(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 877 528**

(51) Int. CI.:

C08J 3/02 (2006.01)
A61K 31/728 (2006.01)
C08B 37/08 (2006.01)
C08J 5/18 (2006.01)
C08L 5/08 (2006.01)
A61L 27/20 (2006.01)
A61L 27/54 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.03.2016 PCT/CZ2016/000027**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **15.09.2016 WO16141903**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.03.2016 E 16720697 (8)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.04.2021 EP 3268414**

(54) Título: **Película biodegradable autoportante a base de ácido hialurónico hidrofobizado, procedimiento de preparación y utilización de la misma**

(30) Prioridad:

09.03.2015 CZ 20150166

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.11.2021

(73) Titular/es:

CONTIPRO A.S. (100.0%)
Dolni Dobrouc 401
56102 Dolni Dobrouc, CZ

(72) Inventor/es:

DUSANKOVA, MARCELA;
HUERTA-ANGELES, GLORIA;
NESPOROVA, KRISTINA;
SLESINGROVA, KLARA;
MINARIK, ANTONIN;
CHMELAR, JOSEF;
SULAKOVA, ROMANA;
KAREL, SERGEJ y
VELEBNY, VLADIMIR

(74) Agente/Representante:

DURAN-CORRETJER, S.L.P

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

Película biodegradable autoportante a base de ácido hialurónico hidrofobizado, procedimiento de preparación y utilización de la misma

Sector de la técnica

La presente invención se refiere a una película biodegradable autoportante a base de ácido hialurónico hidrofobizado, a un procedimiento de preparación de la misma y a la utilización de la misma, especialmente en aplicaciones médicas gracias a su solubilidad controlada, biodegradabilidad, morfología superficial, propiedades mecánicas y otras.

Estado de la técnica anterior

El ácido hialurónico o una sal del mismo (HA) es un polisacárido lineal, que se compone de unidades repetitivas de disacárido formadas por ácido glucurónico, que está unido por un enlace β-1,3-glucosídico a N-acetil-glucosamina.

Es una sustancia que se encuentra de forma natural en el organismo, en el que forma parte de la matriz extracelular, actúa como lubricante en articulaciones, ojos y similares. También interactúa con los receptores celulares, por lo que es capaz de regular las células. Gracias a sus propiedades, el HA está predeterminado para su utilización en diversas aplicaciones médicas (Necas, Bartosikova et al. 2008). Dado que el HA se disuelve muy rápidamente en un entorno acuoso o en fluidos corporales, es necesario modificarlo para varias aplicaciones. Existen numerosos tipos de modificaciones, por ejemplo, la preparación de una forma soluble de HA derivatizada por tiramina, que tras la adición de agentes reticulantes forma una red de hidrogel insoluble (Calabro, Darr et al. 2004, Wolfova, Pravda et al. 2013). La solubilidad de la cadena de HA también puede reducirse uniendo grupos hidrófobos a la misma (Valle y Romeo 1987, Smejkalova, Huerta-Angeles et al. 2014, Ščudlová, Btět'ák et al. 2014). A continuación, dicho derivado es insoluble en medios acuosos y soluble principalmente en una mezcla de agua y un disolvente orgánico (dependiendo del grado de sustitución por la cadena hidrófoba, combinado con el peso molecular).

La Patente No. WO2014082609 (Smejkalova, Huerta-Angeles et al. 2014) se refiere a la preparación de ácido hialurónico hidrofobizado como portador de sustancias hidrófobas activas biológicamente. La hidrofobización del hialuronano se lleva a cabo mediante una reacción de esterificación de hialuronano con un ácido carboxílico de cadena larga, en la que la activación se lleva a cabo mediante ácido 2,4,6-triclorobenzoico (TCBA) u otro cloruro orgánico.

Una de las formas de aplicación interesantes del hialuronano hidrofobizado es la preparación de películas delgadas para utilización externa o interna. Se conocen películas que son aplicables en aplicaciones médicas, por ejemplo, Seprafilm se utilizó para la prevención de adhesiones en laparotomías repetidas. Seprafilm es una barrera contra la adhesión transparente compuesta por dos polisacáridos aniónicos, HA y carboximetilcelulosa, que fueron reticulados juntos por clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (EDC) (Altuntas, Kement et al. 2008, Beck 2008).

Sobre una base experimental, se prepararon varias películas que contenían HA, por ejemplo, Luo, Kirker et al. (2000). También algunos documentos de patente dan a conocer la preparación de una película hecha de hialuronano insoluble o reticulado, opcionalmente hialuronano en una mezcla con otro polímero (Becker, Dayton et al. 1996, Beck 2008). También se utilizó una capa de hialuronano en el documento de Patente No. CN202822230, en el que, sin embargo, no era una película autoportante y, además, solo se mencionó el hialuronano nativo. El hialuronano nativo junto con lecitina, que se añadió para mejorar la hidrofobicidad, se describió en el artículo (Bialopiotrowicz, Janczuk et al. 2006). Otra película, utilizada entre otras para la preparación de una barrera antiadhesiva, es una película hecha de un derivado epóxido de hialuronano, que se prepara por precipitación en un disolvente orgánico (Patente EP2644623).

Las películas según la Patente No. US20100092545 se preparan a partir de polímeros solubles o insolubles en agua, preferentemente a partir de óxido de polietileno, la utilización anticipada de las mismas es una alternativa a las formas farmacéuticas orales. Por esta razón, es muy importante que la distribución del fármaco sea homogénea (la variación entre las muestras hasta el 10 %) y que, durante la preparación, no se produzca agregación ni redistribución del fármaco. Esto se logra especialmente mediante la dosificación del polímero en una viscosidad alta (que se puede aumentar aún más mediante la adición de otras sustancias, tales como alginato, carragenina, goma guar y otras), y también se pueden añadir estabilizantes, que evitan la agregación y migración del fármaco. Además, una parte del disolvente debe eliminarse durante los primeros 10 minutos para que se forme una película viscoelástica a partir de la solución de polímero, en la que no puede proceder ninguna migración o agregación, según los autores. Esto se logra aplicando una temperatura elevada, que, sin embargo, en el caso de hialuronano y sus derivados no se puede utilizar ya que causaría la degradación de la película. En la Patente US20100092545, los autores no analizan el aspecto resultante de la película, que se ve afectado por la adhesión de la película al sustrato durante el secado y después del secado. La rugosidad de la superficie de la película tampoco es determinada ni resulta influida. Las propiedades de la película que podrían modularse de esta manera, tales como la capacidad de hinchamiento y la velocidad de degradación, no se dan a conocer en el documento. En cuanto a la aplicación

prevista, los autores prefieren que las películas se disuelvan en un entorno acuoso.

El documento de Patente No. JP06025306 da a conocer una síntesis de derivados de hialuronano acilado altamente sustituidos y la utilización de los mismos para la preparación de fibras y películas. La síntesis incluye la preparación de una suspensión del polisacárido en un ácido orgánico. Dado que es una suspensión, el polisacárido no se disuelve perfectamente en el sistema, provocando, de este modo, reacciones no homogéneas y pérdida de compatibilidad del polisacárido en el sistema. Los autores afirman que la reacción es catalizada por un superácido, en este caso por anhídrido de ácido trifluoroacético superelectrófilo, que reacciona vigorosamente con el agua. Por lo tanto, existe un alto riesgo en el caso de procesos industriales. Los residuos de ácido trifluoroacético, que se forma por hidrólisis de anhídrido cuando entra en contacto con la humedad del aire, pueden estar presentes en los productos y representan un peligro significativo cuando se utilizan los derivados en aplicaciones biomédicas (Maeda N. et al., 2014). Además, los disolventes clorados se utilizan en la síntesis del derivado, cuya utilización la FDA no recomienda en dispositivos médicos debido al alto riesgo de transferencia de sus residuos a las fibras y películas. El documento de patente menciona la preparación de fibras y películas solo en términos generales y no se ocupa de la determinación de las propiedades de las mismas.

Según otra Patente No. US20120088832, se da a conocer la preparación de una película porosa a base de hialuronano y alginato, en la que la película debe utilizarse en medicina, especialmente como preparación antiadhesiva. La película es una red interpenetrante reticulada de carácter poroso. En los ejemplos de dicho documento, no se menciona nada sobre el hinchamiento, la biodegradación, la solubilidad de la película y no se incluye la determinación de los disolventes residuales.

Para la preparación de películas, el documento de Patente No. EP0216453 utilizó hialuronano hidrofobizado con grupos carboxílicos esterificados de ácido glucurónico, que fueron, de este modo, bloqueados e inaccesibles para la unión al receptor CD44. Para la esterificación se utilizaron alcoholes aromáticos o de bajo peso molecular. El procedimiento para preparar una película autoportante incluye disolver un éster de HA en dimetilsulfóxido (DMSO), aplicarlo sobre un vidrio después de la disolución, el vidrio se sumerge en etanol que extrae DMSO (la película no es soluble en etanol) y después la película se despega del sustrato de vidrio, se lava con etanol, agua y nuevamente con etanol. La película resultante se seca durante 48 horas a 30 °C en un dispositivo de compresión.

El documento de Patente No. US20040192643 también menciona películas hechas de hialuronano hidrofobizado, preferentemente un derivado de benzoil HA. Nuevamente, se lleva a cabo la sustitución en carboxilo, donde para lograr la insolubilidad del hialuronano se bloquean del 80 al 100 % de todos los grupos carboxilo de HA. El procedimiento de preparación de la película corresponde al procedimiento ya mencionado dado a conocer en la Patente EP216453 anterior. Sin embargo, el secado tiene lugar a 63 °C durante 30 minutos al vacío.

Mediante la extracción de DMSO en otro disolvente, pueden formarse defectos superficiales incontrolables, que podrían ser inaceptables en algunas aplicaciones. Además, en caso de que sea necesario utilizar un disolvente de extracción, no se puede garantizar una baja concentración de disolventes residuales en el producto final. Además, no se mencionan las propiedades mecánicas, físicas o biológicas de las películas en los documentos de Patente No. EP0216453 y US20040192643 mencionados anteriormente.

El documento de Patente No. WO2010137374 da a conocer una membrana permeable de polímero autoportante que comprende un copolímero de bloques, en la que los componentes de polímero hidrófilo y polímero hidrófobo están unidos covalentemente, en la que el componente de polímero hidrófilo forma estructuras cilíndricas orientadas perpendicularmente y el componente de polímero hidrófobo es reticulable. Por lo tanto, la membrana está compuesta por un copolímero de bloques reticulado covalentemente. No se menciona el ácido hialurónico. En lo que respecta al proceso de preparación de dicha membrana, es necesaria la presencia de la denominada “capa de sacrificio”, que está presente sobre el sustrato. La solución del polímero de bloques se aplica sobre la “capa de sacrificio”, en la que después de que se evapora el disolvente, el componente polimérico hidrófobo del copolímero de bloques se fotorreticula y, a continuación, la “capa de sacrificio” debe eliminarse de la membrana resultante por medio de disolución, preferentemente en un disolvente en el que la propia membrana sea insoluble.

Como se mencionó anteriormente, los inconvenientes de las películas a base de ácido hialurónico conocidas hasta ahora incluyen especialmente su preparación complicada de múltiples etapas. No se pueden utilizar otros procesos conocidos de preparación de películas para el hialuronano y sus derivados. Los autores de algunas patentes o solicitudes de patente no mencionan ninguna posibilidad de afectar a la solubilidad, el hinchamiento y la biodegradabilidad de la película, lo cual es deseable en aplicaciones en dispositivos médicos. El aspecto de la película y las propiedades mecánicas de la misma pueden verse influidas por el contacto repetitivo con el disolvente en el caso del proceso según las Patentes EP0216453 o US20040192643 (el etanol, mediante el cual se extrae DMSO, es un agente de precipitación de hialuronano). Además, por ejemplo, se utiliza DMSO, que no puede eliminarse dentro de un límite de tiempo aceptable mediante secado. Otro inconveniente es la utilización de una gran cantidad de disolventes, lo que causa una mayor probabilidad de presencia de disolventes residuales en el producto. Algunos procesos utilizan, además de hialuronano, también otros polímeros para aumentar la insolubilidad del material final o para influir en las propiedades de la solución de polímero inicial.

