

MINISTERIO DE INDUSTRIA  
REGISTRO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL



ESPAÑA

Concedido el Registro de acuerdo con los datos que figuran en la presente descripción y según el contenido de la Memoria adjunta.

**PATENTE DE INVENCION**

18	ES	11	NUMERO	10	A 1
		21			
		29	FECHA DE PRESENTACION		

466.119

18 ENE. 1978

30	PRIORIDADES:	32	FECHA	33	PAIS
	31	NUMERO			
		576/77	18 de enero de 1977		SUIZA

47	FECHA DE PUBLICIDAD	51	CLASIFICACION INTERNACIONAL	62	PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
			A61K		

64	TITULO DE LA INVENCION
	PROCEDIMIENTO DE FABRICACION DE UNA MEMBRANA SINTETICA PARA APOSITOS.

71	SOLICITANTE (S)
	BATTELLE MEMORIAL INSTITUTE.

	DOMICILIO DEL SOLICITANTE
	7, route de Drize, 1227 CAROUGE, Suiza.

72	INVENTOR (ES)
	Daniel BICHON, Ing.

73	TITULAR (ES)

74	REPRESENTANTE
	GOMEZ-ACEBO

La presente invención tiene por objeto un procedimiento para la producción de un tejido ó membrana sintética a base de poli-aminoácidos, designado familiarmente, por esta razón, con el término de "piel artificial", útil como curación absorbible in situ por el organismo humano ó animal.

5

En efecto, la membrana ó "piel artificial" de la invención es ventajosamente utilizable como curación puesto que es absorbible, al menos en parte, por biodegradación en contacto con el organismo humano ó animal liberando productos de degradación no tóxicos, asimilables por el organismo vivo en cuestión, teniendo estos productos, preferentemente, la propiedad de favorecer la cicatrización de los tejidos vivos.

10

Así pues, la piel artificial conforme a la invención presenta, con respecto a las curaciones de tipo usual, la ventaja de poder dejarse in situ permanentemente, al menos en lo que respecta a su parte destinada a ponerse en contacto directo con la herida a proteger y a tratar, merced a su propiedad de ser biodegradable.

15

Esta piel artificial es absorbida progresivamente por el organismo, en su totalidad ó al menos en lo que concierne a la parte aplicada sobre la herida, a medida de la cicatrización de los tejidos vivos. La utilización de esta piel artificial como curación permite, por consiguiente, remediar uno de los principales inconvenientes de las curaciones conocidas en materias no biodegradables, a saber, la necesidad de renovar periódicamente el apósito lo que ocasiona una operación de arrancamiento molesto para el paciente y retrasa el proceso de regeneración de los tejidos.

20

25

La invención tiene igualmente por objeto proporcionar una piel artificial que presenta algunas de las propiedades fa

30

vorables de la piel natural, es decir que combina una excelente retención de los líquidos acuosos con una porosidad elevada, lo que permite, de un lado una excelente oxigenación de los tejidos vivos en los que se aplica esta piel y, de otro lado, la aplicación de sustancias medicamentosas, por ejemplo en forma de pomadas ó de soluciones acuosas, a través de esta piel, oponiéndose a la vez al paso de los microorganismos, como los microbios y virus, las levaduras ú hongos.

El interés manifiesto de los apósitos al menos parcialmente absorbibles por el organismo ya es reconocido con anterioridad a la presente invención.

La patente francesa 1.593.518 (PARACHEM CORPORATION) describe un apósito que comprende dos capas de materia absorbible por el cuerpo humano, de las cuales una, destinada a aplicarse directamente sobre una herida, es preferentemente en forma porosa.

Esta materia absorbible es esencialmente a base de derivados de celulosa.

Las dos capas del apósito descritas en esta patente pueden ser en forma densa ó bien en forma "porosa ó ventilada" y se explica que esta última forma tenga una actividad hemostática más elevada que la forma densa pero por el contrario ofrece un poder de retención menor de los líquidos.

Así pues, este apósito permite obtener simplemente una retención más ó menos eficaz de los líquidos que se deslizan de una herida y una protección mecánica de ésta contra la contaminación por los microbios, similares a las que resultan del empleo de apósitos convencionales conocidos, con el único resultado suplementario respecto de estos últimos, de poder ser, al menos parcialmente, resorbido por el organismo.

La patente USA 2.682.872 (BOWER) describe un apósito constituido por una "materia orgánica desecada" absorbible por los fluidos de los tejidos vivos, compuesto por dos capas de las cuales la primera, destinada a aplicarse directamente sobre la herida, tiene una estructura porosa y la segunda, destinada a constituir la parte exterior del apósito, es "relativamente no porosa" y comprende la materia orgánica en un estado menos fácilmente absorbible que en la primera capa del apósito.

Esta "materia orgánica desecada" está, preferentemente, constituida por sustancias constitutivas de la sangre animal.

Consecuentemente, este apósito presenta, como se describe en la patente francesa 1.593.518, la característica de ser al menos parcialmente resorbible por el organismo humano pero no posee, igualmente, la característica de permeabilidad selectiva que constituye, como se ha indicado más arriba, uno de los principales objetivos de la presente invención.

