

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 595 653**

51 Int. Cl.:

C08B 37/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.04.2013 PCT/CZ2013/000057**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.10.2013 WO13159757**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.04.2013 E 13724511 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.07.2016 EP 2841462**

54 Título: **Derivado de hialuronano reticulado, su método de preparación, hidrogel y microfibras en base al derivado**

30 Prioridad:

25.04.2012 CZ 20120282

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

02.01.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**HUERTA-ANGELES, GLORIA;
JOUKLOVA, ZUZANA;
PRIKOPOVA, EVA y
VELEBNY, VLADIMIR**

74 Agente/Representante:

JIMÉNEZ URÍZAR, María

ES 2 595 653 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Derivado de hialuronano reticulado, su método de preparación, hidrogel y microfibras en base al derivado

5

CAMPO DE LA INVENCION

[0001] La presente invención se refiere al proceso de reticulación de ácido hialurónico modificado (HA), que es catalizado por un catalizador de paladio homogéneo estable en agua, y opcionalmente una base. El proceso consiste en la síntesis de derivados que se pueden utilizar como precursores adecuados para reacción de acoplamiento carbono-carbono o de acoplamiento cruzado. Estos precursores son aplicables para la síntesis de hidrogeles, así como para reticulación de microfibras hechas de derivados de los mismos.

10

ESTADO DE LA TÉCNICA

[0002] El ácido hialurónico (HA o hialuronano) es un elemento de una clase de polímeros conocidos como glicosaminoglicanos. HA es un polisacárido lineal de cadena larga y está normalmente presente como la sal de sodio que tiene la fórmula molecular de $(C_{14}H_{20}NNaO_{11})_n$ y el peso molecular puede variar en función de la fuente, procedimiento de aislamiento y método de determinación. Sin embargo, se ha informado de pesos moleculares de hasta 143106. El peso molecular aquí mencionado es el peso molecular promedio en peso, a menos que se indique lo contrario.

15

20

[0003] HA es no inmunogénico y por tanto tiene un gran potencial en medicina. Debido a sus propiedades visco-elásticas, se ha encontrado que HA con un alto peso molecular (más de 1 millón) es particularmente útil en una variedad de campos clínicos, incluyendo tratamiento de heridas, cirugía oftálmica y cirugía ortopédica. HA también es potencialmente útil en una variedad de campos no médicos, tal como aplicaciones cosméticas.

25

[0004] Sin embargo, el uso de HA en algunas de estas aplicaciones está limitado por el hecho de que tras la administración a seres humanos el HA es degradado fácilmente por enzimas tales como hialuronidasas y radicales libres. Además, el HA es soluble en agua a temperatura ambiente, lo que también puede hacer que sea menos adecuado para ciertas aplicaciones. Para aumentar la viscosidad o para obtener un derivado reticulado, se debe utilizar un agente externo.

30

[0005] Se han hecho por tanto diversos intentos para preparar formas más estables de HA, en particular por reticulación. Por ejemplo, la patente U.S. No. 4.582.865 describe la preparación de geles reticulados de ácido hialurónico usando divinilsulfona como el agente de reticulación; pero el material reticulado puede encapsular divinilsulfona libre que es potencialmente tóxica y pirogénica como se describe más adelante en la patente US 7131492. Otros ejemplos de hidrogeles basados en HA se han obtenido por agentes de reticulación tales como éter butanodiol diglicidil o glutaraldehído (Collins & Birkinshaw, 2007). Sin embargo, ha habido diversos informes de reacciones alérgicas a estos productos (Matarasso y Herwick, 2006). Esta solicitud de patente supera algunas desventajas que han sido informadas en reticulación, más específicamente, el hecho de que la reticulación a veces falla y debe usarse un segundo agente de reticulación, el cual es generalmente un reactivo altamente reactivo, de modo que se prefiere una modificación directa del polisacárido y reticulación en una segunda etapa (Schanté, Zuber, Herlin y Vandamme; Yeom et al). La preparación de HA también se divulga en WO 2010/051783. En la técnica anterior se han descrito otros agentes de reticulación que comprenden un metal, metal de transición, metaloide, a los que aquí se hace referencia colectivamente como un "metal". Los ejemplos incluyen boro, aluminio, circonio, magnesio, hierro, cobre, plomo o titanio (US 20010002411). Generalmente, el metal interactúa con al menos dos moléculas gelificantes para formar un enlace químico entre ellas. Muchos de estos agentes de reticulación referidos tienen inconvenientes asociados con su uso. Por ejemplo, agentes de reticulación que contienen boro están limitados a utilizarse en pH 8 y requieren el uso de sales externas a incluir en la mezcla de reacción. Además, el boro reacciona con hidroxilos presentes en la macromolécula o con aditivos tales como alcoholes o glicoles utilizados para tratamiento adicional y aislamiento de los productos de reacción. El titanio también tiene desventajas, tales como un alto coste y la cinética lenta de la reticulación. Agentes de reticulación basados en circonio también tienen inconvenientes; p.ej. la incapacidad para reticular xantano, que es un agente gelificante común usado en formulaciones (US-20080207470).