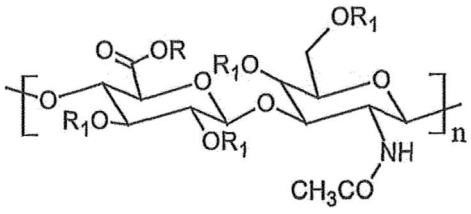
El documento de Patente No. WO 2010/105582 A1 da a conocer un procedimiento de modificación química de ácido hialurónico. En dicho documento, no hay intención de preparar películas autoportantes bien definidas para aplicaciones médicas o biotecnológicas. Se utilizó el término "película", pero solo para describir la forma del producto después de la síntesis: después de la evaporación del disolvente, el producto permanece como una capa sólida en el fondo de un matraz rotavapor.

El documento de Patente No. WO 2014/082611 A1 da a conocer la utilización de un derivado de hialuronano a base de ácido hialurónico acilado para la preparación de fibras y textiles mediante un procedimiento de hilado en húmedo. El derivado de hialuronano se disuelve en una mezcla de agua y 2-propanol y, a continuación, se introduce en un baño de coagulación, en el que se precipitan monofilamentos continuos (fibras). Los monofilamentos se procesan, a continuación (lavado, secado, opcionalmente alargamiento) a hilos y después a textiles, textiles tricotados o textiles no tejidos. Este complicado proceso de múltiples etapas no permite preparar una película polimérica en el sentido de la presente invención, es decir, una capa plana homogénea y compacta (no porosa) de polímero con propiedades bien definidas, tales como grosor o rugosidad superficial.

El documento de Patente No. US 2006/281912 A1 da a conocer la modificación de ácido hialurónico por grupos acilo y grupos de sal de cetiltrimetilamonio con la intención de romper la fuerte unión intermolecular de HA y obtener, de este modo, ésteres termoplásticos de HA. Estos ésteres deben permitir el procesamiento mediante moldeo, procesamiento en fusión o procesamiento a alta presión. Dentro de dicho documento, no hay ningún indicio sobre la preparación, caracterización y utilización de películas autoportantes.

Características de la invención

Los inconvenientes anteriores del estado de la técnica se superan mediante la película autoportante a base de éster de ácido hialurónico, según la presente invención, cuyo objeto consiste en que comprende un derivado de ácido hialurónico acilado de C_{10}-C_{22}, según la fórmula general (I)



(I)

en la que R es H^+ o Na^+, y en la que R^1 es H o -C(=O)C_xH_y, en la que x es un número entero dentro del intervalo de 9 a 21 e y es un número entero dentro del intervalo de 11 a 43, preferentemente de 19 a 43, y C_xH_y es una cadena de C_9-C_{21} saturada o insaturada, lineal o ramificada, en la que, como mínimo, en una unidad repetitiva uno o más R^1 es -C(=O)C_xH_y, y en la que n está dentro del intervalo de 12 a 4.000, preferentemente de 250 a 4.000, más preferentemente de 250 a 2.500, de la manera más preferente de 250 a 1.000, estando el grosor de la película dentro del intervalo de 2 a 100 μm.

Preferentemente, la película, según la presente invención, comprende palmitoil hialuronano, porque el ácido palmítico se degrada en el organismo por medio de la β-oxidación de ácidos grasos. Además, la película, según la presente invención, comprende, preferentemente, lauroil hialuronano.

La película, según la presente invención, comprende un derivado de hialuronano acilado de C_{10}-C_{22} (es decir, hialuronano hidrofobizado), en el que uno o más enlaces en acilos de C_{10}-C_{22} pueden estar insaturados y en el que el acilo de C_{10}-C_{22} está, preferentemente, unido únicamente en el alcohol primario en la posición 6 de N-acetilglucosamina. Por lo tanto, los grupos carboxílicos no se modifican, su retención es necesaria para las interacciones del hialuronano con el receptor CD44, que intermedia la interacción, adhesión y migración de las células y que también participa en la interacción de la célula con el hialuronano. Se comprobó que, cuanto mayor es el grado de sustitución del carboxilo hialurónico, peor es el proceso de interacción de las células con el hialuronano (Qiu, Li et al. 2014). Desde este punto de vista, es ventajoso no realizar la modificación del carboxilo y centrarse en otros sitios de reacción, que son grupos alcoholes primarios y/o secundarios, especialmente donde exista el requisito de grados de sustitución superiores, que son necesarios para la mayoría de las aplicaciones.

La película, según la presente invención, preparada a partir del derivado de ácido hialurónico acilado C_{10}-C_{22}, según la fórmula I anterior, no es citotóxica con respecto a las células, es biocompatible y biodegradable, incluso en el caso de utilizar un derivado altamente sustituido (incluyendo el grado de sustitución por el acilo del 100 %). Para aplicaciones en medicina, en las que existe el prerrequisito de que la película se someta a tensiones mecánicas (barreras antiadhesivas, ingeniería de tejidos, etc.), es más preferente utilizar una forma que sea insoluble en medios acuosos, es decir, una película, según la presente invención, en lugar de la forma reticulada covalentemente que a menudo es frágil al hincharse. La película, según la presente invención, forma una membrana elástica resistente tras la hidratación, que puede ser sometida a una tensión mecánica en un cierto grado (mediante

alargamiento, flexión, compresión).

Las películas no son citotóxicas con respecto a las células (pruebas *in vitro*).

Según una realización preferente de la presente invención, la película comprende derivados acilados de ácido hialurónico, que tienen un peso molecular de 1 x 10^5 a 1 x 10^6 g/mol, preferentemente de 1 x 10^5 a 5 x 10^5 g/mol, más preferentemente de 2 x 10^5 a 3 x 10^5 g/mol.

Según otra realización preferente de la presente invención, la película comprende derivados acilados de ácido hialurónico, que tienen el grado de sustitución dentro del intervalo del 15 al 160 %, preferentemente del 50 al 100 %, más preferentemente del 80 al 100 %.

El grado de sustitución del 100 % significa que cada grupo alcohólico primario (-C6) del dímero de hialuronano está sustituido por una cadena alifática. El grado de sustitución por encima del 100 % significa que además de cada grupo alcohólico primario (-C6) del dímero, también se sustituyen aleatoriamente algunos grupos alcohólicos secundarios (-C4 en N-acetilglucosamina o -C2 o -C3 en ácido glucurónico).

Sorprendentemente, se descubrió que la película, según la presente invención, es biodegradable incluso en el caso de utilizar un derivado con un alto grado de sustitución, que está entre el 80 y el 100 %, e incluso hasta el 160 %.

La película tiene un grosor dentro del intervalo de 2 a 100 μm, preferentemente dentro del intervalo de 5 a 25 μm.

Según otra realización preferente de la presente invención, el módulo de Young está dentro del intervalo de 1 a 5000 MPa en estado seco, preferentemente dentro del intervalo de 500 a 5000 MPa, más preferentemente de 1000 a 3000 MPa.

En el caso de películas secas no hidratadas, según la presente invención, el módulo de Young es independiente del grado de sustitución, el sustituyente y el peso molecular de HA. En estado hidratado, es muy difícil cuantificar el módulo de Young por razones técnicas, sin embargo, las pruebas visuales permiten evaluar que con la disminución del peso molecular la tenacidad de la película disminuye, la película se vuelve más frágil. Además, con un grado de sustitución creciente, el módulo de Young en estado hidratado aumenta.

Según otra realización preferente de la presente invención, la RMS (media cuadrática) de rugosidad superficial de, como mínimo, una de las superficies de la película está dentro del intervalo de 0,5 a 100 nm, preferentemente dentro del intervalo de 0,5 a 2 nm.

Según otra realización preferente de la presente invención, la película puede comprender sustancias biológicamente activas que se seleccionan entre el grupo que comprende sustancias activas farmacéutica y cosméticamente, preferentemente vitaminas, fármacos, preferentemente citostáticos, esteroides, otros fitoextractos, fitocomplejos o sustancias fitoactivas y similares.

Las características únicas de la película, según la presente invención, son: 1) la película está compuesta únicamente por hialuronano hidrofobizado, 2) no se utilizan polímeros sintéticos, 3) la película no comprende disolventes tóxicos, 4) los eventuales disolventes residuales no son tóxicos y están por debajo de los límites para utilización médica, 5) la capacidad de hinchamiento y la solubilidad de la película se pueden controlar modificando el grado de sustitución de hialuronano, 6) se puede controlar la velocidad de degradación de la película modificando el grado de sustitución de hialuronano, 7) la película no se deforma en la superficie y el grosor de la misma es homogéneo, 8) se puede controlar el aspecto superficial de la película, 9) se pueden controlar las propiedades mecánicas de la película, especialmente en su forma hidratada, 10) la rugosidad RMS de, como mínimo, una de las superficies de la película puede ser inferior a 2 nm, 11) se puede controlar el grosor de la película, 12) la película no es adherente para las células, 13) la película no comprende la denominada “superficie de piel”. La “superficie de piel” es una costra superficial debido a la cual la película se deformaría, retorcería y debajo de la cual se podrían formar burbujas. Se forma durante el secado de una solución de polímero en el aire cuando a menudo aparece una capa de polímero altamente concentrado cerca de la superficie. Esta capa posee propiedades reológicas significativamente diferentes con respecto al resto de la película. El secado de la película, según la presente invención, se produce de tal manera que la película no se abre a su entorno (se está secando en un espacio cerrado), y, en consecuencia, se está secando más lentamente y existe una mayor tensión de los vapores del disolvente por encima de la solución. Dicha disposición ayuda a prevenir la formación de la costra superficial. Sorprendentemente, se descubrió que incluso en el caso de que la humedad en el espacio cerrado durante el secado de la película fuera baja, no se formaba la costra superficial.

En las películas, según la presente invención, no se han encontrado residuos de agentes de hidrofobización que pudieran originarse en el sustrato sobre el que se prepara la película.

En comparación con los procesos de la técnica anterior, el procedimiento de preparación de la película, según la presente invención, es muy sencillo y consiste en disolver el hialuronano hidrofobizado (de cualquier peso molecular

dado a conocer y de cualquier grado de sustitución dado a conocer) en el respectivo disolvente, aplicar la respectiva cantidad del mismo sobre un sustrato definido, y evaporar el disolvente en una disposición en la que hay una mayor tensión de vapor del disolvente por encima de la solución que se está secando en un espacio cerrado. La evaporación del disolvente se lleva a cabo mediante evaporación libre del disolvente o calentando la superficie inferior de la película que descansa sobre el sustrato mientras se calienta o enfría la superficie superior de la película (secado en gradiente de temperatura y en un espacio cerrado). Por lo tanto, el procedimiento de preparación de la película, según la presente invención, es muy económico y sencillo. También es importante que la superficie de la película, según la presente invención, sea muy lisa (RMS hasta 2 nm) en el lado contiguo al sustrato (es decir, la superficie inferior de la película). El lado opuesto de la película (es decir, la superficie superior de la película) es más rugoso dependiendo de las condiciones de secado y del tipo del derivado.

Según otro aspecto, la presente invención se refiere, además, al procedimiento de preparación de la película, según la presente invención, que consiste en que se prepara una solución que comprende un derivado de ácido hialurónico acilado de C_{10}-C_{22}, según la fórmula general (I) anterior, en una mezcla de agua y alcohol de C_1-C_6, preferentemente etanol o propan-2-ol, que se agita, a continuación, se aplica sobre un sustrato y se seca en un espacio cerrado, después de lo cual se retira del sustrato.

Según otra realización preferente del procedimiento, según la presente invención, la cantidad del derivado de ácido hialurónico acilado de C_{10}-C_{22} en la solución está dentro del intervalo del 0,5 al 3 % en peso, el contenido del alcohol de C_1-C_6, preferentemente etanol o propan-2-ol, está dentro del intervalo del 25 al 55 % en volumen y el contenido de agua en la solución está dentro del intervalo del 45 al 75 % en volumen. La solución preparada tiene una viscosidad relativamente baja con lo que se evita la formación de burbujas al agitar y dosificar la solución.