La solicitud de patente francesa nº 2.150.695 (AJINOMOTO) se refiere a un procedimiento de fabricación de artículos moldeados a base de poliamino-ácidos, ó de sustancias similares pudiendo estar estos artículos en forma de películas destinadas a emplearse como piel artificial.

Esta solicitud de patente describe la utilización, como polímeros, de amino-ácidos, de copolímeros filmógenos de di-ácidos aminados y de ésteres de diácidos aminados reticulados por medio de di-isocianatos en particular de un copolímero de  $\beta$ -L- aspartato de metilo y de L-leucina cuyos grupos ésteres han sido saponificados, ó incluso de un copolímero de  $\gamma$ -L- glutamato de metilo y de D,L-metionina, que son sustancias fácilmente resorbibles por los tejidos vivos.

5 Sin embargo, y dejando a parte el hecho de que por razones de toxicidad, la utilización de isocianatos no sea deseable para productos biocompatibles, y aunque la estructura de las películas obtenidas por el procedimiento descrito en la solicitud de patente francesa 2.150.695 corresponde a una permeabilidad elevada frente al oxígeno y sustancias en solución en un medio acuoso, por ejemplo amino-ácidos, sales, glucosa y urea, esta estructura no permite combinar una buena retención de los fluidos del organismo con la permeabilidad elevada frente a los gases, así como la obtención de una excelente aptitud para permitir el paso de sustancias medicamentosas impidiendo a la vez el paso de los micro-organismos como los microbios y virus

10 Por el contrario, la presente invención permite precisamente procurar una piel artificial, al menos parcialmente resorbible por los tejidos vivos, piel que tiene, como se ha indicado más arriba, algunas de sus propiedades casi idénticas a las de la piel natural.

15 A este efecto, la piel artificial conforme a la invención y que comprende dos capas solidarias de las cuales una, al menos, es resorbible por el organismo, aplicándose la primera, interior, directamente sobre la herida y la segunda constituye una protección exterior, se caracteriza porque la segunda capa está constituida por un tejido poroso semipermeable de estructura asimétrica, es decir cuyos poros, tienen una sección que decrece en el sentido interior-exterior y que deja pasar el aire, el agua y las sustancias de bajo peso molecular, reteniendo los micro-organismos patógenos exteriores y porque la primera capa está constituida por un tejido hidrófilo no tóxico de materia biodegradable, alveolar con células comunican-

20

25

30

tes, esponjosa y permeable a los líquidos, elegida entre los polímeros y copolímeros de los ácidos y ésteres  $\alpha$ -aminados.

Así pues, la piel artificial según la invención se distingue de los apósitos anteriormente conocidos, a base de ma  
5 terias resorbibles por los tejidos vivos, por su estructura particular que comprende dos capas distintas, aunque constituidas de sustancias bastante similares, que tienen cada una una textura y una función específica y que cooperan entre sí de modo a permitir conseguir una combinación de propiedades que no se  
10 encuentra en ninguno de los apósitos conocidos.

Como polímero y copolímero filmógeno de ácido  $\alpha$ -aminado ó de éster de ácido  $\alpha$ -aminado, se puede utilizar cualquier sustancia de este tipo apropiada, preferentemente, formada a partir de ácidos y ésteres de ácidos  $\alpha$ -aminados, Tales polímeros ó copolímeros son sustancias macromoleculares sintéticas  
15 filmógenas perfectamente conocidas cuya preparación se describe en la literatura científica. A este efecto, se podrá consultar la referencia siguiente:

"Synthetic Polypeptides" par Bamford, Elliott et Hanby, Academic Press, New-York (1.956); "Advances in Protein Chemistry 13, 243 y siguiente. (1.958).  
20

Como ésteres de los diácidos aminados, se puede utilizar los ésteres de alquilos fácilmente saponificables por los álcalis diluidos, en particular los alquilos inferiores, por  
25 ejemplo metilo y etilo.

Es posible utilizar el mismo polímero resorbible por los tejidos vivos para formar las dos capas constitutivas de la piel artificial según la invención, aunque, bién entendido, los procesos de preparación de las capas sean diferentes. Sin embargo, preferentemente se utilizan dos materias diferentes, aún  
30

que emparentadas, para formar estas dos capas, a fin de conseguir propiedades físico-químicas y mecánicas óptimas para cada una de estas capas. Así pues, preferentemente, la primera capa (la que está destinada a aplicarse directamente sobre la herida) está constituida por un copolímero de L-leucina y de éster  $\alpha$ -L-glutámico ó aspártico al menos parcialmente saponificado. Este copolímero puede estar formado por al menos el 10 % y a lo sumo el 50 % de L-leucina y, en cuanto al resto, de ácido  $\alpha$ -L-glutámico y/o aspártico parcialmente esterificado, según la velocidad deseada para la biodegradación de esta capa. En efecto se sabe que la velocidad de biodegradación de la poli-L-leucina sola es con mucho más débil que la del ácido poliglutámico de modo que, para una mezcla de estos compuestos, la velocidad de biodegradación será tanto menor respectivamente tanto mayor, cuanto la proporción de L-leucina sea mayor, respectivamente menor. La materia de la primera capa comprenderá ventajosamente puentes de reticulación, por ejemplo puentes diésteres con un diol, por ejemplo polioxietileno-glicol. Dicho copolímero presenta la ventaja particular de tener propiedades físicas muy próximas de las del colágeno natural humano. Preferentemente, el espesor de la primera capa está comprendido entre 0,5 y 3 mm.

