puede usarse como agente bioadhesivo, y también desvela un agente adhesivo, un agente antiadhesivo y un agente de prevención de la adsorción de superficie para uso médico, que comprende la composición adhesiva. Además, el hidrogel o película formados usando el quitosano acoplado al grupo catecol tienen una función excelente de modo que pueden sustituir a los agentes hemostáticos convencionales que se usan en operaciones quirúrgicas.

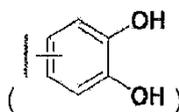
35

40

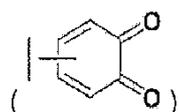
Sin embargo, la formulación como la que se describe anteriormente es una forma desarrollada en vista de la conveniencia de las operaciones quirúrgicas, y tiene el problema de que no satisface toda la fuerza adhesiva, propiedades de larga duración después de la aplicación, baja toxicidad, respuestas inmunes *in vivo*, etc.

45

En consecuencia, los presentes inventores han realizado estudios para desarrollar una aguja de inyección hemostática que es un nuevo tipo de dispositivo médico que no provoca sangrado, y como resultado, han encontrado que una aguja de inyección recubierta con un quitosano, en el que un grupo de catecol



50 y un grupo catecol oxidado



55

se introducen y se reticulan de acuerdo con la presente invención, pueden suprimir eficazmente el sangrado durante y después de la inyección, completando así la presente invención.

Sumario de la invención

60

Es un objeto de la presente invención proporcionar un hidrogel de recubrimiento para aguja de inyección a fin de prevenir el sangrado durante y después de la inyección.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar una aguja de inyección hemostática que comprende el hidrogel de recubrimiento para aguja de inyección descrito anteriormente recubierto en su superficie.

5 Todavía otro objeto de la presente invención es proporcionar un método para fabricar la aguja de inyección hemostática descrita anteriormente.

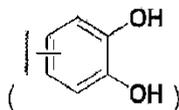
Todavía otro objeto de la presente invención es proporcionar un método de inyección (que no forme parte de la invención) que no provoque ningún sangrado usando la aguja de inyección hemostática descrita anteriormente.

10 Para lograr el objetivo anterior, la presente invención proporciona el uso de un hidrogel para recubrir una aguja de inyección que evita el sangrado durante la inyección, que comprende un quitosano en el que se introduce un grupo catecol y al menos una porción del grupo catecol se oxida y se reticula.

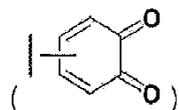
15 La presente invención también proporciona una aguja de inyección hemostática que comprende el hidrogel de recubrimiento para aguja de inyección descrito anteriormente recubierto en su superficie.

La presente invención también proporciona un método para preparar la aguja de inyección hemostática descrita anteriormente, el método que comprende las etapas de:

20 (1) preparar una solución de un quitosano en el que un grupo catecol



25 y un grupo catecol al menos parcialmente oxidado

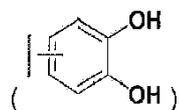


se introducen y se reticulan parcialmente; y

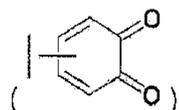
30 (2) recubrir la superficie de una aguja de inyección con la solución de la etapa (1).

También se proporciona un método de inyección (que no forma parte de la invención) que no provoca sangrado, el método que comprende las etapas de:

35 (1) preparar una solución de un quitosano en el que un grupo catecol



40 y un grupo catecol al menos parcialmente oxidado



se introducen y se reticulan parcialmente;

45 (2) preparar una aguja de inyección hemostática recubriendo la superficie de una aguja de inyección con la solución de la etapa (1); y

(3) realizar la inyección en un ser humano o un animal mediante el uso de la aguja de inyección hemostática preparada en la etapa (2).

Breve descripción de los dibujos

50 La Fig. 1 representa imágenes de los resultados de la microscopía electrónica de barrido realizada para analizar la forma y los componentes de una aguja de inyección hemostática fabricada en el Ejemplo 1.

La Fig. 2 es un gráfico que muestra el espesor de una película recubierta en cada una de las agujas de inyección

hemostáticas fabricadas en los Ejemplos 1 a 3, y las imágenes en la parte inferior de la Fig. 2 muestran formas de película medidas por microscopía electrónica de barrido.

La Fig. 3 muestra experimentos *ex vivo* realizados para confirmar el mecanismo hemostático de una aguja de inyección hemostática fabricada en el Ejemplo 1.

La Fig. 4 (A) muestra los resultados de la espectrometría UV-Vis de una solución de quitosano-catecol (roja) utilizada para la fabricación de una aguja de inyección hemostática. El espectro azul corresponde a una solución de quitosano-catecol utilizada como control en el que no se indujo la oxidación parcial y la reticulación del catecol.

La Fig. 4 (B) muestra los resultados del análisis de resonancia magnética nuclear de hidrógeno¹ de una solución de quitosano-catecol (roja) utilizada para la fabricación de una aguja de inyección hemostática.

La Fig. 4 (C) es un gráfico que muestra las propiedades reológicas observadas al exponer películas, cada una formada por una solución de quitosano-catecol, a solución salina (parte superior: una solución de quitosano-catecol en la que no se indujo la oxidación parcial y la reticulación del catecol; parte inferior: una solución de quitosano-catecol utilizada en los Ejemplos 1 a 3).

La Fig. 5 muestra resultados experimentales *in vivo* para una aguja de inyección hemostática fabricada en el Ejemplo 1. Específicamente, la Fig. 5 (A) muestra un efecto hemostático evaluado usando un modelo de la vena safena de ratón; la Fig. 5 (B) es un gráfico que muestra la cantidad de sangrado observado usando un modelo de la vena safena de ratón; y la Fig. 5 (C) muestra un efecto hemostático evaluado utilizando un modelo de la vena de la oreja de conejo.

Mejor modo para realizar la invención

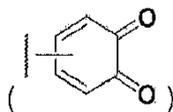
A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en este documento tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por un experto en la materia a la que pertenece la invención. Generalmente, la nomenclatura utilizada en el presente documento y los métodos experimentales, que se describirán a continuación, son los bien conocidos y comúnmente empleados en la técnica.

A continuación, la presente invención se describirá en detalle.

La presente invención proporciona el uso de un hidrogel para recubrir una aguja de inyección que evita el sangrado durante la inyección, que comprende un quitosano en el que se introduce un grupo catecol y al menos una porción del grupo catecol está oxidada y reticulada.