Según otra realización preferente del procedimiento, según la presente invención, la solución se agita durante de 20 a 72 horas, preferentemente de 20 a 48 horas.

Según otra realización preferente del procedimiento, según la presente invención, el secado de la película se lleva a cabo en un espacio cerrado a la temperatura de 20 °C a 50 °C, preferentemente de 30 °C a 40 °C; durante de 3 a 6 horas, preferentemente de 4 a 5 horas.

Según otra realización preferente del procedimiento, según la presente invención, el secado de la película se lleva a cabo en un gradiente de temperatura, que se realiza calentando la superficie inferior de la película que descansa sobre el sustrato a una temperatura que es, como mínimo, 1 °C más alta que la temperatura a la que se calienta o enfría la superficie superior opuesta de la película. Preferentemente, la superficie inferior de la película que descansa sobre el sustrato se calienta a una temperatura dentro del intervalo de 20 °C a 60 °C y la superficie superior opuesta de la película se calienta o enfría a una temperatura dentro del intervalo de 10 °C a 59 °C. Más preferentemente, la superficie inferior de la película que descansa sobre el sustrato se calienta a la temperatura de 50 °C y la superficie superior opuesta de la película se enfría a la temperatura de 20 °C. Cuando se aplica el gradiente de temperatura, la película se seca en un espacio cerrado.

Según otra realización preferente del procedimiento, según la presente invención, la solución se seca en el gradiente de temperatura durante de 6 a 12 horas, preferentemente 6 horas.

La ventaja de la preparación de la película, según la presente invención, es el hecho de que la película es insoluble en medio acuoso y que está formada únicamente por el hialuronano acilado, según la fórmula general I definida anteriormente, sin necesidad de añadir agentes reticulantes ni de tratamiento adicional. La película, según la presente invención, también comprende una gran cantidad de materia seca, preferentemente más del 85 %.

La solución del derivado de hialuronano acilado utilizada para la preparación de películas, según la presente invención, puede modificarse, preferentemente, de diversas formas, las sustancias activas biológicamente pueden mezclarse en la solución, seleccionándose las sustancias activas biológicamente entre el grupo que comprende sustancias activas farmacéutica y cosméticamente, preferentemente vitaminas, fármacos, preferentemente citostáticos, esteroides, otros fitoextractos, fitocomplejos o sustancias fitoactivas y similares.

Según otra realización preferente del procedimiento, según la presente invención, el sustrato es un polímero seleccionado entre el grupo que comprende alcohol polivinílico, polipropileno, polietileno, polioximetileno o poliestireno. Además, el sustrato puede ser vidrio hidrofobizado. En una realización preferente, se utiliza vidrio hidrofobizado. El ángulo de contacto de humectación de la superficie del sustrato por agua desmineralizada está dentro del intervalo de 30° a 120°, preferentemente de 50° a 70°.

La ventaja del procedimiento dado a conocer anteriormente, según la presente invención, es, además de la sencillez del mismo, también la posibilidad de preparar una película que tenga una superficie muy lisa desde el lado del sustrato (es decir, con una superficie inferior muy lisa de la película) eligiendo un sustrato adecuado que sea muy liso en sí mismo.

La posibilidad de influir en la deformación y el aspecto general de la película parece ser muy útil, efectuándose la

influencia al afectar a la adhesión (interacción) de la solución de polímero, la película secante y la seca al sustrato sobre el que se aplica la solución y sobre el que tiene lugar el secado. Es preferente que la película de polímero esté completamente adherida al sustrato, no se despegue espontáneamente y, al mismo tiempo, que la película se pueda retirar del sustrato simplemente aplicando una fuerza mínima.

Una buena humectabilidad de la superficie del sustrato por la solución de polímero es la primera etapa de adhesión. La adhesión de la película secante y la seca, según la presente invención, al sustrato y, por tanto, el aspecto de la película pueden verse influidos por la selección de un sustrato que tenga diversas humectabilidades de la superficie, expresadas por el ángulo de contacto. Para cada tipo de derivado (diferente modificación, diferente peso molecular y diferente grado de sustitución), se puede utilizar, preferentemente, un sustrato que tenga un valor de humectabilidad totalmente específico. En el caso de películas bien adheridas, su superficie es plana después de despegarse, en el caso de películas menos adheridas o no adherentes, la superficie de las mismas está más o menos deformada o encogida. Preferentemente, se utiliza vidrio hidrofobizado como sustrato.

La película se prepara evaporando una mezcla de un disolvente orgánico (típicamente alcohol de C_1-C_6) con agua. La superficie de la película preparada de este modo tiene el aspecto superficial y la rugosidad RMS controlados por la selección de disolventes, derivados, condiciones de secado y el sustrato óptimos y puede prepararse como transparente. El grosor de la película es de 2 a 100 μm, preferentemente de 5 a 25 μm. Dado que la película se prepara sobre un sustrato cuya humectabilidad se puede modular, se puede influir en la adhesión de la película al sustrato y, por tanto, también en la morfología de la superficie de la película.

La preparación de la película se realiza de la siguiente manera: la solución de un derivado de hialuronano acilado que tiene una viscosidad relativamente baja, después de haber sido suficientemente agitada, se aplica sobre un sustrato adecuado y se seca. La baja viscosidad de la solución que se aplica sobre el sustrato evita la formación de burbujas al agitar y dosificar la solución. A continuación, la película se retira del sustrato. El tiempo de secado varía de 5 a 12 horas, dependiendo del volumen y la concentración de la solución y, además, de las temperaturas establecidas y del disolvente utilizado. La película comprende menos del 0,02 % del disolvente, por ejemplo, etanol o propan-2-ol, con lo que cumple de forma segura los requisitos sobre la cantidad de disolventes residuales para utilización médica. Dicho material puede utilizarse para la construcción de un dispositivo médico. La ventaja del procedimiento de preparación de una película de este tipo, según la presente invención, es que la película es insoluble en medios acuosos y está compuesta únicamente por el hialuronano modificado, sin necesidad de añadir agentes reticulantes ni de tratamiento adicional.

La película, según la presente invención, se puede utilizar, según la presente invención, por ejemplo, para la producción de barreras antiadhesivas y para otras aplicaciones en medicina humana y veterinaria. La degradación de la película en el cuerpo humano puede ser modulada por el peso molecular del derivado utilizado y por el grado de sustitución del hialuronano por el alquilo, y varía entre varias horas y varios meses. Los derivados de hialuronano acilado, así como las películas preparadas a partir de los mismos, son degradables *in vitro*.

La capacidad de hinchamiento de la película, o la solubilidad de la misma, también está controlada por el peso molecular del derivado utilizado y por el grado de sustitución de la cadena de hialuronano por el alquilo de C_{10}-C_{22}.

Es importante que, a diferencia de los derivados dados a conocer en los documentos de patente de la técnica anterior, la película, según la presente invención, comprenda únicamente el derivado de ácido hialurónico acilado de C_{10}-C_{22} que ha retenido todos sus grupos carboxílicos de ácido glucurónico, que son los grupos que son responsables de las propiedades biológicas del hialuronano.

Otro aspecto de la presente invención es influir en el aspecto superficial de la película mediante la influencia de la adhesión del polímero seco al sustrato sobre el que se prepara la película. El resultado de la misma puede ser una película muy plana sin arrugarse ni encogerse.

Según otra realización más, la película, según la presente invención, tal como se definió anteriormente, se utiliza en aplicaciones médicas, aplicaciones biotecnológicas o como soporte para el depósito de componentes activos. Preferentemente, se utiliza para la construcción de un dispositivo médico, tal como barreras antiadhesivas, ya que las células no se adhieren a las mismas. Además, las aplicaciones médicas preferentes en las que se puede utilizar la película, según la presente invención, incluyen, por ejemplo, aplicaciones médico-farmacéuticas, tales como el tratamiento de heridas crónicas y agudas o, por ejemplo, aplicaciones dentales.

Definiciones de los términos

El término “grado de sustitución” significa el número de acilos de C_{10}-C_{22} unidos a 100 dímeros de hialuronano. Por ejemplo, el grado de sustitución del 20 % significa que 20 de cada 100 dímeros de hialuronano están sustituidos por acilos de C_{10}-C_{22}. Durante la sustitución, el átomo de hidrógeno del grupo hidroxilo primario de N-acetilglucosamina o de los grupos OH secundarios de ácido glucurónico se sustituye por un acilo de C_{10}-C_{22}.

El término “película” significa una lámina fina de polímero autoportante, una estructura plana.

El término “área de la película” significa el área de la película calculada a partir de sus dimensiones (en m^2).

El término “dispositivo médico” significa una ayuda que se puede utilizar por sí misma o en combinación con cualquier accesorio para una utilización específica con fines médicos o de diagnóstico, tal como una barrera antiadhesiva.

El término “espacio cerrado” significa un espacio en el que el secado de la película se realiza a una temperatura determinada o en un gradiente de temperatura y que está cerrado sin el libre acceso del aire ambiente.

El término ”medio acondicionado” significa un medio acondicionado con THP-1 (línea celular de cáncer de monocitos humanos), que es un medio RPMI estándar (medio del Roswell Park Memorial Institute) enriquecido con suero fetal bovino al 10 % en el que las células THP-1 de la línea celular humana se cultivaron de forma continua durante 7 días. Las células THP-1 se utilizan como modelo de monocitos humanos y producen, además de varios factores de crecimiento y citocinas, también enzimas que provocan la degradación de los componentes de la matriz extracelular, especialmente metaloproteinasas de la matriz, hialuronidasas o esterasas. Antes de la utilización o la congelación, el medio se centrifugó y se filtró a través de un filtro de 0,22 μm para garantizar la pureza y esterilidad.

Descripción de dibujos:

Figura 1: efecto de la adhesión de la película (a, b) a base del derivado oleílico de hialuronato de sodio sobre el aspecto superficial de la misma (c)
Figura 2: efecto de la adhesión de la película a base del derivado palmitoílico de hialuronato de sodio sobre el aspecto superficial de la misma
Figura 3: comparación de las películas preparadas, según los ejemplos 2 (b) y 18 (a), después de 3 semanas de degradación en un medio acondicionado.
Figura 4: prueba de la presencia de oligosacáridos a base de HA en la solución de la película, según el ejemplo 5, (DS = 20 %) después de incubación en DMEM (medio Eagle modificado por Dulbecco) con adición de una enzima, mediante HPLC. La figura muestra 3 cromatogramas correspondientes a (i) separación de estándares de oligosacáridos de HA (estándar HA2 (t_R = 4,1 min), HA4 (t_R = 12 min), HA6 (t_R = 18,1 min), HA8 (t_R = 22,9 min)), (ii) una muestra en blanco - DMEM con adición de una enzima y (iii) solución en la que se llevó a cabo la incubación de la película.
Figura 5: morfología de la película preparada según el ejemplo 16 desde el lado del sustrato
Figura 6: viabilidad de la suspensión de células THP-1 después de 24 y 72 horas de incubación con la película preparada, según el ejemplo 1, a base del derivado palmitoílico de hialuronato de sodio
Figura 7: inducción de la muerte celular después de 24 horas de incubación con la película preparada, según el ejemplo 1, a base del derivado palmitoílico de hialuronato de sodio
Figura 8: inducción de la muerte celular después de 72 horas de incubación con la película preparada, según el ejemplo 1, a base del derivado palmitoílico de hialuronato de sodio
Figura 9: inhibición por contacto del crecimiento de fibroblastos de ratón 3T3 Swiss provocada por la película preparada, según el ejemplo 1.
Figura 10: propiedades antiadhesivas celulares de la película, A - la película preparada según el ejemplo 17, superficie superior de la película, B - la película preparada según el ejemplo 17, superficie inferior de la película, C - la película preparada según el ejemplo 2, superficie superior de la película, D - la película preparada según el ejemplo 2, superficie inferior de la película, CTRL - control

Ejemplos

Ejemplo 1. ***Preparación de la película a base de derivado palmitoílico de hialuronato de sodio***

Se disolvieron 100 mg de derivado palmitoílico de hialuronato de sodio que tenía el grado de sustitución del 100 % y un peso molecular de 2,8 x 10^5 g/mol en 20 ml de una solución al 55 % de propan-2-ol y se agitaron durante, como mínimo, 72 horas. Después de agitar, la solución se dosificó sobre un vidrio hidrofobizado que tenía la humectabilidad por agua desmineralizada de 61° (+/- 2°) y se secó en un espacio cerrado, en un gradiente de temperatura a la temperatura de la placa inferior de 50 °C y la temperatura de la placa superior de 40 °C durante 12 horas. Después de secar, la película se evaluó, se retiró del vidrio hidrofobizado y se caracterizó. Se determinó que el grosor de la película preparada de este modo era de aproximadamente 15 μm. Se determinó que la materia seca era aproximadamente el 92 %.