Para preparar esta primera capa, se podrá proceder de la siguiente manera: se comienza por fabricar un copolímero entre N-carboxi-anhídricos de ácidos (ó ésteres-)aminados. Por ejemplo, se elegirá la leucina y un  $\beta$ -éster de alquilo del ácido aspártico; estos N-carboxianhídricos son por su parte obtenidos por acción del fosgeno en las funciones amino-ácidos libres de estas sustancias. Preferentemente, se acelera la polimerización, con hidruro de sodio. En el caso del ácido aspártico se

utiliza, como productos de partida, el éster bencílico puesto que es un producto fácilmente disponible y su N-carboxianhídrido polimeriza fácilmente (lo que no ocurre con el éster metílico, por ejemplo). Por el contrario, el N-carboxianhídrido del  $\alpha$ -glutamato de metilo polimeriza sin dificultad.

Después se somete el copolímero así obtenido a una trans-esterificación en éster metílico puesto que el copolímero bencílico se saponificaría difícilmente durante la etapa de saponificación ulterior. Esta trans-esterificación se realiza según las técnicas usuales, por ejemplo, en MeOH en presencia de  $\text{SO}_4\text{H}_2$  (Polymer (1.975)). Quede bien entendido que si en lugar del éster bencílico se utiliza, como producto de partida, el éster metílico del ácido glutámico, la trans-esterificación anterior no tiene objeto.

A continuación se forma una pasta de copolímero metilado con un disolvente orgánico y una sal hidrosoluble pero insoluble en el disolvente orgánico, por ejemplo NaCl; se esparce esta pasta en capa sobre una placa y se la seca hasta la evaporación del disolvente. Después se somete la capa a una saponificación en una mezcla de sosa cáustica diluida y de un disolvente hidrófilo, lo que salifica una proporción notable de las funciones éster carboxílico esterificadas. Después se somete la placa a una reticulación, por ejemplo templándola en una solución de  $\text{SO}_4\text{H}_2$  en un diol, por ejemplo polioxi-etileno glicol. Esta reticulación dá a la capa un buen comportamiento mecánico y flexibilidad. Finalmente, se lava abundantemente la placa con agua para eliminar todos los productos solubles así como la sal sólida cuya disolución crea la estructura alveolar buscada. Finalmente, se seca la placa cuya materia es flexible y resistente.

La estructura esponjosa de esta primera capa le permite tener una flexibilidad conveniente para seguir los movimientos del tejido vivo con el que está en contacto y tener, además, una excelente adherencia con este último durante el desarrollo fibroblástico que se produce en el momento de su cicatrización.

Para formar la segunda capa (la que está destinada a constituir la pared de protección, vuelta hacia el exterior), se utiliza preferentemente un copolímero de L-leucina y de L-glutamato de  $\alpha$ -alquilo, y, más particularmente, un copolímero formado a partir de proporciones molares iguales de cada uno de estos monómeros.

Preferentemente, el espesor de esta segunda capa está comprendido entre 50 y 100  $\mu$ .

La estructura semi-permeable asimétrica de esta segunda capa, que puede ser similar a la de ciertas membranas de ultrafiltración ó de ósmosis inversa, es una estructura, de un tipo conocido de por sí (ver por ejemplo "Polymer Science & Technology", volumen 6 (1.974), p. 459 PLENUM PRESS; "Synthetic Polimeric Membranes por R.E. KESTING (1.971) McGraw & Hill), que comprende poros de diámetros variables en el sentido perpendicular a la superficie de la capa. disminuyendo el valor medio de los diámetros de forma aproximadamente regular a partir de la cara de esta capa que está en contacto con la primera capa hacia la cara libre de esta segunda capa.

Se puede preparar esta capa muy simplemente de la siguiente manera: se esparce en una placa de vidrio una capa de solución viscosa del polímero en un disolvente hidrosoluble, por ejemplo dimetilformamida, se deja esta capa equilibrarse algunos instantes al aire y se la temple en agua fría el tiempo

po suficiente para que el disolvente se elimine completamente. Después se la seca en aire caliente. Se obtiene entonces una capa plástica flexible cuya porosidad en la cara adherente a la placa de vidrio es visible con el microscopio y cuyos poros, en la cara exterior, son tan finos que prácticamente no son descubribles ni siquiera con grandes aumentos.

En lo que se refiere al desecho de esta capa (significando este término, en la técnica de las membranas de ultrafiltración ó de ósmosis inversa, el porcentaje de una sustancia en solución dada que es retenido por la membrana), desecho que depende esencialmente de las dimensiones de los poros de esta capa que están situados cerca de la parte de la capa dispuesta del lado de su "cara libre" exterior, corresponde por ejemplo a un valor prácticamente nulo frente a una sustancia de bajo peso molecular, como es el agua y el cloruro de sodio, un valor medio, del orden del 30 al 50 % para sustancias que tienen un peso molecular más elevado, del orden de 1.000 a 5.000 como la albúmina, y un valor igual a ó muy próximo de 100 % para sustancias macromoleculares como las resinas sintéticas solubles en agua ( $M_w \geq 20.000$ ).