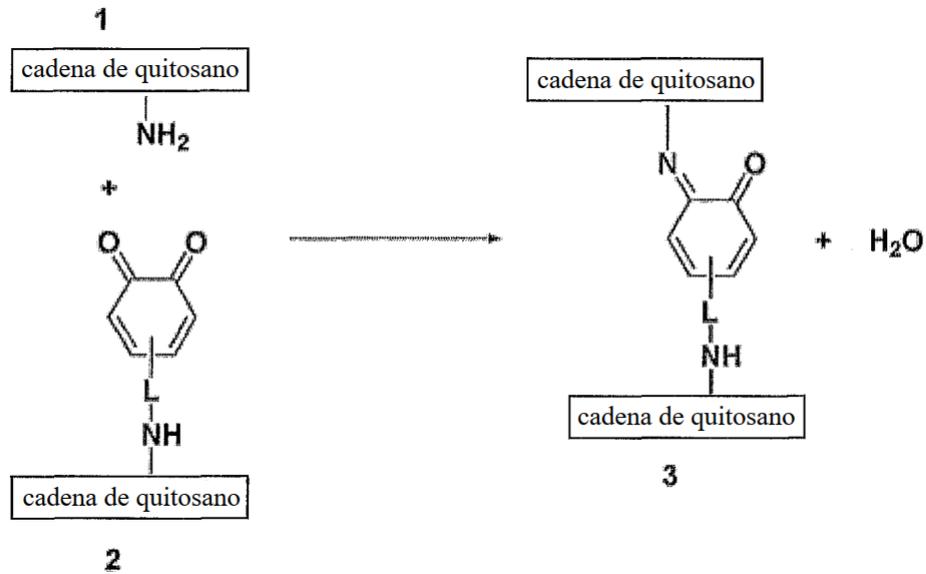
En este documento, el grupo -OH del grupo catecol en el hidrogel se oxida parcialmente a un grupo =O y, a continuación se reticula por una reacción de deshidratación-condensación con un grupo -NH₂ contenido en el quitosano, y el grado de oxidación del grupo catecol es preferiblemente del 1 al 20 % (en base molar) del grupo catecol contenido en el hidrogel. Si el grado de oxidación del grupo catecol es inferior al 1 % del grupo catecol contenido en el hidrogel, habrá un problema porque la reticulación con el grupo -NH₂ contenido en el quitosano no se induce suficientemente, y si el grado de oxidación del grupo catecol es más del 20 % pero no más del 80 % del grupo catecol contenido en el hidrogel, será posible el recubrimiento de la aguja, pero habrá un problema porque el grado de curado de la película recubierta aumenta de modo que la película no puede exhibir un efecto hemostático. Si el grado de oxidación del grupo catecol es más del 80 % del grupo catecol contenido en el hidrogel, habrá un problema porque el grado de curado por reticulación aumenta y, por lo tanto, se obtienen propiedades que no son deseables para recubrir la aguja.

La expresión "reticulación por una reacción de deshidratación-condensación" significa que, como se muestra en el siguiente esquema de reacción 1, el grupo oxo (=O) del grupo catecol oxidado

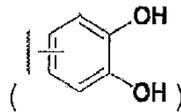


reacciona con un grupo amina (-NH₂) posicionado en una orientación adecuada en el quitosano, formando así un enlace.

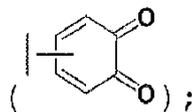
Esquema de reacción 1



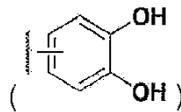
5 en el que el compuesto representado por la fórmula 1 indica el grupo amina (-NH₂) del quitosano introducido con el grupo catecol



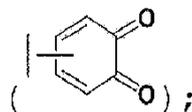
10 y el grupo catecol oxidado



15 en el que el compuesto representado por la fórmula 2 indica el grupo catecol oxidado del quitosano introducido con el grupo catecol

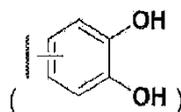


20 y el grupo catecol oxidado

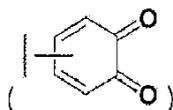


25 en el que el compuesto representado por la fórmula 3 indica un compuesto por una reacción de deshidratación-condensación entre el compuesto representado por la fórmula 1 y el compuesto representado por la fórmula 2; y en el que L es un enlace sencillo, alquileo C₁₋₈ de cadena lineal o ramificada, o -C(=O)-R¹-, en el que R¹ es un enlace sencillo o alquileo C₁₋₈ de cadena lineal o ramificada.

Específicamente, un precursor del quitosano introducido con el grupo catecol



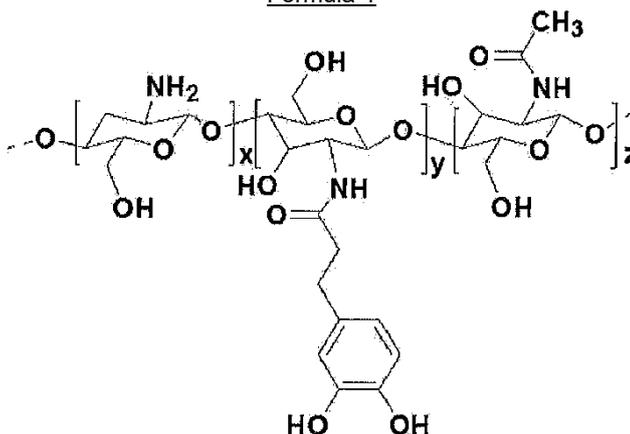
y el grupo catecol oxidado



5 es un quitosano no introducido con el grupo catecol oxidado, y la estructura química específica del quitosano introducido con el grupo catecol, utilizada en los ejemplos a continuación, es como se muestra en la siguiente fórmula 4:

10

Fórmula 4



en la que x:y:z es preferiblemente 6:1:3.

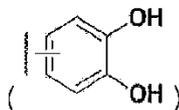
15 La presente invención también proporciona una aguja de inyección hemostática que comprende el hidrogel de recubrimiento para aguja de inyección descrito anteriormente recubierto en su superficie. En este documento, el espesor del hidrogel recubierto en la aguja de inyección hemostática es preferiblemente de 2 a 30 μm . Si el espesor es inferior a 2 μm , habrá un problema porque el hidrogel se incluye en una cantidad insuficiente para evitar que ocurra sangrado durante y después de la inyección, y por lo tanto, no se previene el sangrado de manera efectiva y

20 si el espesor es superior a 30 μm , habrá un problema porque el espesor del hidrogel recubierto en la aguja es grueso y, por lo tanto, el hidrogel no ingresa al cuerpo vivo junto con la aguja de inyección durante la inyección y es empujado por la piel, lo que indica que el sangrado no se impide de forma efectiva.

La presente invención también proporciona un método para fabricar la aguja de inyección hemostática descrita anteriormente, el método que comprende las etapas de:

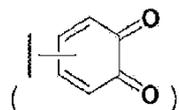
25

(1) preparar una solución de un quitosano en el que un grupo catecol



30

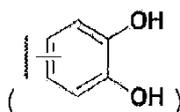
y un grupo catecol al menos parcialmente oxidado



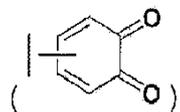
35 se introducen y se reticulan parcialmente; y
(2) recubrir la superficie de una aguja de inyección con la solución de la etapa (1).

A continuación, el método para fabricar la aguja de inyección hemostática se describirá en detalle paso a paso.

40 En el método para fabricar la aguja de inyección hemostática según la presente invención, la etapa (1) es una etapa para preparar una solución de un quitosano en el que un grupo catecol



y un grupo catecol al menos parcialmente oxidado



5

se introducen y se reticulan parcialmente.