Ejemplo 2. ***Preparación de la película a base de derivado palmitoílico de hialuronato de sodio***

Se disolvieron 100 mg de derivado palmitoílico de hialuronato de sodio que tenía el grado de sustitución del 100 % y un peso molecular de 2,12 x 10^5 g/mol en 20 ml de una solución al 55 % de propan-2-ol y se agitaron durante, como mínimo, 48 horas. Después de agitar, la solución se dosificó sobre un vidrio hidrofobizado que tenía la humectabilidad por agua desmineralizada de 61° (+/- 2°) y se secó en un espacio cerrado, en un gradiente de temperatura a la temperatura de la placa inferior de 50 °C y la temperatura de la placa superior de 20 °C durante 6

horas. Después de secar, la película se evaluó, se retiró del vidrio hidrofobizado y se caracterizó. Se determinó que el grosor de la película preparada de este modo era de aproximadamente 15 µm.

Ejemplo 3. ***Preparación de la película a base de derivado palmitoílico de hialuronato de sodio***

Se disolvieron 100 mg de derivado palmitoílico de hialuronato de sodio que tenía el grado de sustitución del 55 % y un peso molecular de 6,0 x 10^5 g/mol en 20 ml de una solución al 50 % de etanol y se agitaron durante, como mínimo, 20 horas. Después de agitar, la solución se dosificó sobre un sustrato de polietileno que tenía la humectabilidad por agua desmineralizada de 79° (+/- 4°) y se secó en un espacio cerrado, en un gradiente de temperatura a la temperatura de la placa inferior de 30 °C y la temperatura de la placa superior de 29 °C durante 12 horas. Después de secar, la película se evaluó, se retiró del sustrato y se caracterizó. Se determinó que el grosor de la película preparada de este modo era de aproximadamente 15 µm.

Ejemplo 4. ***Preparación de la película a base de derivado palmitoílico de hialuronato de sodio***

Se disolvieron 50 mg de derivado palmitoílico de hialuronato de sodio que tenía el grado de sustitución del 31 % y un peso molecular de 9,9 x 10^5 g/mol en 20 ml de una solución al 45 % de etanol y se agitaron durante, como mínimo, 20 horas. Después de agitar, la solución se dosificó sobre un vidrio hidrofobizado que tenía la humectabilidad por agua desmineralizada de 61° (+/- 2°) y se secó en un espacio cerrado evaporando el disolvente a la temperatura de 30 °C durante 4 horas. Después de secar, la película se evaluó, se retiró del sustrato y se caracterizó. Se determinó que el grosor de la película preparada de este modo era de aproximadamente 8 µm.

Ejemplo 5. ***Preparación de la película a base de derivado palmitoílico de hialuronato de sodio***

Se disolvieron 100 mg de derivado palmitoílico de hialuronato de sodio que tenía el grado de sustitución del 20 % y un peso molecular de 2,4 x 10^5 g/mol en 20 ml de una solución al 25 % de etanol y se agitaron durante, como mínimo, 20 horas. Después de agitar, la solución se dosificó sobre un sustrato de poliestireno que tenía la humectabilidad por agua desmineralizada de 102° (+/- 4°) y se secó en un espacio cerrado, en un gradiente de temperatura a la temperatura de la placa inferior de 50 °C y la temperatura de la placa superior de 20 °C durante 12 horas. Después de secar, la película se evaluó, se retiró del sustrato y se caracterizó. Se determinó que el grosor de la película preparada de este modo era de aproximadamente 15 µm.

Ejemplo 6. ***Preparación de la película a base de derivado erucoílico de hialuronato de sodio***

Se disolvieron 100 mg de derivado erucoílico de hialuronato de sodio que tenía el grado de sustitución del 160 % y un peso molecular de 2,04 x 10^5 g/mol en 20 ml de una solución al 60 % de propan-2-ol y se agitaron durante, como mínimo, 20 horas. Después de agitar, la solución se dosificó sobre un sustrato de polipropileno que tenía la humectabilidad por agua desmineralizada de 105° (+/- 2°) y se secó en un espacio cerrado evaporando el disolvente a la temperatura de 50 °C durante 3 horas. Después de secar, la película se evaluó, se retiró del sustrato y se caracterizó. Se determinó que el grosor de la película preparada de este modo era de aproximadamente 15 µm.

Ejemplo 7. ***Preparación de la película a base de derivado lauroílico de hialuronato de sodio***

Se disolvieron 100 mg de derivado lauroílico de hialuronato de sodio que tenía el grado de sustitución del 64 % y un peso molecular de 3,2 x 10^5 g/mol en 20 ml de una solución al 50 % de propan-2-ol y se agitaron durante, como mínimo, 20 horas. Después de agitar, la solución se dosificó sobre vidrio hidrofobizado que tenía la humectabilidad por agua desmineralizada de 50° (+/- 3°) y se secó en un espacio cerrado, en un gradiente de temperatura a la temperatura de la placa inferior de 50 °C y la temperatura de la placa superior de 20 °C durante 6 horas. Después de secar, la película se evaluó, se retiró del sustrato y se caracterizó. Se determinó que el grosor de la película preparada de este modo era de aproximadamente 15 µm.

Ejemplo 8. ***Preparación de la película a base de derivado lauroílico de hialuronato de sodio***

Se disolvieron 100 mg de derivado lauroílico de hialuronato de sodio que tenía el grado de sustitución del 90 % y un peso molecular de 1,88 x 10^5 g/mol en 20 ml de una solución al 50 % de propan-2-ol y se agitaron durante, como mínimo, 20 horas. Después de agitar, la solución se dosificó sobre vidrio hidrofobizado que tenía la humectabilidad por agua desmineralizada de 61° (+/- 2°) y se secó en un espacio cerrado evaporando el disolvente a la temperatura de 20 °C durante 6 horas. Después de secar, la película se evaluó, se retiró del sustrato y se caracterizó. Se determinó que el grosor de la película preparada de este modo era de aproximadamente 15 µm.

Ejemplo 9. ***Preparación de la película a base de derivado oleílico de hialuronato de sodio***

Se disolvieron 100 mg de derivado oleílico de hialuronato de sodio que tenía el grado de sustitución del 20 % y un peso molecular de 2,8 x 10^5 g/mol en 20 ml de una solución al 50 % de propan-2-ol y se agitaron durante, como mínimo, 20 horas. Después de agitar, la solución se dosificó sobre un sustrato de cloruro de polivinilo que tenía la

humectabilidad por agua desmineralizada de 95° (+/- 5°) y se secó en un espacio cerrado, en un gradiente de temperatura a la temperatura de la placa inferior de 50 °C y la temperatura de la placa superior de 20 °C durante 6 horas. Después de secar, la película se evaluó, se retiró del sustrato y se caracterizó. Se determinó que el grosor de la película preparada de este modo era de aproximadamente 15 μm.

Ejemplo 10. ***Preparación de la película a base de derivado oleílico de hialuronato de sodio***

Se disolvieron 300 mg de derivado oleílico de hialuronato de sodio que tenía el grado de sustitución del 20 % y un peso molecular de 2,8 x 10^5 g/mol en 20 ml de una solución al 30 % de propan-2-ol y se agitaron durante, como mínimo, 20 horas. Después de agitar, la solución se dosificó sobre vidrio hidrofobizado que tenía la humectabilidad por agua desmineralizada de 57° (+/- 3°) y se secó en un espacio cerrado, en un gradiente de temperatura a la temperatura de la placa inferior de 50 °C y la temperatura de la placa superior de 20 °C durante 12 horas. Después de secar, la película se evaluó, se retiró del sustrato y se caracterizó. Se determinó que el grosor de la película preparada de este modo era de aproximadamente 40 μm.

Ejemplo 11. ***Preparación de la película a base de derivado oleílico de hialuronato de sodio***

Se disolvieron 300 mg de derivado oleílico de hialuronato de sodio que tenía el grado de sustitución del 20 % y un peso molecular de 2,8 x 10^5 g/mol en 20 ml de una solución al 30 % de propan-2-ol y se agitaron durante, como mínimo, 20 horas. Después de agitar, la solución se dosificó sobre vidrio hidrofobizado que tenía la humectabilidad por agua desmineralizada de 107° (+/- 1°) y se secó en un espacio cerrado, en un gradiente de temperatura a la temperatura de la placa inferior de 50 °C y la temperatura de la placa superior de 20 °C durante 12 horas. Después de secar, la película se evaluó, se retiró del sustrato y se caracterizó. Se determinó que el grosor de la película preparada de este modo era de aproximadamente 40 μm.

Ejemplo 12. ***Preparación de la película a base de derivado caprinílico (C10) de hialuronato de sodio***

Se disolvieron 100 mg de derivado caprinílico (C10) de hialuronato de sodio que tenía el grado de sustitución del 87 % y un peso molecular de 2,50 x 10^5 g/mol en 20 ml de etanol al 50 % y se agitaron durante, como mínimo, 20 horas. Después de agitar, la solución se dosificó sobre vidrio hidrofobizado que tenía la humectabilidad por agua desmineralizada de 61° (+/- 2°) y se secó en un espacio cerrado, en un gradiente de temperatura a la temperatura de la placa inferior de 60 °C y la temperatura de la placa superior de 40 °C durante 10 horas. Después de secar, la película se evaluó, se retiró del sustrato y se caracterizó. Se determinó que el grosor de la película preparada de este modo era de aproximadamente 15 μm, se determinó que la materia seca era de aproximadamente el 92 %. Se determinó que la capacidad de hinchamiento de la película era superior al 100 % (se midió la variación del área de la película) en estado de equilibrio.

Ejemplo 13. ***Preparación de la película a base de derivado behenoílico de hialuronato de sodio***

Se disolvieron 100 mg de derivado behenoílico de hialuronato de sodio que tenía el grado de sustitución del 16 % y un peso molecular de 3,3 x 10^5 g/mol en 20 ml de una solución al 50 % de propan-2-ol y se agitaron durante, como mínimo, 20 horas. Después de agitar, la solución se dosificó sobre un sustrato de polipropileno que tenía la humectabilidad por agua desmineralizada de 105° (+/- 2°) y se secó en un espacio cerrado, en un gradiente de temperatura a la temperatura de la placa inferior de 50 °C y la temperatura de la placa superior de 20 °C durante 6 horas. Después de secar, la película se evaluó, se retiró del sustrato y se caracterizó. Se determinó que el grosor de la película preparada de este modo era de aproximadamente 15 μm.

Ejemplo 14. ***Preparación de la película a base de derivado lauroílico de hialuronato de sodio***

Se disolvieron 100 mg de derivado lauroílico de hialuronato de sodio que tenía el grado de sustitución del 29 % y un peso molecular de 1,88 x 10^5 g/mol en 20 ml de una solución al 50 % de propan-2-ol y se agitaron durante, como mínimo, 20 horas. Después de agitar, la solución se dosificó sobre vidrio hidrofobizado que tenía la humectabilidad por agua desmineralizada de 61° (+/- 2°) y se secó en un espacio cerrado, en un gradiente de temperatura a la temperatura de la placa inferior de 50 °C y la temperatura de la placa superior de 20 °C durante 7 horas. Después de secar, la película se evaluó, se retiró del sustrato y se caracterizó. Se determinó que el grosor de la película preparada de este modo era de aproximadamente 15 μm.