Así resulta que sustancias de peso molecular débil ó medio, como son medicamentos en solución acuosa ó incorporados en pomadas, pueden atravesar fácilmente la capa superficial de la piel artificial conforme a la invención, cuando esta piel se aplica como apósito sobre una herida, mientras que las bacterias, virus y otros micro-organismos como las levaduras y hongos son eficazmente mantenidos alejados de la herida.

En lo que concierne a la permeabilidad al agua y a las soluciones acuosas de esta segunda capa de la piel artificial, puede corresponder, por ejemplo, a un flujo del orden de

50 cm<sup>3</sup> de agua por m<sup>2</sup> y por hora, bajo una sobrepresión interna de 12 cm aproximadamente de mercurio en el sentido que vá de la primera capa a la segunda.

5 El procedimiento de fabricación de la piel artificial de la invención se caracteriza porque después de haberse preparado su primera capa se aplica sobre ésta la segunda ó la materia de ella de tal forma que sea la cara de esta última la que incluya los poros mayores que constituye la superficie de unión entre las dos capas.

10 Según un método de ejecución de este procedimiento, se aplica sobre una de las caras de la primera capa una solución adhesiva de un N-carboxianhídrido de un amino-ácido en un disolvente orgánico, se desengancha la segunda capa de su placa-soporte en la que ha sido preparada, se la superpone con  
15 ligera presión en la primera capa enlucida del adhesivo y se deja secar el conjunto hasta la evaporación completa del disolvente orgánico. La unión entre las dos capas se efectuará así por mediación de la cara de la segunda capa cuyos poros son más gruesos.

20 A continuación se esteriliza la piel artificial por los procedimientos habituales.

Como N-carboxianhídrido adhesivo, se puede emplear el de la glicina y, como disolvente, el acetato de etilo.

25 Según otro procedimiento de ejecución, se procede como sigue: después de haber preparado la primera capa como se ha descrito más arriba, se esparce sobre ésta una solución del copolímero de la segunda capa en un disolvente hidrosoluble. Después se temple el conjunto en agua helada un tiempo suficiente para que el disolvente se elimine por difusión y que la  
30 gunda capa se solidifique.

Como disolvente hidrosoluble se puede utilizar THF, dioxano piridina, etc.

5 Debe hacerse notar que la estructura particular de la membrana artificial conforme a la invención parece conferir, además, de las características de permeabilidad a los líquidos más elevada en el sentido que vá de la capa destinada a aplicarse sobre la herida (primera capa) hacia la capa superficial (segunda capa) que en el sentido inverso. Por consiguiente, el deslizamiento de un líquido, como agua ó los líquidos fisiológicos segregados por la herida en vías de cicatrización, es fa-  
10 cilitado sin perjudicar la protección de esta herida.

La utilización de la piel artificial conforme a la invención es particularmente ventajosa para el tratamiento de todos tipos de heridas, en particular las heridas con pérdida de sustancias como las heridas traumáticas, quemaduras, cos-  
15 tras, etc, y para la preparación de los injertos cutáneos.

Cuando se utiliza esta piel como apósito resorbible in situ, las dos capas que le constituyen pueden ser resorbidas sucesivamente de forma íntegra por los tejidos vivos de la  
20 herida en la que se aplica. Como variante, solo la primera capa espesa (capa de estructura esponjosa) puede ser resorbida, y se desune a continuación la capa superficial delgada (capa de estructura semi-permeable asimétrica) que no cumple, en este caso, más que una misión de protección superficial temporal.

25 En el primer caso, ninguna operación de arrancamiento del apósito se necesita y, en el segundo caso, el arrancamiento final de la capa superficial delgada puede efectuarse en un estadio de cicatrización muy avanzado de la herida y por tanto es fácil, prácticamente sin dolor y sin efecto retardador en la cicatrización.  
30

La invención será mejor comprendida merced a los ejemplos no limitativos siguientes, destinados a ilustrar la invención sin, sin embargo, limitar su alcance.

Ejemplo 1

5           A) Preparación de la primera capa (tipo glutamato de metilo-leucina)

a) Preparación del N-carboxianhídrido del L-glutamato de -metilo  $\left( \text{CH}_3\text{-O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH} \begin{array}{l} \text{-CO} \diagup \\ | \\ \text{NH-CO} \diagdown \end{array} \text{O} \right)$ :

10           En un recipiente de laboratorio provisto de un agitador, termómetro y refrigerante a reflujo recorrido por una mezcla refrigerante a 0-2°C, se ha colocado 250 g de L-glutamato de α-metilo y 3 litros de tetrahidrofurano (THF). Se introduce a 40°C, agitando, fosgeno a razón de 1 l/minuto aproximadamente.  
15           Después de 1 hora de adición, se ha reducido el caudal de COCl<sub>2</sub> a ~ 0,5 l/minuto y se ha continuado la adición todavía durante 1 hora. A continuación se ha eliminado el exceso de fosgeno y el disolvente a presión reducida y se ha recolectado 278 g (93 %) del anhídrido buscado (F. 99°C). Esta reacción ha sido efectuada según: "Biopolimers 15 (1.976), 1.869".  
20

b) Preparación del N-carboxianhídrido de L-leucina: se ha procedido por analogía con el procedimiento anterior a partir de 200 g de leucina y se ha obtenido 215 g (90 %) del anhídrido buscado.