10 En este caso, la solución puede obtenerse disolviendo en un disolvente un quitosano introducido con un grupo catecol y almacenando la solución de quitosano para inducir la oxidación parcial y la reticulación del grupo catecol. En este documento, la temperatura para almacenar el quitosano es preferiblemente de 0 a 20 °C, más preferiblemente de 2 a 10 °C, mucho más preferiblemente de 3 a 5 °C, lo más preferiblemente de 4 °C. Además, el tiempo para almacenar el quitosano es preferiblemente de 1 a 5 días, más preferiblemente de 2 a 4 días, lo más preferiblemente de 3 días. El quitosano introducido con el grupo catecol está contenido preferiblemente en una cantidad del 1 al 2 % en peso, más preferiblemente del 1,3 al 1,7 % en peso, lo más preferiblemente del 1,5 % en peso, basado en el peso total de la solución.

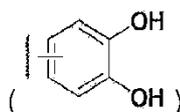
20 Si la temperatura y el tiempo de almacenamiento de quitosano y el contenido del quitosano introducido con el grupo catecol están fuera de los rangos especificados anteriormente, puede producirse un problema porque no se obtienen las propiedades físicas de una película requerida para recubrir la aguja de inyección hemostática.

25 En el método para fabricar la aguja de inyección hemostática según la presente invención, la etapa (2) es una etapa para recubrir la superficie de una aguja de inyección con la solución de la etapa (1). Específicamente, la etapa (2) es una etapa para poner la solución en la aguja de inyección, y a continuación recubrir uniformemente la superficie de la aguja de inyección mientras se gira la aguja de inyección a cierta velocidad.

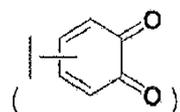
30 En este caso, el espesor del recubrimiento de la aguja de inyección puede ajustarse dependiendo de la cantidad de solución utilizada, y por lo tanto pueden recubrirse agujas de inyección que tienen una variedad de diámetros diferentes.

También se proporciona un método de inyección (que no forma parte de la invención) que no provoca sangrado, el método que comprende las etapas de:

35 (1) preparar una solución de un quitosano en el que un grupo catecol



y un grupo catecol al menos parcialmente oxidado



40

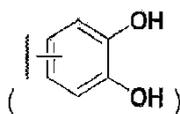
se introducen y se reticulan parcialmente;

(2) preparar una aguja de inyección hemostática recubriendo la superficie de una aguja de inyección con la solución de la etapa (1); y

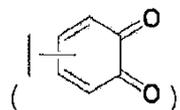
45 (3) realizar la inyección en un ser humano o un animal mediante el uso de la aguja de inyección hemostática preparada en la etapa (2).

A continuación, se describirá en detalle paso a paso el método de inyección que no provoca sangrado.

50 En el método de inyección que no provoca sangrado, la etapa (1) es una etapa para preparar una solución de un quitosano en el que un grupo catecol



y un grupo catecol al menos parcialmente oxidado



5

se introducen y se reticulan parcialmente.

10 En este caso, la solución puede obtenerse disolviendo en un disolvente un quitosano introducido con un grupo catecol y almacenando la solución de quitosano para inducir la oxidación parcial y la reticulación del grupo catecol. En este documento, la temperatura para almacenar el quitosano es preferiblemente de 0 a 20 °C, más preferiblemente de 2 a 10 °C, mucho más preferiblemente de 3 a 5 °C, lo más preferiblemente de 4 °C. Además, el tiempo para almacenar el quitosano es preferiblemente de 1 a 5 días, más preferiblemente de 2 a 4 días, lo más preferiblemente de 3 días. El quitosano introducido con el grupo catecol está contenido preferiblemente en una cantidad del 1 al 2 % en peso, más preferiblemente del 1,3 al 1,7 % en peso, lo más preferiblemente del 1,5 % en peso, basado en el peso total de la solución.

20 Si la temperatura y el tiempo de almacenamiento de quitosano y el contenido del quitosano introducido con el grupo catecol están fuera de los rangos especificados anteriormente, puede producirse un problema porque no se obtienen las propiedades físicas de una película necesaria para recubrir la aguja de inyección hemostática.

25 En el método de inyección que no provoca sangrado, la etapa (2) es una etapa para preparar una aguja de inyección hemostática recubriendo la superficie de una aguja de inyección con la solución de la etapa (1). Específicamente, la etapa (2) es una etapa para poner la solución en la aguja de inyección, y a continuación recubrir uniformemente la superficie de la aguja de inyección mientras se gira la aguja de inyección a cierta velocidad.

30 En este caso, el espesor del recubrimiento de la aguja de inyección puede ajustarse dependiendo de la cantidad de solución utilizada, y por lo tanto pueden recubrirse agujas de inyección que tienen una variedad de diámetros diferentes.

En el método de inyección que no provoca sangrado, la etapa (3) es una etapa para realizar la inyección en un ser humano o un animal mediante el uso de la aguja de inyección hemostática preparada en la etapa (2).

35 En este documento, el método de inyección que no provoca sangrado se caracteriza por que una capa de recubrimiento en la superficie de la aguja de inyección hemostática se expone a un ambiente soluble en agua *in vivo* y se somete a una transición de fase a un hidrogel que sella un sitio perforado causado por inyección para así prevenir el sangrado. Para asegurar un tiempo suficiente para la conversión al hidrogel, la aguja de inyección hemostática se mantiene preferiblemente en un estado inyectado durante 10 a 30 segundos después de la inyección. Si el tiempo durante el cual la aguja de inyección hemostática se mantiene *in vivo* es inferior a 10 segundos, habrá un problema porque no se garantiza un tiempo suficiente para la conversión al hidrogel y, por lo tanto, no se previene el sangrado de manera efectiva, y si el tiempo durante el cual la aguja de inyección hemostática se mantiene *in vivo* es más de 30 segundos, se puede garantizar un tiempo suficiente para la conversión al hidrogel, pero habrá un problema porque se produce un hematoma debido a la irritación de la piel.

45 Los siguientes experimentos se realizaron para evaluar la capacidad hemostática de la aguja de inyección hemostática según la presente invención.

50 Primero, la aguja de inyección hemostática fabricada en el Ejemplo 1 se observó con un microscopio electrónico de barrido. Como resultado de la observación, se descubrió que la forma de la aguja de inyección hemostática fabricada en el Ejemplo 1 se mantenía, y la superficie de la aguja de inyección se revestía uniformemente. Además, los componentes de la capa de recubrimiento en la superficie de la aguja de inyección hemostática fabricada en el Ejemplo 1 se analizaron por espectrometría de rayos X dispersiva de energía. Como resultado del análisis, se apreciaba que en la superficie de la aguja de inyección no recubierta, se detectaron elementos como el cromo, el hierro y similares, que son los materiales de la aguja de inyección, mientras que en la superficie de la aguja de inyección hemostática fabricada en el Ejemplo 1, se detectaron carbono, nitrógeno, oxígeno y similares, que son elementos principales contenidos en el quitosano funcionalizado con catecol (véase la Fig. 1 en el Ejemplo experimental 1).