35

40

45

50

55

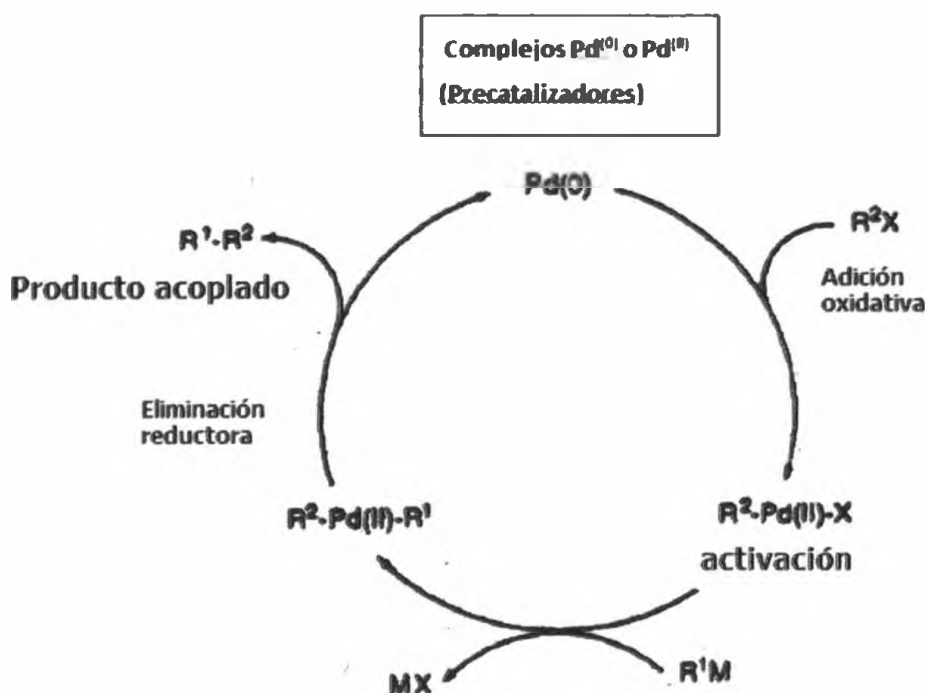
[0006] Otras formas de reticulación para formar hidrogeles implican enlaces no covalentes y el uso de múltiples iones cargados, tales como hierro, cobre, zinc, calcio y otros iones quelantes, como se informa en US-7807656-B2. Sin embargo, los metales insertados pueden tener algunos efectos toxicológicos desconocidos.

60

[0007] La reticulación no es exclusiva para la formación de hidrogeles, sino que también se puede aplicar a la obtención de microfibras insolubles. En cambio, se han descrito recientemente microfilamentos (o fibras) hechos de ácido hialurónico nativo en el documento US 20100310631, y tienen la propiedad de ser completamente solubles en agua. Además de eso, se obtuvieron materiales a base de fibras hialurónicas por reticulación del ácido hialurónico en presencia de agentes reticulantes del tipo de carbodiimida y epóxido (agentes de reticulación, una lista no exhaustiva

de los cuales se menciona, por ejemplo, en US- 2007066816). Estos materiales, sin embargo, poseen el inconveniente no despreciable de ser tóxicos para los seres humanos, lo que limita seriamente todos los usos de los mismos *in vivo*.