25           c) Polimerización de una mezcla de los N-carboxianhídridos de L-glutamato de α-metilo y de leucina: en 2.000 ml de benceno seco, se han introducido 59,8 g de N-carboxianhídrido de L-glutamato de α-metilo y 27 g de N-carboxianhídrido de leucina. Las cantidades molares de los constituyentes eran  
30           calculadas para que la mezcla comprendiera 65 moles % del monó

mero glutámico y 35 moles % del otro monómero. Se han añadido 6 g de NaH y 240 mg de trietilamina (iniciador) a una temperatura de 20°C y se ha dejado la copolimerización que continúe durante 24 horas.

5           A continuación se ha vertido la solución reaccional en 5 litros de etanol frío con violenta agitación lo que ha tenido por efecto destruir el NaH y provocar la precipitación del polímero. Se ha secado éste y se ha disuelto de nuevo en ácido dicloracético (DCA), y después se ha precipitado en alcohol lo  
10 que ha permitido obtenerlo en forma purificada y perfectamente soluble en los disolventes orgánicos como  $\text{CHCl}_3$ , THF,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (disolventes helicógenos). Rendimiento 60 g (90 %).

          d) Preparación de la materia alveolar: se han disuelto 0,5 g del copolímero, preparado como se ha descrito anteriormente, en una mezcla de 1,5 g de  $\text{CHCl}_3$  y 2 ml de Bz y se han añ  
15 dido 4 g de NaCl finamente molido. Se ha homogeneizado esta pasta en el mezclador y se ha esparcido en una placa de politetrafluoroetileno (PTFE) en un espesor de 2 mm. A continuación se ha secado esta capa a 60°C hasta la desaparición de los disolventes.  
20

          e) Saponificación y reticulación: a temperatura ambiente, se ha templado la placa de PTFE recubierta de la capa polimérica 17 horas en una solución agitada que contiene 10 ml de NaOH 1N, 70 ml de etanol y 20 ml de acetona. Después se ha  
25 escurrido la placa, se la ha secado durante 5 horas a 50°C y se la ha vuelto a templar en 100 ml de una solución de polioxi-etileno glicol 300 que contiene 5 g de  $\text{SO}_4\text{H}_2$  98 % (solución 0,5 N). Después de 24 horas a 70°C, se ha lavado abundantemente la placa con agua hasta la eliminación de todas las trazas  
30 de ácido y de sal. Después se ha secado la placa en estufa a

70°C. La materia así preparada es flexible y resistente, insoluble en ácido dicloracético (DCA) pero soluble en NaOH 0,1N. Por disolución en una cantidad conocida de álcali y titulación a contrapelo con HCl (fenolftaleína), se ha comprobado que el

5 59 % de los grupos metilo originales han sido saponificados en grupos -COOH.

Se observará que si, en lugar de someter la placa a una reticulación en PEG SO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>, se la neutraliza simplemente en una solución de SO<sub>4</sub>H<sub>2</sub> 3 % en PEG, se obtiene una vez secado,

10 un producto soluble en DCA y de gran fragilidad mecánica.

Ha de hacerse notar que aplicando los medios descritos anteriormente de a a d, se han preparado polímeros de glutamato de metilo y de leucina (Glu (OMe)/Leu) en proporciones molares siguientes: 85/15; 44/56; 50/50. Estos polímeros han

15 sido utilizados, como se ha descrito en los párrafos d a e para la preparación de variantes de la primera capa de la presente membrana resorbible para apósitos.

B) Preparación de la segunda capa de la piel artificial.

Se disuelve 40 g de un copolímero estadístico de L-leucina y de L-glutamato de α-metilo preparado como se ha descrito en la parte A de este ejemplo (proporción molar de los monómeros de partida = 50/50 aproximadamente) en 69 g de tetra

25 hidrofurano y después se añaden 17 g de formamida a la solución así obtenida.

Se refrigera la solución a 0°C y se la cuele en una placa de vidrio cuidadosamente desengrasada, de modo a conseguir una curva viscosa que tiene un espesor aproximado de 0,5 mm. Se deja evaporar la mezcla de disolventes, manteniendo esta

30 capa durante 2 minutos al aire, a la temperatura ambiente y

5 después se temple la placa de vidrio y la capa de solución en un baño de agua helada y se las mantiene durante 1 hora en este baño. Se obtiene así la formación de una membrana semi-permeable de estructura asimétrica cuyos poros en la cara contigua a la placa tienen una dimensión del orden de 0,001 a 0,01  $\mu$  mientras que son, microscópicamente, prácticamente invisibles en la otra cara. Esta membrana, cuyo espesor aproximado es de 45 micrones (0,045 mm) se desune por su parte de la superficie de la placa de vidrio.

10 Esta membrana permite el paso de un flujo de agua pura de 0,75 ml/minuto-cm<sup>2</sup> a una presión de 1,5 kg/cm<sup>2</sup>, y presenta las características de desecho siguientes:

15	Sustancia en solución acuosa sometida a una ultrafiltración a través de la membrana:	Desecho %
	Cloruro de sodio (sol. H <sub>2</sub> O a 5 %)	0
	Albúmina bovina	35
20	Polivinilpirrolidona (peso molecular: 360.000)	96

C) Montaje, esterilización y conservación de la piel artificial.