Ejemplo 15. ***Preparación de la película a base de derivado oleílico de hialuronato de sodio***

Se disolvieron 100 mg de derivado oleílico de hialuronato sódico que tenía el grado de sustitución del 15 % y un peso molecular de 2,8 x 10^5 g/mol en 20 ml de una solución al 50 % de propan-2-ol y se agitaron durante, como mínimo, 48 horas. Después de agitar, la solución se dosificó sobre vidrio hidrofobizado que tenía la humectabilidad por agua desmineralizada de 61° (+/- 2°) y se secó en un espacio cerrado, en un gradiente de temperatura a la temperatura de la placa inferior de 50 °C y la temperatura de la placa superior de 20 °C durante 12 horas. Después de secar, la película se evaluó, se retiró del sustrato y se caracterizó. Se determinó que el grosor de la película

preparada de este modo era de aproximadamente 15 µm.

Ejemplo 16. ***Preparación de la película a base de derivado palmitoílico de hialuronato de sodio***

Se disolvieron 100 mg de derivado palmitoílico de hialuronato de sodio que tenía el grado de sustitución del 34 % y un peso molecular de 2,67 x 10^5 g/mol en 20 ml de una solución al 50 % de etanol y se agitaron durante, como mínimo, 48 horas. Después de agitar, la solución se dosificó sobre vidrio hidrofobizado que tenía la humectabilidad por agua desmineralizada de 61° (+/- 2°) y se secó en un espacio cerrado, en un gradiente de temperatura a la temperatura de la placa inferior de 50 °C y la temperatura de la placa superior de 20 °C durante 12 horas. Después de secar, la película se evaluó, se retiró del sustrato y se caracterizó. Se determinó que el grosor de la película preparada de este modo era de aproximadamente 15 µm.

Ejemplo 17. ***Preparación de la película a base de derivado palmitoílico de hialuronato de sodio***

Se disolvieron 100 mg de derivado palmitoílico de hialuronato de sodio que tenía el grado de sustitución del 60 % y un peso molecular de 2,8 x 10^5 g/mol en 20 ml de una solución al 50 % de etanol y se agitaron durante, como mínimo, 48 horas. Después de agitar, la solución se dosificó sobre vidrio hidrofobizado que tenía la humectabilidad por agua desmineralizada de 61° (+/- 2°) y se secó en un espacio cerrado, en un gradiente de temperatura a la temperatura de la placa inferior de 50 °C y la temperatura de la placa superior de 20 °C durante 12 horas. Después de secar, la película se evaluó, se retiró del sustrato y se caracterizó. Se determinó que el grosor de la película preparada de este modo era de aproximadamente 15 µm.

Ejemplo 18. ***Preparación de la película a base de derivado palmitoílico de hialuronato de sodio***

Se disolvieron 100 mg de derivado palmitoílico de hialuronato de sodio que tenía el grado de sustitución del 31 % y un peso molecular de 2,7 x 10^5 g/mol en 20 ml de una solución al 50 % de propan-2-ol y se agitaron durante, como mínimo, 20 horas. Después de agitar, la solución se dosificó sobre vidrio hidrofobizado que tenía la humectabilidad por agua desmineralizada de 61° (+/- 2°) y se secó en un espacio cerrado, en un gradiente de temperatura a la temperatura de la placa inferior de 50 °C y la temperatura de la placa superior de 20 °C durante 12 horas. Después de secar, la película se evaluó, se retiró del sustrato y se caracterizó. Se determinó que el grosor de la película preparada de este modo era de aproximadamente 15 µm.

Ejemplo 19. ***Preparación de la película a base de derivado lauroílico de hialuronato de sodio***

Se disolvieron 100 mg de derivado lauroílico de hialuronato de sodio que tenía el grado de sustitución del 58 % y un peso molecular de 1,88 x 10^5 g/mol en 20 ml de una solución al 50 % de propan-2-ol y se agitaron durante, como mínimo, 48 horas. Después de agitar, la solución se dosificó sobre vidrio hidrofobizado que tenía la humectabilidad por agua desmineralizada de 61° (+/- 2°) y se secó en un espacio cerrado, en un gradiente de temperatura a la temperatura de la placa inferior de 20 °C y la temperatura de la placa superior de 10 °C durante 12 horas. Después de secar, la película se evaluó, se retiró del sustrato y se caracterizó. Se determinó que el grosor de la película preparada de este modo era de aproximadamente 15 µm.

Ejemplo 20. ***Comparación de humectabilidades del sustrato obtenidas utilizando diversos agentes de hidrofobización***

El vidrio destinado a la hidrofobización se limpió primero a fondo para que la humectabilidad con agua desmineralizada resultante no fuera superior a 10°. A continuación, se realizó la hidrofobización del vidrio. Para la hidrofobización del vidrio se utilizaron los siguientes agentes de hidrofobización: clorotrimetilsilano (CTMS), (3-aminopropil)trimetoxisilano (APTMS) y octadeciltriclorosilano (OTS). Los valores resultantes de la humectabilidad del vidrio (siendo la concentración del agente del 1 %) se enumeran en la tabla 1. Además, para CTMS, se probaron diversas concentraciones del agente en hexano. Los valores obtenidos de las humectabilidades de vidrio medidas se enumeran en la tabla 2.

Tabla 1: humectabilidad del vidrio expresada por el ángulo de contacto tras la hidrofobización por un agente que tiene la concentración del 1 %

Agente (1 %)	Disolvente	CA
CTMS	hexano	aprox. 70°
APTMS	hexano	aprox. 90°
	acetona	aprox. 70°
	diclorometano	aprox. 90°
OTS	etanol (96 %)	aprox. 66°
	tolueno	aprox. 105°
	propan-2-ol	aprox. 103°
CA significa ángulo de contacto		

Tabla 2: humectabilidad del vidrio expresada por el ángulo de contacto tras la hidrofobización por diversas concentraciones de CTMS en hexano

Concentración de CTMS	CA
0,10 %	aprox. 50°
0,50 %	aprox. 60°
1 %	aprox. 70°
3-5 %	<80°
CA significa ángulo de contacto	

Ejemplo 21. ***Determinación de los residuos de agente de hidrofobización en la película preparada según el ejemplo 1***

El trimetilsilanol se analizó como un residuo de cloruro de trimetilsililo después de su reacción con los grupos -OH del derivado de hialuronano. El análisis se llevó a cabo en un cromatógrafo de gases equipado con un muestreador de espacio libre superior y un detector de espectrometría de masas en forma de cuadrupolo simple. Una muestra de la película preparada, según el ejemplo 1, se disolvió a la concentración de 6 mg/ml en propan-2-ol al 50 % (vol./vol.) y tras la disolución, se pipetearon en un vial 4,75 ml de la muestra y 0,25 ml de n-butanol (1 mg/ml), que actuó como estándar interno. También se preparó una solución madre de cloruro de trimetilsililo (1 mg/ml) en propan-2-ol al 50 %, que se hizo reaccionar inmediatamente con trimetilsilanol. A partir de esta solución, se preparó una serie de calibración que variaba de 0,5 a 15,0 µg/ml, con la adición de n-butanol como estándar interno. Ninguna muestra de película analizada demostró la presencia de trimetilsilanol en una concentración superior al primer punto de calibración, es decir, el contenido de trimetilsilanol en las muestras de película fue inferior al 0,008 % en peso.

Ejemplo 22. ***Efecto de la adhesión de la película a base de un derivado oleílico de hialuronato de sodio sobre el aspecto superficial de la misma***

Las películas preparadas, según los ejemplos 10 y 11, se prepararon sobre dos vidrios que tenían diferentes humectaciones, a saber 57° (+/- 3°) y 107° (+/- 1°). Después de secar, se evaluó el aspecto superficial de la película y se correlacionó con la adhesión. En el caso de una buena adhesión de la película al sustrato, la superficie de la película es plana, sin deformaciones superficiales. La película se adhirió completamente al sustrato que tenía un ángulo de contacto más bajo, sobre el sustrato que tenía un ángulo de contacto más alto se desprendió y deformó parcialmente. Los resultados se documentan en las figuras 1a, 1b, 1c. Las cifras implican que, si la película se adhiere completamente a la superficie, es uniforme y sin deformaciones superficiales después de ser despegada (figura 1c, derecha). Por el contrario, en el caso de una adhesión imperfecta, la película se deforma más o menos (figura 1c, izquierda).

Ejemplo 23. ***Efecto de la adhesión de la película a base de un derivado palmitoílico de hialuronato de sodio sobre el aspecto superficial de la misma***

Se evaluó la película basada en el derivado palmitoílico de hialuronato de sodio preparada, según el ejemplo 2, sobre un vidrio que tenía la humectabilidad de 61° (+/- 2°). Después de secar, se evaluaron la adhesión y el aspecto de la película. La película estaba bien adherida y su superficie era absolutamente plana, sin deformaciones. El resultado de la adhesión se documenta en la figura 2.

Ejemplo 24. ***Determinación del propan-2-ol residual en las películas***

La concentración residual del disolvente orgánico propan-2-ol se determinó mediante cromatografía de gases en las películas preparadas, según los ejemplos 1, 8 y 12. El principio de la determinación del disolvente es la conversión del mismo a la fase gaseosa a una temperatura elevada, la separación del mismo en el cromatógrafo de gases y la posterior detección por el detector de ionización de llama. La concentración de propan-2-ol en la película siempre se determinó dos veces (es decir, para dos muestras), mediante lectura a partir de la curva de calibración. El peso de la muestra fue siempre de 50 mg. Después de completar el análisis, se determinó que la concentración del propan-2-ol residual en todas las películas era menor que el punto más bajo de la curva de calibración y se expresó como <0,02 % en peso. Este valor cumple con seguridad los requisitos sobre las cantidades de disolventes residuales de clase 3, según la farmacopea de la UE.

Ejemplo 25. ***Determinación del peso - homogeneidad dentro del área***

La película preparada, según el ejemplo 1, se cortó en 55 cuadrados con un área de 1 cm^2. Antes de la medición, las muestras individuales se dejaron a temperatura y humedad ambiente durante 5 horas. A continuación, los cuadrados individuales se pesaron en balanza analítica. Los pesos obtenidos de los cuadrados individuales se enumeran en la tabla 3. El promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación se calcularon basándose en todos los valores enumerados en la tabla. Los valores calculados: promedio 2,35 mg, desviación estándar 0,18 mg, coeficiente de variación 7,51 %.

Tabla 3: determinación de la homogeneidad de pesos de la película

2,6	2,3	2,4	2,6	2,4	2,2	2,1	2,6	2,1	2,1	2,5
2,5	2,3	2,7	2,6	2,5	2,6	2,0	2,6	2,1	2,5	2,4
2,5	2,2	2,3	2,4	2,3	2,2	2,3	2,6	2,2	2,2	2,3
2,3	2,4	2,2	2,2	2,5	2,7	2,5	2,3	2,3	2,5	2,3
2,1	2,1	2,1	2,3	2,3	2,3	2,4	2,2	2,2	2,3	2,4

Ejemplo 26. ***Determinación del grosor - homogeneidad dentro del área***

Se trazó una cuadrícula con el área de un cuadrado de 1 cm^2 y el número total de cuadrados 35 en la película preparada, según el ejemplo 15. En cada cuadrado, se midió el grosor de la película mediante un medidor de grosor mecánico Mytutoyo VL-50. La medición se llevó a cabo en un ambiente estable que tenía la humedad del 50 % y la temperatura de 25 °C. Los valores medidos se enumeran en la tabla 4. El promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación se calcularon basándose en todos los valores enumerados en la tabla. Los valores calculados: promedio 14,6 µm, desviación estándar 1,17 µm, coeficiente de variación 8,02 %.

Tabla 4: determinación de la homogeneidad del grosor, los valores indicados están en µm

16,2	16,7	16,2	15,2	13,8	13,8	14,7
13,9	13,9	13,9	13,7	13,4	13,2	14,3
14,8	13,9	14,1	13,3	12,8	13,5	14,6
16,9	16,2	16,6	15,7	15,6	15,0	16,2
14,7	14,9	15,0	14,7	13,7	12,5	13,8

Ejemplo 27. ***Comparación de las capacidades de hinchamiento de las películas preparadas a partir de derivados palmitoílicos de hialuronato de sodio que tienen diversos grados de sustitución en tampón fosfato 0,1 M, pH 7,4***

Se cortaron películas preparadas, según los ejemplos 2, 16 y 17, en cuadrados definidos con precisión, se pesaron, se midieron y se insertaron en tampón fosfato 0,1 M (PBS), pH 7,4. A 37 °C, se controló la capacidad de hinchamiento de las películas; cada experimento se realizó por triplicado. Se evaluaron los cambios en el peso y las dimensiones de la película; los resultados se enumeran en la tabla 5. Es evidente a partir de esta tabla que cuanto menor es el grado de sustitución, mayor es la capacidad de hinchamiento de la película. En caso de utilizar grados de sustitución altos, únicamente se puede lograr un pequeño cambio en el área de la película, lo que puede ser muy importante en varias aplicaciones.