[0008] Durante los últimos pocos años, se han hecho enormes esfuerzos en el área de las síntesis orgánicas mediadas por metal de transición. A este respecto, una reacción de acoplamiento carbono-carbono es un concepto que involucra una variedad de reacciones en las que dos fragmentos de hidrocarburos se acoplan con la ayuda de un catalizador metálico. Se reconocen dos tipos de reacciones de acoplamiento: *acoplamiento cruzado* que implica la reacción de dos compuestos diferentes y *homoacoplamiento* que acopla juntos dos compuestos idénticos. Los metales de transición tienen una capacidad única para activar diversos compuestos orgánicos y a través de esta activación pueden catalizar la formación de nuevos enlaces. El principio de los acoplamientos cruzados catalizados por paladio es que dos moléculas se ensamblan sobre el metal mediante la formación de enlaces metal-carbono. De este modo los átomos de carbono unidos al paladio son llevados muy cerca uno del otro. En el siguiente paso se acoplan entre sí y esto conduce a la formación de un nuevo enlace simple carbono-carbono. Esto se ilustra en el Esquema 1 siguiente:



Esquema 1 Un ciclo catalítico general para acoplamiento cruzado

[0009] Una reacción de acoplamiento cruzado catalizada por paladio se aplicó, por ejemplo, para la síntesis de varillas de azúcar y más tarde para clústeres de hidratos de carbono (Roy, Das, Santoyo-González, Hernández-Mateo, Dam y Brewer, 2000). Algunos ejemplos de este tipo de química se describen en una serie de artículos por Vasella *et al* (Murty y Vasella, 2001). Sin embargo, esta reacción útil se ha utilizado escasamente en química de carbohidratos o polisacáridos. La solicitud de patente internacional WO-9014353 informó del acoplamiento mediado por paladio de oligonucleótidos para fines diagnósticos y terapéuticos. Un nuevo enlace carbono-carbono mediado por paladio se dio a conocer en WO / 2007/008226 para su uso en formación de química en patrón de ADN.

[0010] En este documento, describimos una nueva forma de reticulación de HA por medio de una reacción de acoplamiento cruzado catalizada por paladio. La reacción se puede efectuar sin el uso de aditivos especiales, tales como otros metales, por ejemplo, cobre. La reacción se puede llevar a cabo en agua o tampones fosfato, así como en mezclas de alcoholes y bases y ácidos orgánicos e inorgánicos comunes y baratos. La optimización de las condiciones ha demostrado que la reacción requiere una cantidad muy baja de catalizador, temperaturas relativamente bajas y tiempo de reacción corto. Después de la reticulación, los productos, en lo sucesivo denominados aquí hidrogeles y microfibras, se lavaron extensamente con el fin de eliminar el paladio residual. Sorprendentemente, la eliminación efectiva del catalizador ha asegurado la aplicación potencial de la reacción para formar materiales insolubles para aplicaciones en uso farmacéutico y en general para uso humano, por lo tanto, la reacción de acoplamiento cruzado conduce a una verdadera innovación en el campo de la química de modificación de polisacáridos bioactivos.