60 Además, para analizar el espesor de la película de recubrimiento en la superficie de la aguja de inyección hemostática fabricada en cada uno de los Ejemplos 1 a 3, la película se separó y el espesor de la misma se midió

con un microscopio electrónico de barrido. Como resultado de la medición, se apreciaba que a medida que aumentaba el espesor de cada aguja de inyección hemostática, el espesor de la película de quitosano-catecol formado disminuía por la tensión superficial en la aguja de inyección hemostática. Específicamente, se encontró que los espesores de la película recubierta en la superficie de la aguja de inyección hemostática fabricada en los Ejemplos 1 a 3 eran de $25,2 \pm 2,8 \mu\text{m}$, $26,6 \pm 3,0 \mu\text{m}$ y $3,8 \pm 0,7 \mu\text{m}$, respectivamente (véase la Fig. 2 en el Ejemplo experimental 2).

Además, se realizó un experimento *ex vivo* para evaluar la capacidad hemostática de la aguja de inyección hemostática fabricada en el Ejemplo 1. Como resultado del experimento, se descubrió que en la aguja de inyección convencional, se producía una fuga de solución salina, mientras que en la aguja de inyección hemostática fabricada en el Ejemplo 3, la punción en el tejido subcutáneo se selló y se evitó la fuga de solución salina, debido a la conversión de la película de recubrimiento en la aguja de inyección en un hidrogel, que se produjo de 15 a 20 segundos después de la punción del tejido subcutáneo (véase la Fig. 3 en el Ejemplo experimental 3).

Además, se encontró que para verificar la conversión de la película en la superficie de la aguja de inyección hemostática al hidrógeno como se confirma en el Ejemplo experimental 3, se analizaron las propiedades de la solución de quitosano-catecol utilizada en la fabricación de la aguja de inyección hemostática por espectrometría UV-Vis (véase la Fig. 4 (A) en el Ejemplo experimental 4).

Además, para confirmar la conversión de la película de recubrimiento formada en la superficie de la aguja de inyección hemostática en un hidrogel como se puede ver en el Ejemplo experimental 3, se realizó el análisis por espectrometría de resonancia magnética nuclear de hidrógeno¹. Como resultado, se descubrió que se formaba un intermedio por oxidación parcial de catecol (véase la Fig. 4 (B) en el Ejemplo experimental 4).

Además, se descubrió que una película formada al secar 300 μl de la solución de quitosano-catecol utilizada en los Ejemplos se expuso a solución salina durante 15 a 20 segundos, y a continuación el material formado tenía la propiedad de hidrogel (véase la Fig. 4 (C) en el Ejemplo experimental 4).

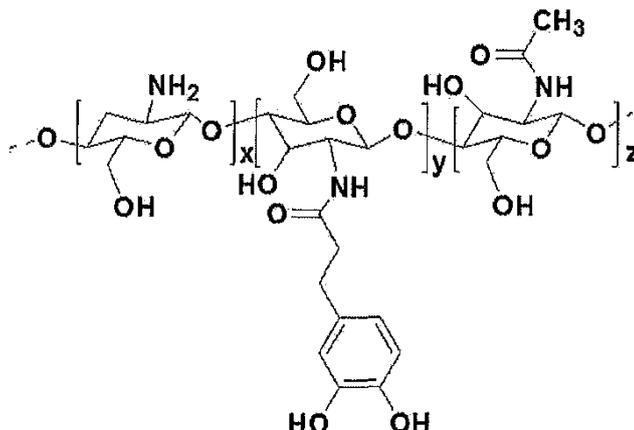
Además, se realizó un experimento *in vivo* para evaluar la capacidad hemostática de la aguja de inyección hemostática fabricada en el Ejemplo 1. Como resultado del experimento, se encontró que en la aguja de inyección hemostática fabricada en el Ejemplo 1, el recubrimiento formado a partir de la solución de quitosano-catecol se convertía en un hidrogel y se hinchaba, lo que indica que la aguja de inyección hemostática tiene un efecto hemostático significativamente mejor en comparación con una aguja de inyección convencional (véase la Fig. 5 (A) en el Ejemplo experimental 5).

Además, se encontró que una aguja de inyección convencional mostraba una cantidad de sangrado total de 31,3 μl en un total de tres experimentos ($n = 3$), mientras que la aguja de inyección hemostática fabricada en el Ejemplo 1 no provocaba ningún sangrado (véase la Fig. 5 (B) en el Ejemplo experimental 5). Además, se descubrió que la aguja de inyección convencional provocaba sangrado durante y después de la inyección en la vena de la oreja de conejo, mientras que la aguja de inyección hemostática fabricada en el Ejemplo 2 no provocaba ningún sangrado durante y después de la inyección (véase la Fig. 5 (C) en el Ejemplo experimental 5).

Por lo tanto, la aguja de inyección hemostática de acuerdo con la presente invención puede suprimir el sangrado durante y después de la inyección y, por lo tanto, puede usarse eficazmente para la inyección no solo en pacientes, incluidos pacientes diabéticos, pacientes bajo tratamiento anticancerígeno y pacientes con hemofilia, que tienen una capacidad hemostática baja, sino también en pacientes que muestran respuestas de rechazo de sangre, y niños.

A continuación, la presente invención se describirá con más detalle con referencia a ejemplos y ejemplos experimentales.

Será obvio para una persona con conocimientos en la técnica que estos ejemplos y ejemplos experimentales son solo para fines ilustrativos y no deben interpretarse para limitar el alcance de la presente invención.

Ejemplo de preparación 1: Preparación de quitosano introducido con catecol

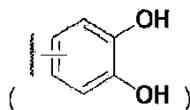
- 5 Se disolvieron 3 g de aproximadamente el 30 % de quitosano acetilado (quitosano 70/100, modelo: 24204, fabricado por Heppel Medical Chitosan) en 292 ml de solución de HCl (pH = 2) durante 6 horas. La solución de quitosano se ajustó a un pH de 5,5 añadiendo lentamente 8 ml de solución de NaOH 0,5 N a la misma. La solución preparada de quitosano al 1 % se estabilizó durante 12 horas.
- 10 A la solución de quitosano preparada, se le añadieron 2,37 g de ácido 3-(3,4-dihidroxifenil) propanoico. A continuación, como reactivo para formar un enlace amida (-CONH-) entre el grupo amina (-NH₂) del quitosano y el grupo carboxilo (-COOH) del ácido 3-(3,4-dihidroxifenil) propanoico, se disolvieron 2,02 g de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) en 50 ml de etanol y se añadió a la solución de quitosano. A continuación, la solución se ajustó a un pH de 4,5 y a continuación se dejó reaccionar durante 1 hora. En este proceso, se preparó un quitosano funcionalizado con catecol.

Para eliminar el ácido 3-(3,4-dihidroxifenil) propanoico sin reaccionar y la 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC), la solución después de la reacción se dializó en 4,5 l de agua triplemente destilada que contenía cloruro de sodio y 3 ml de HCl 5 N mediante el uso de una membrana de diálisis (límite de peso molecular: 12.000-15.000) durante 3 días. Además, la solución se dializó en 4,5 l de agua triplemente destilada que contenía 3 ml de HCl 5 N durante 2 días. Finalmente, la solución se dializó con agua triplemente destilada durante 6 horas, y a continuación se liofilizó, preparando así un quitosano funcionalizado con catecol (x:y:z = 6:1:3).