25 Se ensamblan las dos capas cuya preparación y las características se han indicado anteriormente pegándolas entre sí por medio de la cantidad justo necesaria de una solución concentrada adhesiva de glicina - N - carboxi - anhídrido en acetato de etilo (después de la pegadura y endurecimiento,

30 la presencia de esta solución no es prácticamente ya descubri-

ble).

Finalmente, se esteriliza el conjunto obtenido (vapor de agua seco a 140°C) durante 20 minutos.

5 La piel artificial así obtenida puede conservarse a la temperatura ambiente, sin alteración durante varios meses, al menos, en estado húmedo (impregnada de glicerina ó de suero fisiológico) con embalaje esteril.

Ejemplo 2

10 A) Preparación de la primera capa (tipo ácido aspártico-leucina)

a) Preparación del N-carboxianhídrido del β-aspartato de bencilo  $\text{Ph-CH}_2\text{-O-CO-CH}_2\text{-CH-CO}$   
NH-CO O:

15 Se ha procedido exactamente como se ha descrito en el ejemplo 1 párrafo A) a) utilizando como ácido aminado 20 g de aspartato de β-bencilo lo que ha proporcionado 20 g (89 %) del N-carboxianhídrido buscado (F. 100°C).

b) N-carboxianhídrido de la leucina: ver ejemplo 1, párrafo A) b).

20 c) Copolimerización de una mezcla (50:50 molar) de los N-carboxianhídridos de β-aspartato de metilo y de leucina.

25 Se ha efectuado esta copolimerización a partir de una solución de 26 g del derivado aspártico y 16,3 g del derivado de leucina en una mezcla de 560 ml de benceno y 140 ml de dioxano. Se ha operado como se ha descrito en el párrafo correspondiente A) c) del ejemplo 1 por medio de 100 mg de trietilamina (TEA) y 1 g de NaH. Después de 24 horas, se ha filtrado el NaH y utilizado la solución directamente para la etapa que sigue.  
30

d) Transesterificación: A la solución de poli-(aspartato de bencilo-peucina) obtenida como se ha descrito anteriormente, se han añadido 610 ml de benceno a fin de diluir la mezcla y disminuir su viscosidad. Después, a 65°C, se ha añadido una solución de 17,4 ml de SO<sub>4</sub>H<sub>2</sub> concentración (98 %) en 430 ml de metanol. Se ha calentado 60 horas a ebullición y después se ha concentrado en vacío hasta la separación del polímero por precipitación. Se ha recogido éste en 100 ml de THF y después de la filtración, se han añadido 2 litros de agua destilada lo que ha provocado de nuevo su precipitación. Se ha lavado con agua este polímero, se le ha secado a 50°C y se le ha purificado por disolución en 100 ml de DCA, precipitación en agua, lavado hasta neutralidad y secado. Se han obtenido así 20 g de copolímero poli-(aspartato de β-metilo-leucina), 50:50 molar) que comprende todavía 3 moles % de restos bencílicos (análisis por RMN).

e) Preparación de la materia alveolar: se han disuelto 3 g del copolímero anterior en una mezcla de 14 g de cloroformo y 20 g de benceno. Se ha añadido a la solución 18 g de NaCl finamente triturado en el mortero. La pasta resultante ha sido esparcida como en el ejemplo anterior y secada. Después ha sido lavada con agua corriente hasta la eliminación total de la sal y secada a 60°C.

f) Saponificación y reticulación:  
Se ha templado la placa en una solución de sosa 1 N en etanol absoluto y se la ha dejado bajo agitación suave durante 24 horas. La espuma ha sido lavada con etanol absoluto y en una muestra, se han dosificado los grupos -COONa por trituración. Se ha encontrado que el 50 % de los grupos aspartato de metilo han sido saponificados.

A continuación se ha templado la placa 18 horas a 70 °C en un baño 0,5 N de  $\text{SO}_4\text{H}_2$  en polietileno glicol 300 a 70°C. Se ha lavado a continuación la placa con agua corriente y se ha triturado el porcentaje de grupos  $-\text{COOH}$ . Se ha encontrado 26% de grupos  $-\text{COOH}$ . Con ello se ha llegado a la conclusión de que 24 % de los grupos  $-\text{COOH}$  han sido esterificados por polietileno-glicol. La espuma así reticulada es flexible y sólida en estado seco.

5  
10 B) y C) Preparación de la segunda capa y montaje de éstas para la confección de "la piel artificial".

Se ha procedido exactamente como se ha descrito en los párrafos correspondientes B) y C) del ejemplo 1.

Ejemplo 3

15 Las diferentes variantes de "pieles artificiales" obtenidas según los ejemplos 1 y 2 anteriores han sido sometidas a los ensayos de utilización siguientes:

Se han preparado tres muestras de pieles artificiales, respectivamente A, B y C de las cuales la primera capa que se pone en contacto con la herida estaba constituida de los polímeros siguientes:

20 A): poli (Leu-Asp), (50:50); grado de saponificación 50 moles %, es decir la mitad de los grupos éster del aspartato de metilo grado de reticulación 0 %.