Tabla 5: capacidad de hinchamiento de las películas preparadas a partir de derivados palmitoílicos con diversos grados de sustitución

	cambio de área después de 5 días en PBS 0,1 M, pH 7,4 (%)	**cambio de peso después de 5 días en PBS 0,1 M, pH 7,4 (%)**
Película preparada según el ejemplo 16	69	1365
Película preparada según el ejemplo 17	32	749
Película preparada según el ejemplo 2	15	496

Ejemplo 28. ***Degradación de las películas preparadas a partir de derivado palmitoílico de hialuronato de sodio en medio acondicionado - comparación de dos grados de sustitución***

Se cortaron películas preparadas, según los ejemplos 2 y 18, en cuadrados definidos con precisión, se pesaron, se midieron y se insertaron en un medio acondicionado. Toda la preparación se llevó a cabo en una caja laminar de modo que no se produjera contaminación y reacciones indeseables del medio. A 37 °C, se comprobó el cambio de área de la película y el aspecto visual de la misma en intervalos predeterminados, propiedades que pueden estar asociadas con la degradación. El medio acondicionado se cambió a intervalos regulares; el experimento se realizó por triplicado. La película preparada, según el ejemplo 2, comenzó a degradarse significativamente más tarde que la película preparada, según el ejemplo 18. Los resultados se muestran en las figuras 3a y 3b, en las que se muestra el aspecto de la película después de 3 semanas de degradación en el medio acondicionado. La tabla 6 documenta el cambio del área de la película después de 1 semana de degradación para la película, según el ejemplo 2, así como el ejemplo 18, y después de tres semanas para la película, según el ejemplo 2, (la película, según el ejemplo 18, se degradó a trozos o incluso se disolvió después de tres semanas de degradación). Basándose en los resultados, es obvio que la velocidad de degradación depende significativamente del grado de sustitución del hialuronato de sodio por la cadena de acilo. En el caso de una película altamente sustituida preparada, según el ejemplo 2, la degradación se desarrolló en términos de varios meses.

Tabla 6: cambio del área de la película después de 1 semana en un medio acondicionado - comparación de dos grados de sustitución

	cambio del área de la película después de 1 semana en el medio acondicionado (%)
Película preparada según el ejemplo 2	13
Película preparada según el ejemplo 18	125

Ejemplo 29. ***Degradación de la película basada en un derivado palmitoílico de hialuronato de sodio***

Se incubaron muestras de la película preparada, según el ejemplo 5, en un medio estándar para cultivos celulares (medio Eagle modificado por Dulbecco) con la adición de 300 UI de una enzima por 1 mg de película. La incubación se llevó a cabo a 37 °C y las muestras se analizaron después de 24 horas. El análisis de la muestra se llevó a cabo en el sistema de HPLC Alliance (Waters), según un procedimiento operativo estándar interno. Después de 24 horas, aún era posible observar trozos de película no degradados. A pesar de eso, se detectaron oligosacáridos basados en hialuronano en la solución, como se muestra en la figura 4.

Ejemplo 30. ***Degradación de la película basada en un derivado palmitoílico de hialuronato de sodio***

Se incubaron muestras de la película preparada, según el ejemplo 2, en un medio estándar para cultivos celulares (medio Eagle modificado por Dulbecco) con la adición de 300 UI de una enzima por 1 mg de película. La incubación se llevó a cabo a 37 °C y las muestras se analizaron después de 24 horas. El análisis de la muestra se llevó a cabo en el sistema de HPLC Alliance (Waters) según un procedimiento operativo de estándar interno. Después de 24 horas, no se detectaron oligosacáridos a base de hialuronano en la solución, lo cual está de acuerdo con el ejemplo 28, en el que se observó un tiempo de degradación muy largo para la película, según el ejemplo 2, y que demuestra la posibilidad de modulación de la degradación mediante el grado de sustitución.

Ejemplo 31. ***Caracterización de las películas mediante módulo de Young***

Se determinó el módulo de Young para películas preparadas, según los ejemplos 10, 15, 16 y 19, en estado seco. Se ensayaron las propiedades mecánicas de las películas mediante una máquina de ensayo de tracción de una sola etapa INSTRON3343 con un cabezal de 100 N. El módulo de Young se calculó sobre la base del valor medio de, como mínimo, 9 mediciones válidas. La tabla 7 muestra que el módulo de Young de películas secas no hidratadas no depende del peso molecular, sustituyente o grado de sustitución.

Tabla 7: módulo de Young de las películas

	Módulo de Young (MPa)
Película preparada según el ejemplo 10	2835 (+/- aprox. 10 %)
Película preparada según el ejemplo 15	2409 (+/- aprox. 10 %)
Película preparada según el ejemplo 16	1800 (+/- aprox. 10 %)
Película preparada según el ejemplo 19	2636 (+/- aprox. 10 %)

Ejemplo 32. ***Caracterización de la morfología superficial de la película y determinación de RMS mediante AFM***

Las películas preparadas, según los ejemplos 8 y 16, se caracterizaron mediante el procedimiento de microscopía de fuerza atómica (AFM, *atomic force microscopy*), en el que se supervisó especialmente el aspecto y el carácter de la superficie. Especialmente se determinó la rugosidad RMS (rugosidad cuadrática media). Se descubrió que se puede obtener una superficie muy lisa con un valor de RMS de hasta 2 nm a partir del lado del sustrato (véase la figura 5 para la película según el ejemplo 16). El lado de la película que se expone al aire durante el secado es siempre más rugoso, en el que la RMS está en un punto de aproximadamente de 50 nm o más.

Ejemplo 33. ***Comparación de películas secadas en gradiente de temperatura y en espacio cerrado***

Las películas preparadas, según los ejemplos 8 y 19, se compararon visualmente después del secado. La superficie de ambas películas no se deformó, la costra superficial no se formó en ninguna de las películas. Ambas películas fueron cualitativamente iguales (comparación visual).

Ejemplo 34. ***Viabilidad de células THP-1 en suspensión después de 24 y 72 horas de incubación con la película preparada según el ejemplo 1 a base de un derivado palmitoílico de hialuronato de sodio***

La línea celular THP-1 se cultivó en un medio con la adición de suero fetal bovino al 10 %. Después de lograr una densidad y viabilidad suficientes (medidas mediante un contador de células automático CASY TT, Roche), las células se sembraron en un panel de 6 pocillos en 2 ml de medio al 10 %. La película ensayada se añadió a las células en una cantidad de 1 y 0,5 mg/ml. Después de 24 y 72 horas de incubación, las células se lavaron y se detectó su viabilidad y la aparición de muerte celular mediante el kit de detección ApoFlowEx® FITC Kit (Exbio) en

un citómetro de flujo MACSQuant® (Miltenyi Biotec). Las células se evaluaron como viables en caso de que no se detectara fluorescencia de yoduro de propidio. La figura 6 muestra una reducción insignificante de la viabilidad después de 24 horas de incubación, que ya no se detectó después de 72 horas. Por lo tanto, la película ensayada se evalúa como no citotóxica en dichas concentraciones.

Ejemplo 35. ***Análisis de la muerte celular de células THP-1 en suspensión después de 24 y 72 horas de incubación con la película preparada según el ejemplo 1 a base de derivado palmitoílico de hialuronato de sodio***

La línea celular THP-1 se cultivó en un medio con la adición de suero fetal bovino al 10 %. Después de lograr una densidad y viabilidad suficientes (medidas mediante un contador de células automático CASY TT, Roche), las células se sembraron en un panel de seis pocillos en 2 ml de medio al 10 %. La película ensayada se añadió a las células en una cantidad de 1 y 0,5 mg/ml. Después de 24 y 72 horas de incubación, las células se lavaron y se detectó su viabilidad y la aparición de muerte celular mediante el kit de detección ApoFlowEx® FITC Kit (Exbio) en el citómetro de flujo MACSQuant® (Miltenyi Biotec). La evaluación de la presencia de muerte celular (apoptosis y necrosis) se llevó a cabo según la recomendación del fabricante del kit. En resumen: la población de las células individuales se dividió basándose en la intensidad de fluorescencia de yoduro de propidio y anexina V-FITC en 3 grupos: células negativas en ambos canales (células vivas), positivas solo en el canal para anexina V-FITC (células apoptóticas) y positivas para el canal de yoduro de propidio +/- anexina V-FITC (células necróticas).

Las figuras 7 y 8 implican que después de 24, así como 72 horas, no se produce un aumento mayor del número de células apoptóticas o necróticas en el cultivo y, por lo tanto, se puede evaluar que el material ensayado no induce la muerte celular.

Ejemplo 36. ***Inhibición por contacto del crecimiento de fibroblastos de ratón 3T3 Swiss***

La línea de fibroblastos de ratón 3T3 Swiss se cultivó en un medio con la adición de suero fetal bovino al 10 %. En la fase de crecimiento exponencial, las células se sembraron en un panel de seis pocillos en 2 ml del medio al 10 %. Después de lograr la confluencia, se añadió la película ensayada preparada según el ejemplo 1 que tenía el área de 1 cm^2, la cual se cargó con un anillo estéril de silicona para que no ocurriera un movimiento significativo de la película sobre el monocultivo. Al mismo tiempo, las células de control se incubaron sin ningún tratamiento y solo con el anillo de silicona. Después de 72 horas de incubación, se retiraron las muestras de película y los anillos de silicona, se lavaron las células con PBS y se fijaron con formaldehído al 4 % (10 min/temperatura ambiente). Después de lavar con agua desionizada, las células se colorearon con cristal violeta (0,1 % en agua, 30 min/temperatura ambiente) y, después de eliminar el color por lavado, se fotografió el área de las células y se observó bajo un microscopio óptico. Se evaluó el área de las células bajo el material ensayado, la extensión del daño de las células y el tamaño de la zona dañada.

Las macrofotografías (figura 9) muestran claramente que la zona dañada de la monocapa está delimitada y que únicamente se dañaron las células que estaban directamente debajo de la película, de la manera más probable por una ligera fricción; los detalles del microscopio óptico muestran que las células tendían a volver a crecer bajo la película. No se observaron daños ni cambios en la morfología de las células en los bordes de la película ensayada. Por lo tanto, se puede suponer que el material no exhibe la inhibición por contacto del crecimiento celular.

Ejemplo 37. ***Propiedades antiadhesivas a células de la película***

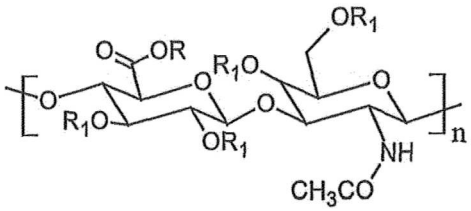
Las películas preparadas, según los ejemplos 2 y 17, (derivados que tienen dos grados de sustitución diferentes) se cortaron de manera estéril en partes que tenían las dimensiones de 1 cm^2. Estas partes se colocaron en un panel de cultivo de seis pocillos boca arriba o boca abajo. A continuación, se cargaron con anillos de silicona estériles y se pipeteó medio de cultivo (2 ml) para fibroblastos humanos primarios (NHDF) que contenía suero fetal bovino al 10 % en las muestras preparadas de este modo. Mientras tanto, se preparó una suspensión de NHDF y se pipeteó hasta el centro del anillo de silicona en la superficie de la película en una cantidad de 100.000 células/muestra. Las muestras con las células se incubaron durante 72 horas y se comprobaron a intervalos de 24 horas bajo el microscopio óptico. Como control positivo (CTRL) se utilizó poliestireno adaptado para cultivos celulares con buenas propiedades de adhesión. Una vez completada la incubación, se retiraron los anillos de silicona y las películas junto con las células se fijaron con formaldehído al 4 % durante 10 minutos y después se colorearon con cristal violeta al 1 % en agua (10 min). Después de eliminar por lavado el cristal violeta no unido (2 x 5 minutos de enjuague con agua destilada), las muestras se fotografiaron utilizando un microscopio invertido Nikon con un aumento de 100x. Los resultados se muestran en la figura 10. En la foto CTRL, se puede ver una capa de células casi confluente. En las fotos de película (A-D) es observable una cierta estructura, probablemente formada debido a la larga incubación en el medio y hecha visible mediante cristal violeta. Sin embargo, no hay células presentes en las películas. Por lo tanto, se puede afirmar que las películas son completamente no adherentes a este sistema e incluso la presencia de proteínas en el medio de cultivo no favoreció la adhesión.