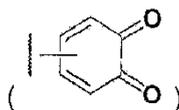
Ejemplo 1: Fabricación 1 de aguja de inyección hemostática (26G)

25 Se disolvieron 1,5 ml del quitosano funcionalizado con catecol preparado en el Ejemplo de preparación 1 en 100 µl de agua triplemente destilada, y a continuación se almacenó a 4 °C durante 3 días para inducir la oxidación parcial y la reticulación del grupo catecol. Como resultado, se preparó una solución de quitosano (en adelante denominada "solución de quitosano-catecol" en la que el grupo catecol

30



y el grupo catecol oxidado



35

se introdujeron y fueron parcialmente reticulados.

40 El grado de oxidación del grupo catecol en la solución de quitosano-catecol se determinó midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 500 nm mediante espectrometría UV-Vis. Cuando se forma una reticulación entre el grupo catecol oxidado y el grupo amina del quitosano, aparece la absorbancia a una longitud de onda de 500 nm. Por lo tanto, en función de la absorbancia que aparece, la solución de quitosano-catecol se trató con NaIO₄ (que es un agente oxidante que induce la oxidación de la solución de quitosano-catecol en el mayor grado posible) en una cantidad igual a tres veces los moles del grupo catecol, y se evaluó el grado de oxidación de la solución de quitosano-catecol. Como resultado, se demostró que el grado de oxidación de la solución de quitosano-catecol fue

45

del 4,5 al 5,5 %.

Mientras tanto, para un recubrimiento estable con la solución preparada de quitosano-catecol, se trató una aguja de inyección de 26G de espesor con plasma de oxígeno durante 10 minutos. A continuación, se pusieron 6,5 µl de la solución de quitosano-catecol y se revistieron sobre la aguja de inyección a temperatura ambiente y una velocidad de rotación de 40 rpm durante 1 hora, y se secaron durante 2 horas. Este procedimiento se repitió dos veces, fabricando así una aguja de inyección hemostática.

Ejemplo 2: Fabricación 1 de aguja de inyección hemostática (23G)

Se fabricó una aguja de inyección hemostática de la misma manera que se describe en el Ejemplo 1, excepto por que se usó una aguja de inyección de 23G de espesor en lugar de la aguja de inyección de 26G de espesor y que la solución de quitosano-catecol se usó en una cantidad de 9 µl en lugar de 6,5 µl.

Ejemplo 3: Fabricación 3 de aguja de inyección hemostática (18G)

Se fabricó una aguja de inyección hemostática de la misma manera que se describe en el Ejemplo 1, excepto por que se usó una aguja de inyección de 18G de espesor en lugar de la aguja de inyección de 26G de espesor y que la solución de quitosano-catecol se usó en una cantidad de 20 µl en lugar de 6,5 µl.

Ejemplo experimental 1: observación de la forma de las agujas de inyección hemostática

La aguja de inyección hemostática fabricada en el Ejemplo 1 se observó con un microscopio electrónico de barrido (Hitachi S-4800), y los resultados de la observación se muestran en la Fig. 1.

La Fig. 1 representa imágenes de los resultados de la microscopía electrónica de barrido realizada para analizar la forma y los componentes de una aguja de inyección hemostática fabricada en el Ejemplo 1.

Como se muestra en la Fig. 1, se mantuvo la forma de la aguja de inyección hemostática fabricada en el Ejemplo 1, y se recubrió uniformemente una solución de quitosano-catecol sobre la superficie de la aguja de inyección.

Además, los componentes de la capa de recubrimiento en la superficie de la aguja de inyección hemostática fabricada en el Ejemplo 1 se analizaron por espectrometría de rayos X dispersiva de energía. Usando un espectrómetro de rayos X dispersivo de energía conectado a un microscopio electrónico de barrido, se detectaron rayos X de fluorescencia al medir la capa de recubrimiento en la superficie de la aguja de inyección hemostática fabricada en el Ejemplo 1, y se analizaron los elementos detectados durante 120 segundos.

Como resultado, tal como se muestra en el gráfico en la parte inferior de la Fig. 1, en la superficie de la aguja de inyección no revestida, se detectaron elementos tales como cromo, hierro y similares, que son los materiales de la aguja de inyección, mientras que, en la superficie de la aguja de inyección hemostática fabricada en el Ejemplo 1, se detectaron carbono, nitrógeno, oxígeno y similares, que son elementos principales contenidos en el quitosano funcionalizado con catecol.

Por lo tanto, se demostró que la aguja de inyección hemostática según la presente invención se fabricó exactamente.

Ejemplo experimental 2: Análisis del espesor

Para analizar el espesor de la película de recubrimiento sobre la superficie de la aguja de inyección hemostática fabricada en cada uno de los Ejemplos 1 a 3, la película se separó y su espesor se midió con un microscopio electrónico de barrido (Hitachi S-4800). Los resultados de la medición se muestran en la Fig. 2.

La Fig. 2 es un gráfico que muestra el espesor de una película recubierta en cada una de las agujas de inyección hemostáticas fabricadas en los Ejemplos 1 a 3, y las imágenes en la parte inferior de la Fig. 2 muestra formas de película medidas por microscopía electrónica de barrido.

Como se muestra en la Fig. 2, a medida que aumentaba el espesor de cada aguja de inyección hemostática, el espesor de la película de quitosano-catecol formado se reducía por la tensión superficial en la aguja de inyección hemostática. Sin embargo, dado que la diferencia de espesor entre la aguja de inyección hemostática del Ejemplo 1 (26G) y la aguja de inyección hemostática del Ejemplo 2 (23G) no fue grande, no hubo una gran diferencia en el espesor de la película en la superficie entre el Ejemplo 1 y Ejemplo 2. Específicamente, los espesores de la película recubierta sobre la superficie de la aguja de inyección hemostática fabricada en los Ejemplos 1 a 3 fueron de $25,2 \pm 2,8 \mu\text{m}$, $26,6 \pm 3,0 \mu\text{m}$ y $3,8 \pm 0,7 \mu\text{m}$, respectivamente.

Ejemplo experimental 3: Evaluación ex vivo de la capacidad hemostática

Para evaluar la capacidad hemostática de la aguja de inyección hemostática fabricada en el Ejemplo 3, se realizó un experimento *ex vivo* como se muestra en la Fig. 3. Específicamente, un extremo de cada tubo de jeringa se bloqueó con el tejido subcutáneo de ratones atímicos (ratones atímicos BALBc, de 8 semanas de edad, macho, de 23 a 25 g), y cada tubo de jeringa se llenó con solución salina. A continuación, el tejido subcutáneo se punccionó con la aguja de inyección hemostática (18G) fabricada en el Ejemplo 3 o una aguja de inyección convencional, y se observó si la solución salina se filtraría o no a través de la punción.

La Fig. 3 muestra experimentos *ex vivo* realizados para confirmar el mecanismo hemostático de una aguja de inyección hemostática fabricada en el Ejemplo 1.