25 B): poli (Leu-Asp), (50:50); grado de saponificación 25 moles %; grados de reticulación 17,5 moles % (por tanto grado de  $-\text{COOH}$  libres 17,5 moles %).

C): poli (Leu-Asp), (50:50); grado de saponificación 40 moles %; grados de reticulación 5 moles % (por tanto grado de  $-\text{COOH}$  libres 35 moles %).

30 Debe hacerse notar que la primera capa de la muestra

A ha sido preparada según los datos del ejemplo 2 a excepción de la etapa de etapa de reticulación que ha sido omitida.

Se ha esterilizado estas muestras dos horas bajo rayos UV después de lo cual se han aplicado de estas muestras fragmentos (10 x 5 mm y 2,5 mm de espesor) sobre incisiones practicadas en la región de los hombros de ratas macho WISTAR. Después de un periodo de espera de 24 horas a 3 semanas, los animales han sido sacrificados, los apósitos han sido retirados y la resorción de la materia que constituye la primera capa ha sido evaluada visualmente y expresada, de forma aproximada en % del tejido original efectivamente resorvido.

Los resultados figuran en el cuadro siguiente:

Muestra	Tiempo de resorción		
	24 horas	10 días	3 semanas
A	28 %	70 %	100 %
B	1 %	10 %	20 %
C	35 %	100 %	---

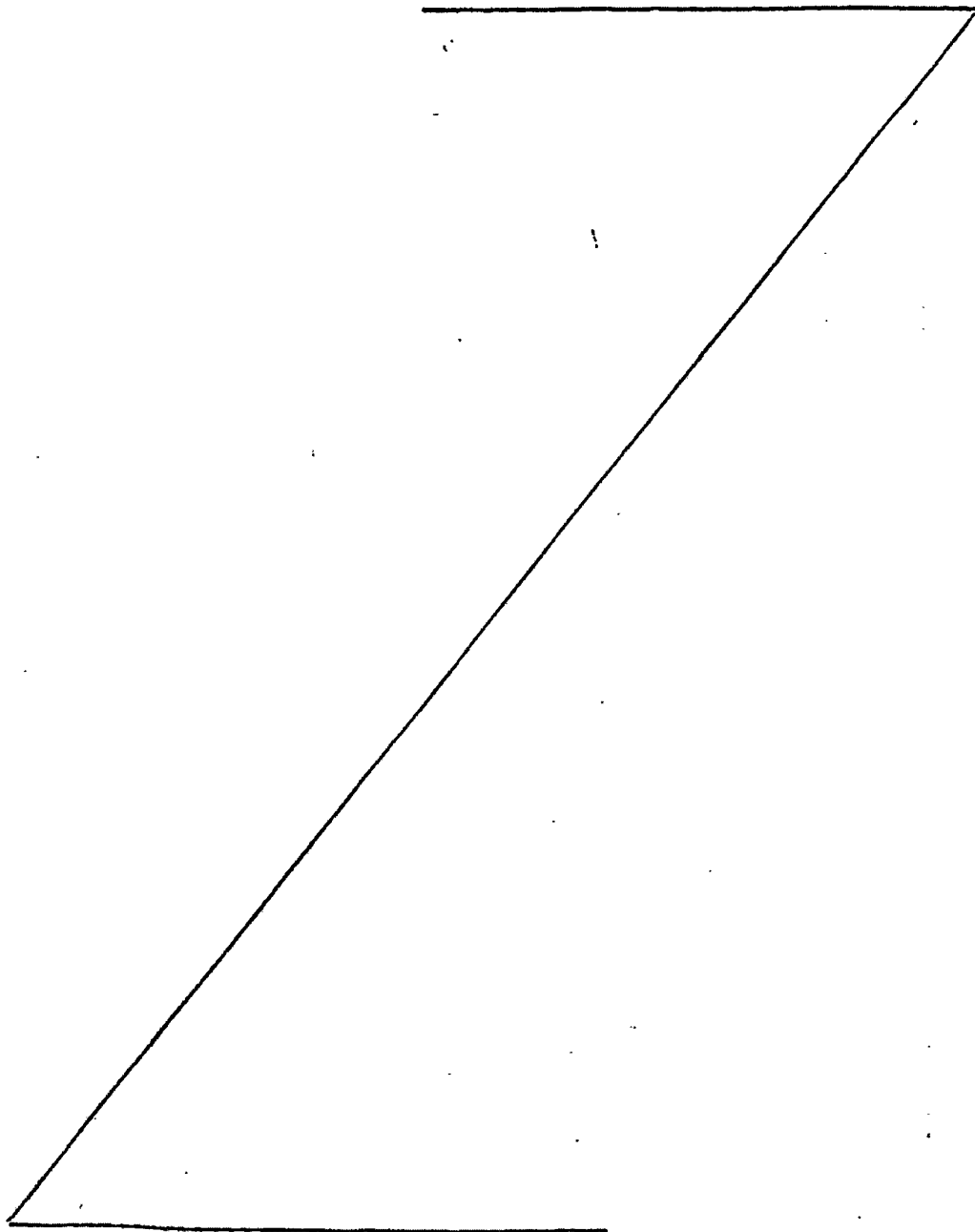
Estos resultados ponen de manifiesto claramente que el grado de resorción aumenta en función del grado de  $-COOH$  libres, es decir del grado de saponificación e inversamente en función del grado de reticulación.