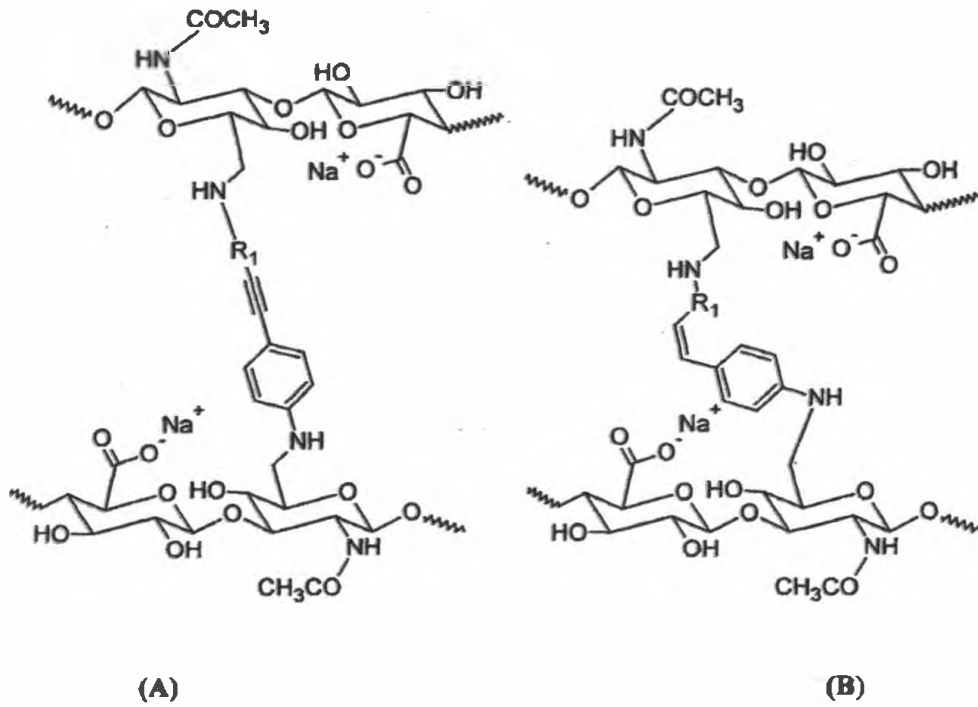
RESUMEN DE LA INVENCIÓN

5 **[0011]** Esta invención se refiere a un método de reticular polisacáridos, y más específicamente, ácido hialurónico. Como se discutió anteriormente, la presente invención proporciona un método para formar derivados insolubles de ácido hialurónico. Más específicamente, el proceso se refiere a la preparación de múltiples hidrogeles o microfibras reticulados basados en un HA químicamente modificado. La presente metodología describe una preparación eficaz de hidrogeles a base de ácido hialurónico, e igualmente, esta metodología se puede aplicar a reticular micro-fibras basadas en HA modificado. El proceso de preparación del derivado de hialuronano reticulado, se lleva a cabo por una
10 reacción de acoplamiento C-C en agua, tampón de fosfatos o una mezcla de un ácido orgánico y un alcohol, y en presencia de un catalizador activo de paladio, en el que la reacción de acoplamiento C-C tiene lugar entre un derivado de hialuronano con un terminal arilo-haluro y/o un grupo arilo-borato, y un derivado de ácido hialurónico que lleva un grupo alqueno o alquínico.

15 **[0012]** Las fibras de acuerdo con la presente descripción se preparan por hilatura en húmedo o por extrusión de una mezcla de los primer y segundo precursores teniendo cada uno al menos un grupo funcional conocido por tener la reactividad para la reacción de acoplamiento cruzado. Se pueden utilizar aparatos de hilatura conocidos para la producción de filamentos. Se pueden hacer materiales reticulados formados de acuerdo con la presente descripción por la reacción de un primer precursor funcionalizado con el segundo precursor lo que hace que los dos precursores
20 tengan enlaces covalentes entre ellos, catalizada por un catalizador activo de paladio. En otras palabras, el método comprende la unión covalente de HA a otra molécula de HA mediante acoplamiento carbono-carbono. También en otras palabras, una variante de la reacción Sonogashira se aplicó a la reticulación de ácido hialurónico en un medio acuoso.