Como se muestra en la Fig. 3, en la aguja de inyección convencional, se produjo una fuga de solución salina, mientras que, en la aguja de inyección hemostática fabricada en el Ejemplo 3, la punción en el tejido subcutáneo se selló y se evitó la fuga de solución salina, debido a la conversión de la película de recubrimiento en la aguja de inyección en un hidrogel, que se produjo de 15 a 20 segundos después de la punción del tejido subcutáneo.

Ejemplo experimental 4: Análisis de las propiedades de la película para confirmar el mecanismo hemostático

Para verificar la conversión de la película sobre la superficie de la aguja de inyección hemostática al hidrogel como se confirma en el Ejemplo experimental 3, se analizaron las propiedades de la solución de quitosano-catecol utilizada en la fabricación de la aguja de inyección hemostática por espectrometría UV-Vis (HP8453, Hewlett Packard). Los resultados del análisis se muestran en la Fig. 4 (A).

La Fig. 4 (A) muestra los resultados de la espectrometría UV-Vis de una solución de quitosano-catecol (roja) utilizada para la fabricación de una aguja de inyección hemostática. El espectro azul corresponde a una solución de quitosano-catecol utilizada como control en la que no se indujo la oxidación parcial y la reticulación del catecol.

Como se muestra en la Fig. 4 (A), los resultados de medición de la espectrometría UV-Vis mostraron absorbancia a una longitud de onda de 500 nm, y por lo tanto el catecol en la solución de quitosano-catecol se oxidó parcialmente.

Además, el análisis se realizó mediante espectrometría de resonancia magnética nuclear de hidrógeno¹ (Bruker AV-300). Como resultado, como se muestra en la Fig. 4 (B), se formó un intermedio por oxidación parcial de catecol.

La Fig. 4 (B) muestra los resultados del análisis de resonancia magnética nuclear de hidrógeno¹ de una solución de quitosano-catecol (roja) utilizada para la fabricación de una aguja de inyección hemostática.

Además, una película formada al secar 300 μ l de la solución de quitosano-catecol se expuso a solución salina durante 15 a 20 segundos, y a continuación el material formado se analizó mediante un reómetro (Bohlin Advanced Rheometer, Malvern Instruments). Como resultado, como se muestra en la Fig. 4 (C), el material formado tenía la propiedad de hidrogel.

La Fig. 4 (C) es un gráfico que muestra las propiedades reológicas observadas al exponer películas, cada una formada por una solución de quitosano-catecol, a solución salina (parte superior: una solución de quitosano-catecol en la que no se indujo la oxidación parcial y la reticulación del catecol; parte inferior: una solución de quitosano-catecol utilizada en los Ejemplos 1 a 3).

Específicamente, se puso una película formada a partir de la solución de quitosano-catecol utilizada en los Ejemplos 1 a 3 en el soporte de muestra de un reómetro, y se analizó el grado de deformación del material en función del módulo de almacenamiento (G') y el módulo de pérdida (G'') mientras se aplicaba un esfuerzo cortante de 100 Pa a una frecuencia de 0,1-10 rad/seg mediante el uso de una placa paralela de 20 mm de espesor. El módulo de almacenamiento (G') y el módulo de pérdida (G'') se calcularon utilizando la siguiente ecuación 1:

Ecuación 1

$$\sigma = \gamma_0 [G'(\omega) \sin(\omega t) + G''(\omega) \cos(\omega t)]$$

en la que σ es un esfuerzo cortante aplicado al material;
 γ_0 es una amplitud máxima de un esfuerzo cortante que aparece por la deformación del material;
 G' es un módulo de almacenamiento;
 G'' es un módulo de pérdida;
 ω es una frecuencia; y
 t es un tiempo.

Como se muestra en la parte superior de la Fig. 4 (C), la película formada a partir de la solución de quitosano-catecol en la que no se introducen parcialmente la oxidación y la reticulación del catecol mostraba que el módulo de pérdida (G'') era mayor que el módulo de almacenamiento (G') en la mayoría de las regiones, lo que indica que no se

formó hidrogel.

Sin embargo, como se muestra en la parte inferior de la Fig. 4 (C), la película formada a partir de la solución de quitosano-catecol utilizada en los Ejemplos 1 a 3 mostraba un módulo de almacenamiento (G') mayor que el módulo de pérdida (G'') en toda la región, lo que indica que se formó hidrogel.

Ejemplo experimental 5: Evaluación *in vivo* de la capacidad hemostática

Para evaluar las capacidades hemostáticas de las agujas de inyección hemostáticas fabricadas en los Ejemplos 1 y 2, se realizó el siguiente experimento.

Primero, se prepararon modelos de la vena safena de ratón (ratones atómicos BALBc, macho, de 8 semanas, 23 a 25 g) y modelos de la vena de la oreja de conejo (conejos blancos de Nueva Zelanda, hembras de 12-14 semanas, 2,5 a 3,0 kg). A continuación, para garantizar un tiempo suficiente durante el cual la película recubierta sobre la superficie de la aguja de inyección hemostática fabricada en los Ejemplos 1 o 2 se convertiría en un hidrogel, la aguja de inyección se retiró a los 20 segundos después de la inyección. Los resultados se muestran en la Fig. 5.

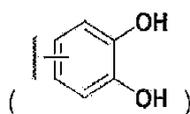
La Fig. 5 muestra resultados experimentales *in vivo* para una aguja de inyección hemostática fabricada en los Ejemplos 1 o 2. Específicamente, la Fig. 5 (A) muestra un efecto hemostático evaluado usando un modelo de la vena safena de ratón a través de una aguja de inyección fabricada en el Ejemplo 1; la Fig. 5 (B) es un gráfico que muestra la cantidad de sangrado observado usando un modelo de la vena safena de ratón; y la Fig. 5 (C) muestra un efecto hemostático evaluado usando un modelo de la vena de la oreja de conejo a través de una aguja de inyección fabricada en el Ejemplo 2.

Como se muestra en la Fig. 5 (A), en la aguja de inyección hemostática fabricada en el Ejemplo 1, el recubrimiento formado a partir de la solución de quitosano-catecol se convirtió en un hidrogel y se hinchó, lo que indica que la aguja de inyección hemostática tiene un efecto hemostático significativamente mejor en comparación con una aguja de inyección convencional.

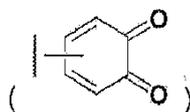
Además, como se muestra en la Fig. 5 (B), una aguja de inyección convencional mostraba una cantidad de sangrado total de 31,3 μ l, en un total de tres experimentos ($n = 3$), mientras que la aguja de inyección hemostática fabricada en el Ejemplo 1 no provocaba ningún sangrado.

Además, como se muestra en la Fig. 5 (C), la aguja de inyección convencional provocaba sangrado durante y después de la inyección en la vena de la oreja de conejo, mientras que la aguja de inyección hemostática fabricada en el Ejemplo 2 no provocaba ningún sangrado durante y después de la inyección.