Ajustando estos parámetros según los medios divulgados en la presente invención, se puede por tanto obtener diversos productos cuyos grados de resorción corresponden a las diferentes finalidades buscadas.

Por lo demás, sustituyendo en las muestras anteriores el resto aspártico por el resto glutámico, se comprueba, permaneciendo el resto de las cosas idénticas, que el grado de

resorción es aumentado de forma significativa.

5. Descrita suficientemente la naturaleza del invento, así como la manera de realizarlo en la práctica, debe hacerse constar que las disposiciones anteriormente indicadas, son susceptibles de modificaciones de detalle, en cuanto no alteren su principio fundamental.



REIVINDICACIONES

5 1ª.- Procedimiento de fabricación de una membrana  
sintética para apósitos, de materia polipeptidida sintética,  
que comprende dos capas solidarias de las cuales una, al me-  
nos es resorbible por el organismo, aplicándose la primera,  
interior, directamente sobre la herida y la segunda constituye  
una protección exterior, estando constituida la segunda capa  
por un tejido poroso, semi-permeable cuyos poros tienen una  
sección que decrece en el sentido interior-exterior, lo que la  
10 confiere una permeabilidad asimétrica, dejando pasar aire,  
agua y sustancias de bajo peso molecular, y deteniendo a la  
vez los micro-organismos patógenos exteriores; y estando cons-  
tituida la primera capa por un tejido hidrófilo no tóxico de  
materia biodegradable, alveolar de células comunicantes, espon-  
15 josa y permeable a los líquidos elegida entre los polímeros y  
copolímeros de los ácidos y ésteres  $\alpha$ -aminados; caracterizado  
porque después de haber preparado la primera capa, se aplica  
sobre ésta la segunda capa de modo que la cara de esta segunda  
capa, cuyos poros tienen la mayor sección, se adhiera a la  
20 primera capa.

2ª.- Procedimiento según la reivindicación 1, carac-  
terizado porque se aplica sobre una de las caras de la primera  
capa una solución adhesiva de un N-carboxianhídrido de un ami-  
no-ácido en un disolvente orgánico; se desune la segunda capa  
25 de su soporte en el que ha sido preparada independientemente;  
se la aplica sobre la primera capa, constituyendo la cara más  
porosa la superficie de unión; y se deja secar el conjunto has-  
ta la evaporación completa del disolvente orgánico.

3ª.- Procedimiento según la reivindicación 2, carac-  
30 terizado porque el amino-ácido del adhesivo es glicina y el di

solvente es acetato de etilo.

5 4<sup>a</sup>.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque después de haber preparado la primera capa se esparce sobre ésta, en frío, una solución del copolímero que constituye la segunda capa en un disolvente hidrosoluble y se temple el conjunto en agua helada de modo a eliminar, por difusión, el disolvente hidrosoluble.

10 5<sup>a</sup>.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la primera capa está constituida por un copolímero de L-leucina y de ácido  $\alpha$ -L-glutámico parcialmente esterificado.

15 6<sup>a</sup>.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la primera capa está constituida por un copolímero de L-leucina y de ácido aspártico parcialmente esterificado.

20 7<sup>a</sup>.- Procedimiento según las reivindicaciones 5 y 6, caracterizado porque el copolímero de la primera capa se reticula por puentes éster resultantes de una esterificación de las funciones -COOH con diol, en particular polioxietileno glicol 300.

25 8<sup>a</sup>.- Procedimiento según la reivindicación 7, caracterizado porque el copolímero está constituido por al menos 10% y a lo sumo por 50 % de L-leucina y, para el resto, ácidos  $\alpha$ -L-glutámico ó L-aspártico

9<sup>a</sup>.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el espesor de la primera capa es de 0,5 a 3 mm.

30 10<sup>a</sup>.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la segunda capa está constituida por una materia elegida entre los polímeros y los copolímeros filmógenos de los ácidos  $\alpha$ -aminados y de los ésteres alquilados de estos ácidos.

11<sup>a</sup>.- Procedimiento según la reivindicación 10, caracterizado porque la segunda capa está constituida por un copolímero de L-leucina y de L-glutamato de  $\alpha$ -alquilo, en particular metilo.

5

12<sup>a</sup>.- Procedimiento según la reivindicación 10, caracterizado porque el copolímero se forma a partir de proporciones iguales de cada uno de los monómeros de partida.

10

13<sup>a</sup>.- Procedimiento según la reivindicación 10, caracterizado porque el espesor de la segunda capa es de 50 a 100  $\mu$ .

14<sup>a</sup>.- Procedimiento de fabricación de una membrana sintética para apósitos, tal y como queda sustancialmente descrito en la presente Memoria.

15

Esta Memoria consta de 24 hojas, escritas a máquina por una sola cara.

Madrid 18 ENE. 1978

BATTELLE MEMORIAL INSTITUTE

J. M. GOMEZ ACEBO Y PACHECO  
p. p. Firmado: J. Suarez Diaz