25 **[0013]** El problema resuelto por esta invención es la obtención de hidrogeles y microfibras a base de ácidos hialurónicos que son insolubles en agua, de un modo simple, barato y eficiente, lo que sería adecuado para su uso *in vivo*. Este problema se resuelve mediante el uso de un catalizador de paladio que puede ser eliminado después de que los precursores adecuados se sometan a reticulación. El uso de ácido hialurónico se prefiere debido a que el material obtenido es biocompatible y absorbible. Los hidrogeles obtenidos por la presente metodología poseen una estructura
30 3D y poros interconectados. Por otra parte, las microfibras reticuladas por la metodología han mostrado una gran mejora de propiedades mecánicas en comparación con las de las fibras no reticuladas. A diferencia de anteriores reticulaciones, la microfibra es insoluble en agua. Los materiales reticulados reportados en esta solicitud de patente también se pueden incorporar en aplicaciones que requieren un gel viscoelástico. Las fibras reticuladas preparadas en la presente solicitud se pueden usar para una variedad de aplicaciones quirúrgicas y cicatrización de heridas, así como
35 una parte de dispositivos médicos. Otros objetos resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción y reivindicaciones.

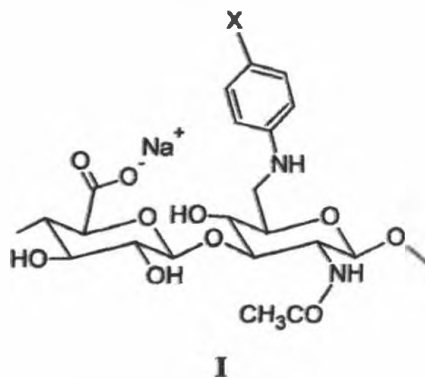
40 **[0014]** En una primera realización, la presente invención proporciona un método para reticular derivados de ácido hialurónico, lo que lleva a derivados basados en HA reticulado representados por las fórmulas (A) o (B):



5 en la que R₁ es un sustituyente alifático C₁₋₁₅ que puede ser en ambos derivados el mismo o diferente. Un ejemplo no limitante de R₁ es metileno o etileno.

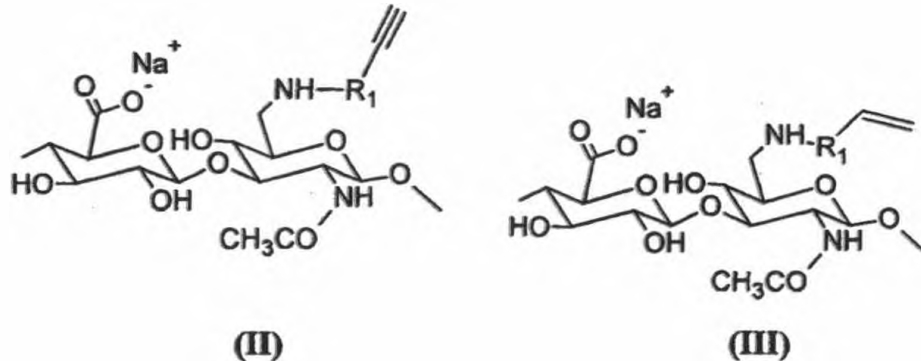
[0015] Además, la invención se refiere al proceso de preparación de los derivados para la reacción de reticulación, que comprende las etapas de:

- 10 i) Preparación de un derivado de hialuronano amina secundaria que lleva un sustituyente arilo terminal, también llamada el primer precursor, de acuerdo con la fórmula (I):



15 en la que X es un halógeno o un grupo funcional borato. Un ejemplo no limitante de X es -I, -Br o B-(OH)₃. En otras palabras, la etapa i) comprende preferiblemente las etapas de a) oxidación de ácido hialurónico en la posición C-6, y b) acoplamiento de una amina aromática primaria que lleva un sustituto terminal, que puede ser preferiblemente bromuro, yodo o grupo terminal que contiene boro, para obtener componentes del tipo (I). Las aminas primarias son aromáticas del tipo de anilinas p-sustituidas para obtener derivados del tipo (I), que son sustratos para la reacción de acoplamiento cruzado que se describe en la etapa iii) más adelante, de modo que, el uso de yodo (Ia), bromo (Ib), o boratos (Ic) como un grupo terminal en el ácido hialurónico modificado químicamente proporcionan componentes que pueden permitir una modulación eficaz de la reacción de acoplamiento cruzado. Por lo que sabemos, el *para*-sustituyente del anillo aromático afecta y puede cambiar la etapa de adición oxidativa del ciclo catalítico (Esquema 1 anterior). En otras palabras, el primer componente (I) puede cambiar la cinética de reticulación, de modo que la gelificación puede variar con respecto a la velocidad, tiempo, temperatura, rendimiento, y puede aumentar el alcance de la reacción de acoplamiento cruzado. Estas características favorables se atribuyen generalmente a la capacidad de grupo saliente de sustituyente unido en la posición *para* del arilo sustituido -X, que se cree que controla la velocidad de reticulación del primer precursor (I) con el segundo precursor del tipo II o III.