Por lo tanto, la aguja de inyección hemostática recubierta con una solución de un quitosano en el que un grupo catecol



y un grupo catecol oxidado



se introducen y se reticulan parcialmente de acuerdo con la presente invención, pueden suprimir el sangrado durante y después de la inyección, y por lo tanto pueden usarse eficazmente para inyección no solo en pacientes, incluidos pacientes diabéticos, pacientes bajo tratamiento contra el cáncer y pacientes con hemofilia, que tienen una baja capacidad hemostática, sino también en pacientes que muestran respuestas de rechazo de sangre y niños.

Aplicabilidad industrial

La aguja de inyección hemostática de acuerdo con la presente invención puede suprimir el sangrado durante y después de la inyección y, por lo tanto, puede usarse eficazmente para inyección no solo en pacientes, incluidos pacientes diabéticos, pacientes bajo tratamiento contra el cáncer y pacientes con hemofilia, que tienen una baja capacidad hemostática, sino también en pacientes que muestran respuestas de rechazo de sangre y niños.

Aunque la presente invención se ha descrito en detalle con referencia a las características específicas, será evidente para los expertos en la materia que esta descripción es solo para una realización preferida y no limita el alcance de

la presente invención. Por lo tanto, el alcance sustancial de la presente invención estará definido por las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

5 1. Uso de hidrogel para recubrir una aguja de inyección que evita el sangrado durante la inyección, que comprende un quitosano en el que se introduce un grupo catecol y al menos una porción del grupo catecol está oxidada y reticulada.

10 2. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el grupo -OH del grupo catecol en el hidrogel se oxida parcialmente a un grupo =O, y a continuación se reticula mediante una reacción de deshidratación-condensación con un grupo -NH₂ contenido en el quitosano.

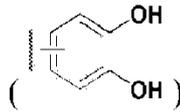
3. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que un grado de oxidación del grupo catecol es del 1 al 20 % (en base molar) del grupo catecol contenido en el hidrogel.

15 4. Una aguja de inyección hemostática que comprende el hidrogel para recubrir una aguja de inyección de la reivindicación 1 recubierta sobre una superficie de la misma.

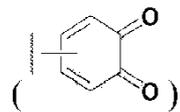
5. La aguja de inyección hemostática de la reivindicación 4, en la que el espesor del hidrogel recubierto en la aguja de inyección hemostática es de 2 a 30 µm.

20 6. Un método para preparar la aguja de inyección hemostática de la reivindicación 4, que comprende:

(1) preparar una solución de quitosano en la que un grupo catecol



y un grupo catecol al menos parcialmente oxidado



30 se introducen y se reticulan parcialmente; y

(2) recubrir una superficie de una aguja de inyección con la solución de la etapa (1).

35 7. El método de la reivindicación 6, en el que la etapa (2) comprende una etapa para poner la solución de quitosano en la cual el grupo catecol y el grupo catecol oxidado se introducen y se reticulan parcialmente en la aguja de inyección, y a continuación se recubre la superficie de la aguja de inyección mientras la aguja de inyección se gira a una velocidad predeterminada.

40 8. El método de la reivindicación 6, en el que el espesor del recubrimiento de la aguja de inyección se ajusta dependiendo de la cantidad de la solución de quitosano.