Ejemplo 38. ***Preparación de la película con diclorhidrato de octenidina***

Se mezclaron 20 µl de una solución madre de diclorhidrato de octenidina en etanol que tenía la concentración en peso de 10 mg/ml con 20 ml de propan-2-ol al 50 %. Después de agitar a fondo, se añadieron a la solución 100 mg de un derivado palmitoílico de hialuronato de sodio que tenía el grado de sustitución del 57 % y un peso molecular de 2,67 x 10^5 g/mol. La solución se agitó durante 72 horas y, después de agitar, se dosificó sobre un vidrio hidrofobizado que tenía el valor de humectabilidad de 65 (+/- 3°) y se secó en un espacio cerrado, en un gradiente de temperatura a la temperatura de la placa inferior de 50 °C y la temperatura de la placa superior de 20 °C durante 6 horas. Después de secar, la película se evaluó, se retiró del sustrato y se caracterizó. Se determinó que el grosor de la película era de 15 µm.

REIVINDICACIONES

1. Película a base de un éster de ácido hialurónico, **caracterizada por que** comprende un derivado acilado de C_{10}-C_{22} de ácido hialurónico, según la fórmula general (I)



(I)

en la que R es H^+ o Na^+, y en la que R^1 es H o $-C(=O)C_xH_y$, en la que x es un número entero dentro del intervalo de 9 a 21 e y es un número entero dentro del intervalo de 11 a 43 y C_xH_y es una cadena lineal o ramificada, saturada o insaturada de C_9-C_{21}, en la que, como mínimo, en una unidad repetitiva, uno o más de R^1 es $-C(=O)C_xH_y$ y en la que n está dentro del intervalo de 12 a 4000; siendo la película autoportante y estando su grosor dentro del intervalo de 2 a 100 μm.

2. Película, según la reivindicación 1, **caracterizada por que** comprende palmitoil hialuronano o lauroil hialuronano.

3. Película, según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, **caracterizada por que** el derivado acilado de C_{10}-C_{22} de ácido hialurónico tiene un peso molecular de 1 x 10^5 a 1 x 10^6 g/mol, preferentemente de 1 x 10^5 a 5 x 10^5 g/mol, más preferentemente de 2 x 10^5 a 3 x 10^5 g/mol.

4. Película, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1 a 3, **caracterizada por que** el derivado acilado de C_{10}-C_{22} de ácido hialurónico tiene el grado de sustitución dentro del intervalo del 15 al 160 %, preferentemente del 50 al 100 %, más preferentemente del 80 al 100 %.

5. Película, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1 a 4, **caracterizada por que** tiene el grosor dentro del intervalo de 5 a 25 μm.

6. Película, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1 a 5, **caracterizada por que** la rugosidad superficial expresada en forma de media cuadrática de, como mínimo, una de las superficies de la película está dentro del intervalo de 0,5 a 100 nm, preferentemente dentro del intervalo de 0,5 a 2 nm.

7. Película, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1 a 6, **caracterizada por que** comprende, además, como mínimo, una sustancia biológicamente activa seleccionada entre el grupo que incluye sustancias activas farmacéuticamente y sustancias activas cosméticamente, preferentemente vitaminas, fármacos, preferentemente citostáticos, esteroides, otros fitoextractos, fitocomplejos o sustancias fitoactivas.

8. Procedimiento de preparación de la película, definida en cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1 a 7, **caracterizado por que** se prepara una solución que comprende un derivado acilado de C_{10}-C_{22} de ácido hialurónico, según la fórmula general (I), en una mezcla de agua y alcohol de C_1-C_6, preferentemente etanol o propan-2-ol,
estando la proporción de la mezcla de alcohol de C_1-C_6, preferentemente etanol o propan-2-ol, y agua dentro del intervalo del 25 - 55 % en volumen al 45 - 75 % en volumen, en el que la cantidad del derivado acilado de C_{10}-C_{22} de ácido hialurónico en la solución está dentro del intervalo del 0,5 al 3 % en peso,
que se agita, y después se aplica sobre un sustrato y se seca en un espacio cerrado y, a continuación, se retira del sustrato.

9. Procedimiento de preparación de la película, según la reivindicación 8, **caracterizado por que** la solución se agita durante de 20 a 72 horas, preferentemente de 20 a 48 horas.

10. Procedimiento de preparación de la película, según la reivindicación 8 o la reivindicación 9, **caracterizado por que** el secado tiene lugar a una temperatura dentro del intervalo de 20 °C a 50 °C, preferentemente de 30 °C a 40 °C; durante de 3 a 6 horas, preferentemente de 4 a 5 horas.

11. Procedimiento de preparación de la película, según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 9, **caracterizado por que** el secado tiene lugar en un gradiente de temperatura, donde la superficie inferior de la película que descansa sobre el sustrato se calienta a una temperatura que es, como mínimo, 1 °C más alta que la temperatura a la que se calienta o enfría la superficie superior opuesta de la película.

12. Procedimiento de preparación de la película, según la reivindicación 11, **caracterizado por que** la superficie inferior de la película que descansa sobre el sustrato se calienta a la temperatura dentro del intervalo de 20 °C a 60 °C y la superficie superior opuesta de la película se calienta o enfría a la temperatura dentro del intervalo de

10 °C a 59 °C.

13. Procedimiento de preparación de la película, según la reivindicación 11 o la reivindicación 12, **caracterizado por que** la película se seca en un gradiente de temperatura durante de 6 a 12 horas, preferentemente 6 horas.

14. Procedimiento de preparación de la película, según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 13, **caracterizado por que** se mezcla, como mínimo, una sustancia biológicamente activa con la solución, seleccionándose la sustancia entre el grupo que incluye sustancias activas farmacéutica y cosméticamente, preferentemente vitaminas, fármacos, preferentemente citostáticos, esteroides, otros fitoextractos, fitocomplejos o sustancias fitoactivas.

15. Procedimiento de preparación de la película, según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 14, **caracterizado por que** el sustrato es un polímero seleccionado entre el grupo que comprende alcohol polivinílico, polipropileno, polietileno, polioximetileno o poliestireno, o vidrio hidrofobizado, en el que el ángulo de contacto de humectación de la superficie del sustrato por agua desmineralizada está dentro del intervalo de 30° a 120°, preferentemente de 50° a 70°.

16. Utilización de la película, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en aplicaciones médicas o aplicaciones biotecnológicas.

17. Utilización de la película, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la construcción de un dispositivo médico, preferentemente una barrera antiadhesiva.

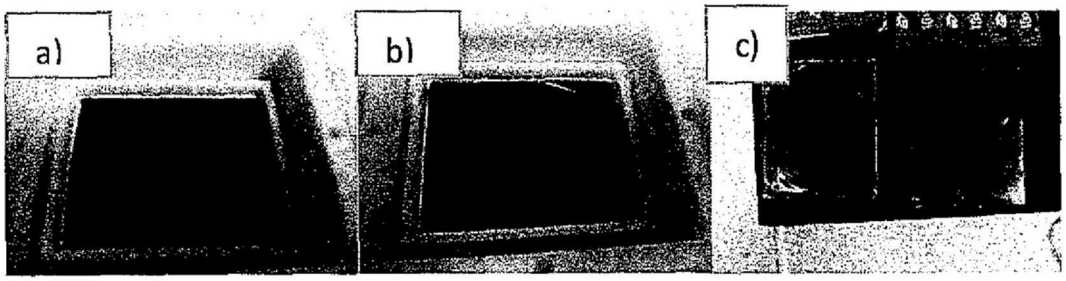


Fig. 1

Fig. 2

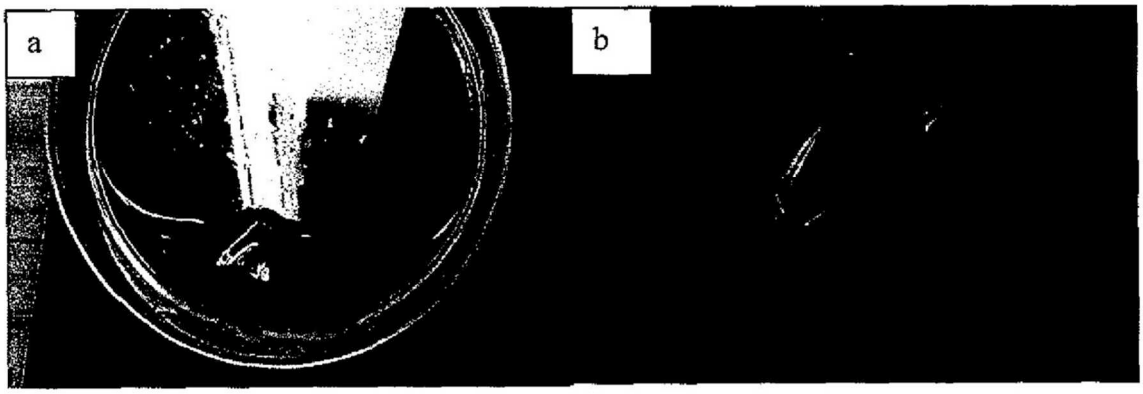


Fig. 3

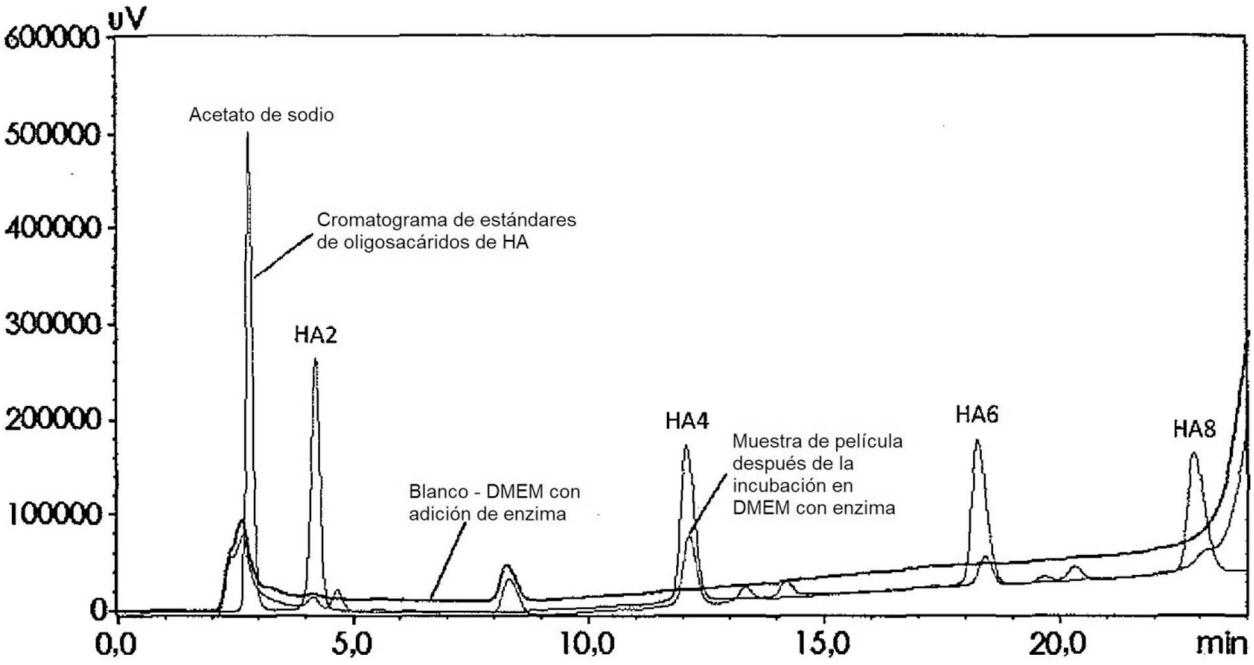

uV
600000
500000
400000
300000
200000
100000
0
Acetato de sodio
Cromatograma de estándares de oligosacáridos de HA
HA2
HA4
HA6
HA8
Muestra de película después de la incubación en DMEM con enzima
Blanco - DMEM con adición de enzima
0,0
5,0
10,0
15,0
20,0
min