[0016] La etapa ii) es la preparación de un derivado de hialuronano amina secundaria que lleva un compuesto insaturado que contiene enlaces triples o dobles, también llamado un segundo precursor, de la fórmula (II) o (III):



en donde R₁ se especifica anteriormente. La modificación química del ácido hialurónico en la etapa ii) comprende preferiblemente las etapas de a) oxidación de ácido hialurónico en la posición C-6 y b) unir una amina primaria alifática en el esqueleto de polisacárido, que lleva un grupo insaturado terminal que puede ser alquino (II) o alqueno (III), por ejemplo, propargil amina o butinil amina (II) o grupos alquenilo tales como alilamina para (III), mientras que los alquinos (II) son por lo general más reactivos que los alquenos (III). La velocidad de reticulación y las propiedades finales del material se pueden adaptar por la reactividad de los segundos precursores II o III.

[0017] La etapa adicional, etapa iii) implica un acoplamiento catalizado por "catalizador activo de paladio" de alquinos (II) o alquenos (III) terminales con arilo, haluros de vinilo o boranos del derivado de (I) para reticular mediante formación de enlaces carbono-carbono. Esta reacción se puede llamar también una reacción de acoplamiento cruzado. Por lo tanto, la etapa iii) consiste en mezclar el derivado de la fórmula (I) con el derivado de la fórmula II (o III), y el catalizador activo de paladio para llevar a cabo el acoplamiento cruzado del ácido hialurónico. El producto reticulado se caracteriza por las formulas representadas en los esquemas anteriores A o B. El acoplamiento cruzado es definido un tanto arbitrariamente por la ecuación mostrada en el Esquema 2, donde R₁ y R₂ son derivados de HA con grupos arilo o vinilo y X es un átomo de halógeno o un grupo saliente heteroátomo relacionado. Los metales (M) se definen como todos los elementos excepto H, C, y elementos de Grupos 15-18.



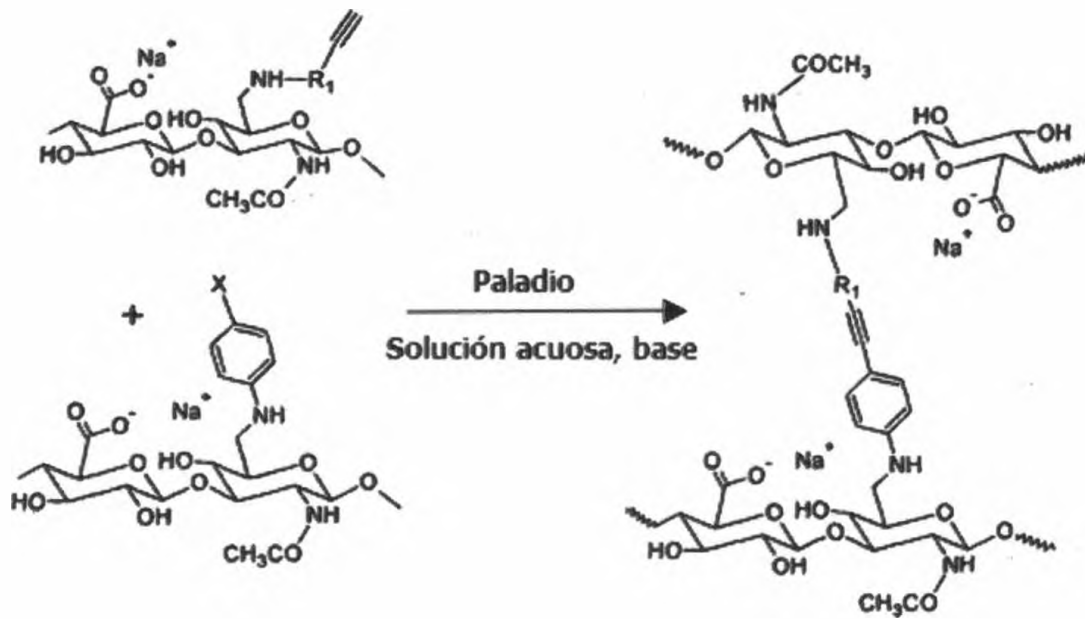
[0018] En este caso, se debe hacer una distinción entre el acoplamiento cruzado y homo-acoplamiento. Esas reacciones que dan sobre todo mezclas estadísticas o aleatorias de R₁R₂, R₁R₁, y R₂R₂ probablemente deberían ser excluidas de acoplamiento cruzado.