FIG. 1

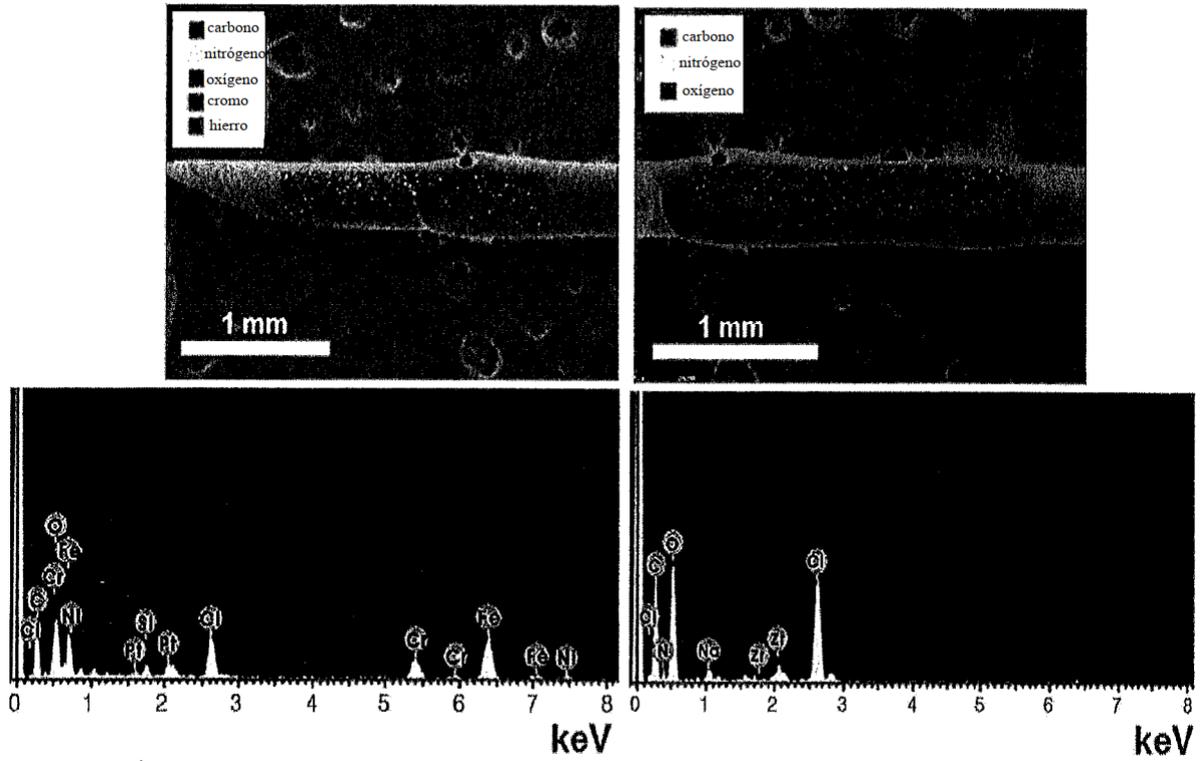


FIG. 2

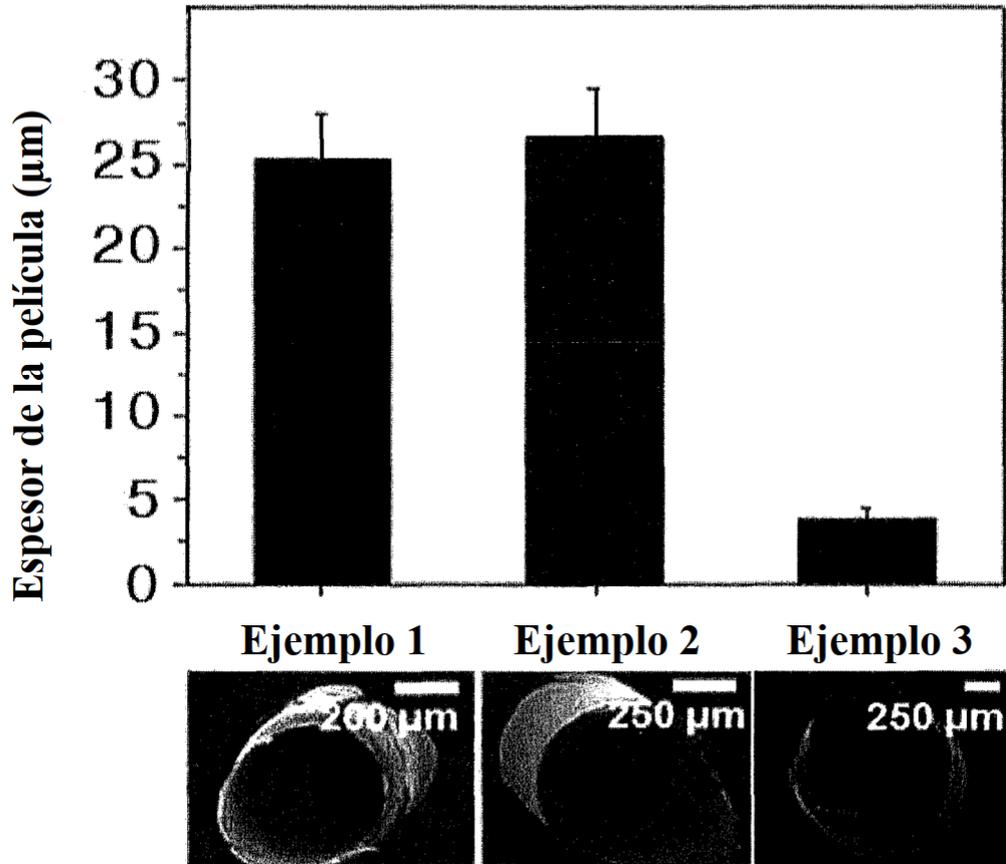


FIG. 3

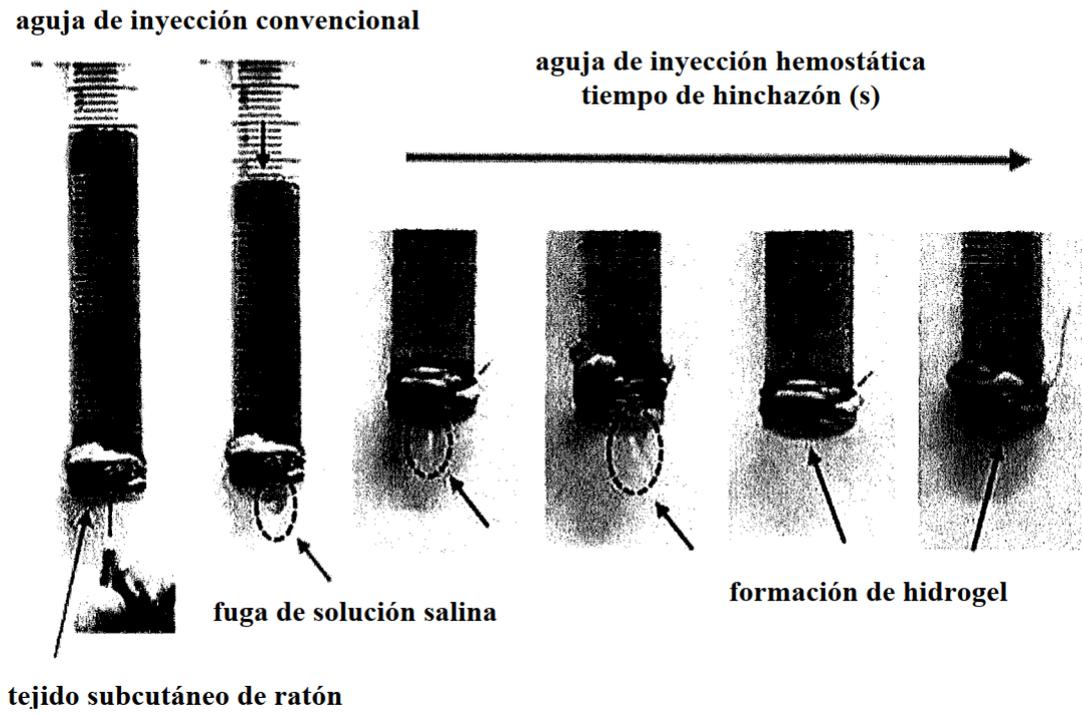


FIG. 4

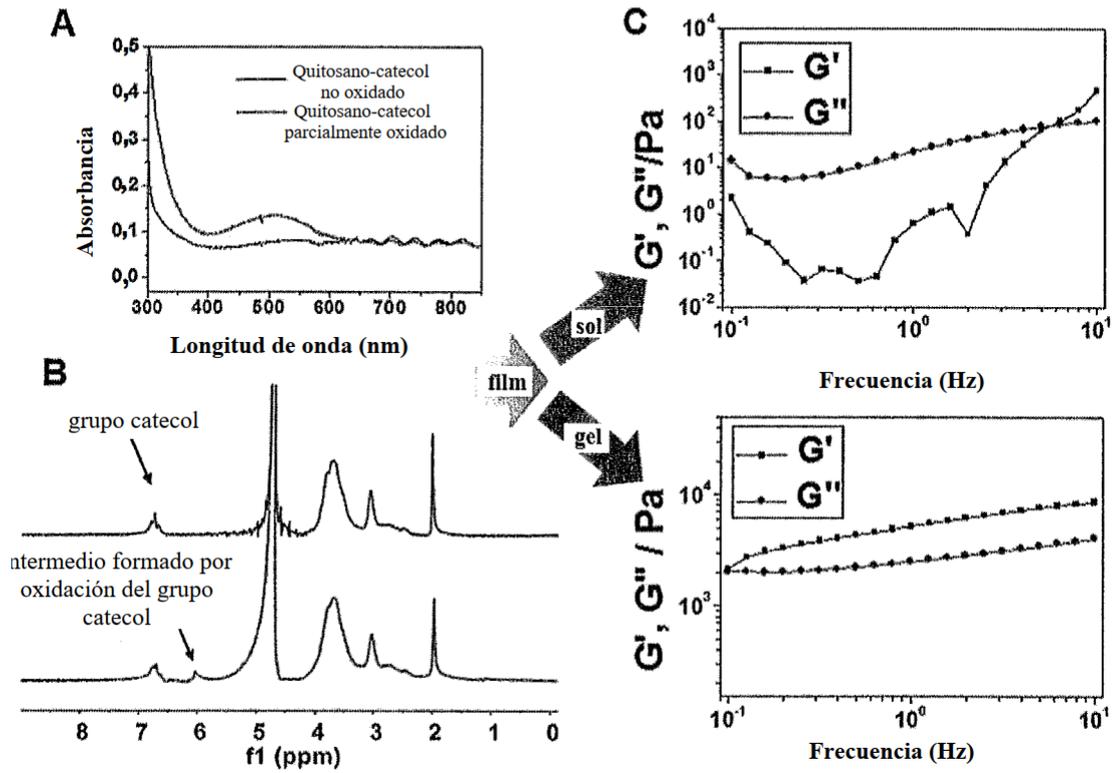


FIG. 5