Fig. 4

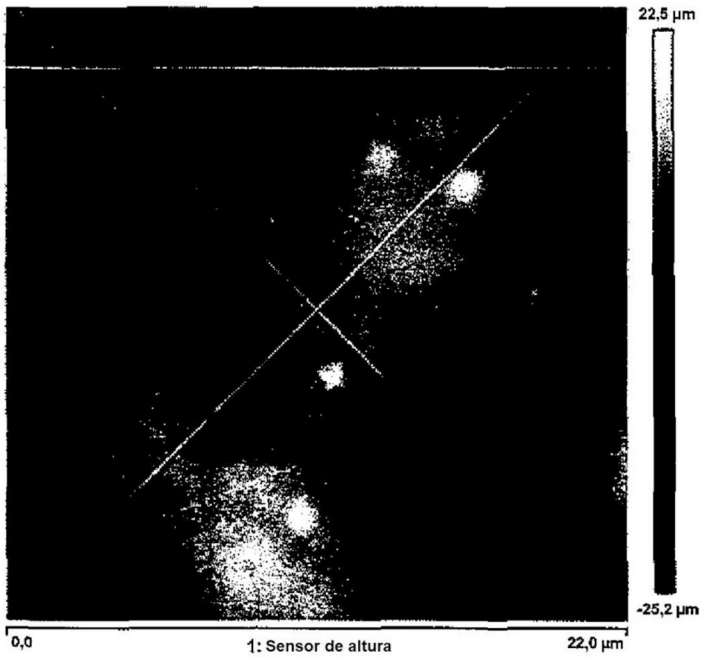

22,5 µm
-25,2 µm
0,0
1: Sensor de altura
22,0 µm

Fig. 5

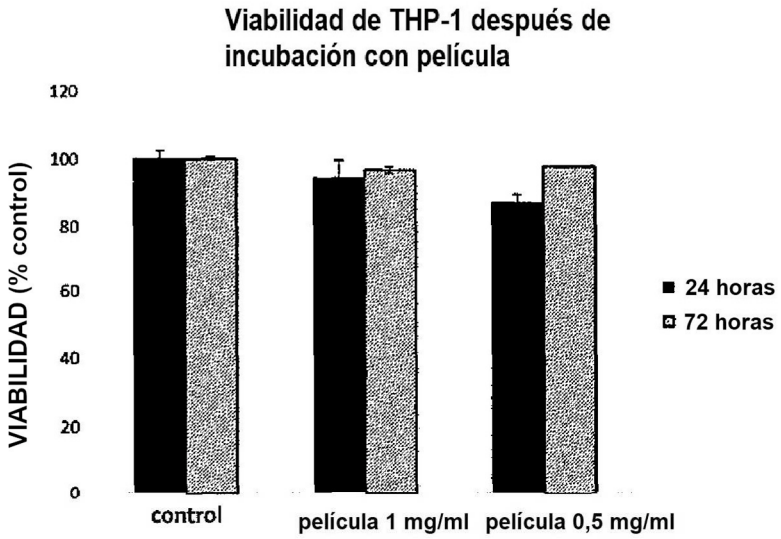

Viabilidad de THP-1 después de incubación con película
VIABILIDAD (% control)
120
100
80
60
40
20
0
control
película 1 mg/ml
película 0,5 mg/ml
24 horas
72 horas

Fig. 6

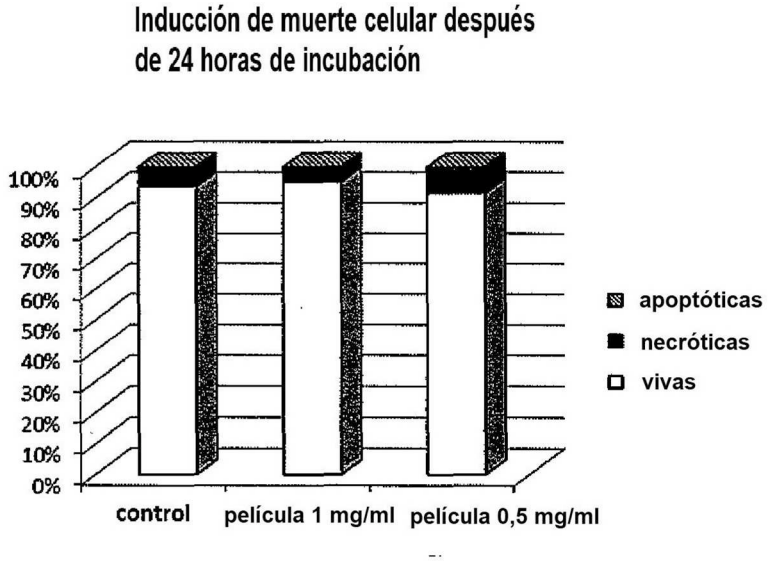

Inducción de muerte celular después de 24 horas de incubación
100%
90%
80%
70%
60%
50%
40%
30%
20%
10%
0%
control
película 1 mg/ml
película 0,5 mg/ml
apoptóticas
necróticas
vivas

Fig. 7

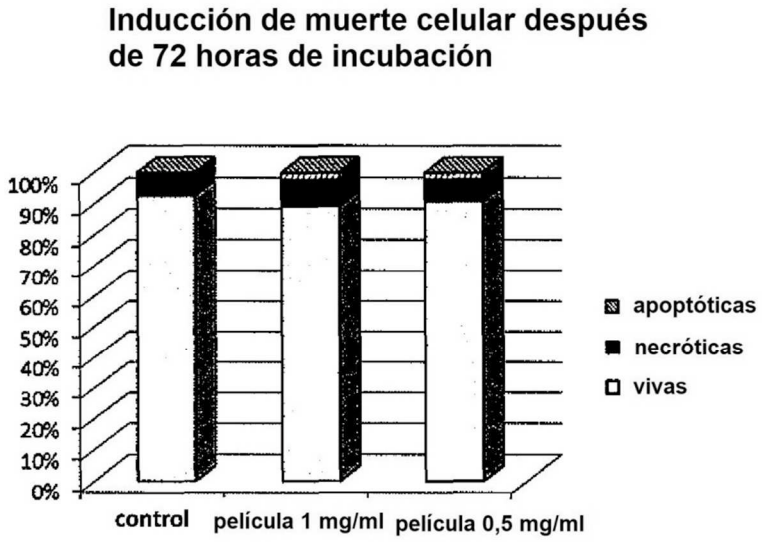

Inducción de muerte celular después de 72 horas de incubación
100%
90%
80%
70%
60%
50%
40%
30%
20%
10%
0%
control
película 1 mg/ml
película 0,5 mg/ml
apoptóticas
necróticas
vivas

Fig. 8

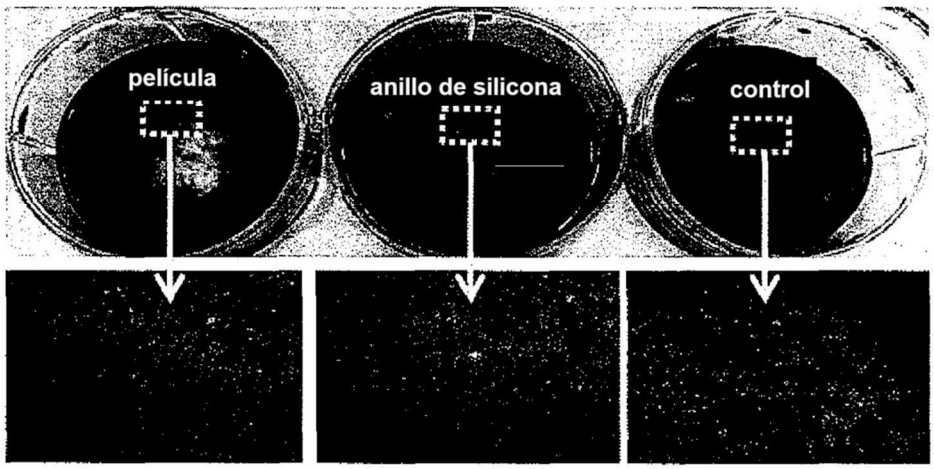

película
anillo de silicona
control

Fig. 9

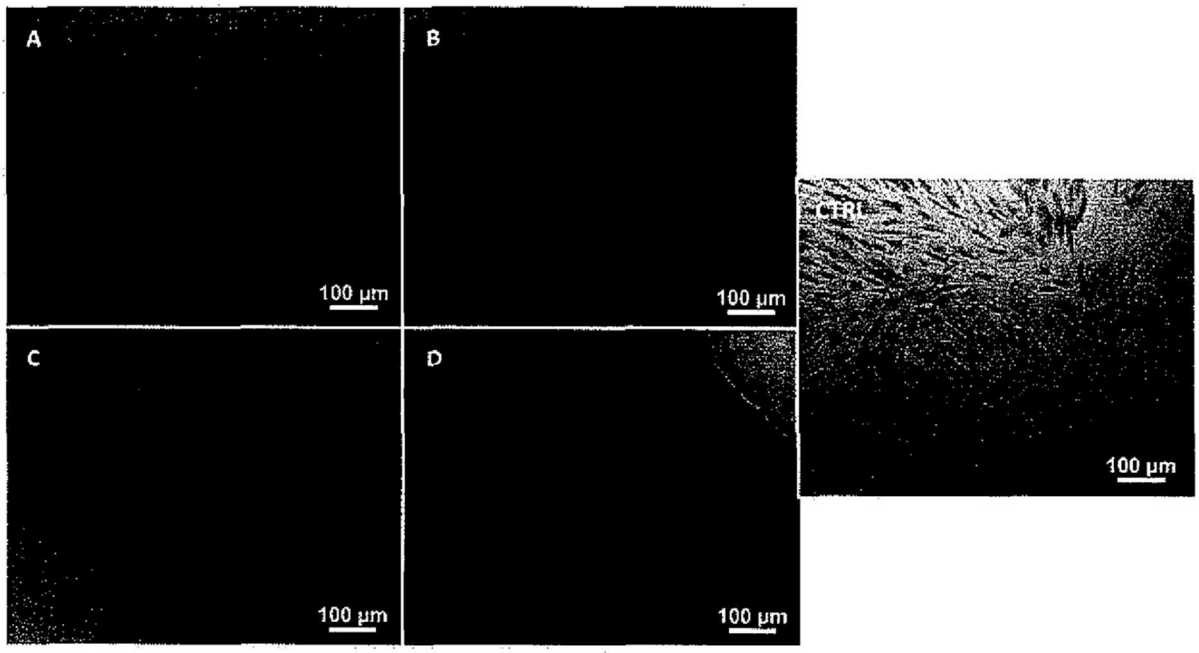


Fig. 10

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citada por el solicitante es únicamente para mayor comodidad del lector. No forman parte del documento de la Patente Europea. Incluso teniendo en cuenta que la compilación de las referencias se ha efectuado con gran cuidado, los errores u omisiones no pueden descartarse; la EPO se exime de toda responsabilidad al respecto.

Documentos de patentes citados en la descripción

- WO 2014082609 A, Smejkalova, Huerta-Angeles
- CN 202822230
- EP 2644623 A
- US 20100092545 A
- JP 06025306 B
- US 20120088832 A
- EP 0216453 A
- US 20040192643 A
- EP 216453 A
- WO 2010137374 A
- WO 2010105582 A1
- WO 2014082611 A1
- US 2006281912 A1