[0019] Como se describe aquí, la reacción puede implicar o no el uso de una cantidad catalítica de sales de Cu (I), y por lo general se considera como una reacción de acoplamiento cruzado. La reacción de acoplamiento cruzado como se describe en el Esquema 2 y caracterizada por el ciclo catalítico descrito en el Esquema 1 se aplica en la etapa iii) para la obtención de materiales reticulados. El acoplamiento cruzado implica la reacción entre un haluro terminal y/o aril-borato y un grupo insaturado, tal como derivado de alquenilo o alquinilo catalizada por un catalizador activo de paladio, que puede ser preferiblemente un complejo de acetato de paladio (II) y una base inorgánica u orgánica, o un complejo de paladio (II) y 2-amino-4,6-dihidroxipirimidina, mientras que la concentración del catalizador activo de paladio en la mezcla de reacción puede estar dentro del intervalo de 1x10⁻⁵ a 1x10⁻³ M. Se descubrió que para la preparación de un derivado de HA reticulado en forma de un hidrogel, se prefiere usar como el catalizador activo de paladio el complejo de acetato de paladio (II) y una base inorgánica u orgánica, tal como DABCO, TEMED, TEA, fosfatos secundarios tal como K₂HPO₄, carbonatos, tales como CsCO₃, más preferiblemente TEMED o DABCO, mientras que la concentración preferida de dicho catalizador activo de paladio en la mezcla de reacción está en el intervalo de 1x10⁻⁴ a 1x10⁻³ M, preferiblemente 5x10⁻⁴.

[0020] Para la preparación de un derivado de HA reticulado en forma de microfibras, el derivado de la fórmula (I) se mezcla con el derivado de la fórmula (II) o (III) y la mezcla se extruye en un baño de coagulación, y luego las microfibras se transfieren al baño de reticulación que contiene un catalizador activo de paladio. Se descubrió que el catalizador activo de paladio preferido para la reticulación de microfibras es un complejo de paladio (II) y 2-amino-4,6-dihidroxipirimidina y la concentración preferida del mismo en el baño de reticulación está dentro del rango de 1x10⁻⁵ a 1x10⁻⁴ M, preferiblemente 5x10⁻⁵. El baño de coagulación puede consistir en una mezcla de un alcohol y un ácido orgánico, mientras que, sin embargo, se puede utilizar cualquier baño de coagulación adecuado para la producción de microfibras a base de HA, y el baño de reticulación consiste en una mezcla de un alcohol, por ejemplo, metanol, etanol o isopropanol, y ácido láctico y el catalizador activo de paladio. La composición preferida del baño de reticulación es ácido láctico e isopropanol dentro de la relación de 1:1 a 1:5, preferiblemente 1:4.

[0021] Para llevar a cabo la reacción de acoplamiento cruzado, el polímero debe tener al menos un grupo saliente (halogenuro, grupo que contiene boro) y una fracción insaturada (alqueno o alquino) por macromolécula.

5 [0022] La reacción de acoplamiento cruzado se representa gráficamente en el Esquema 3 para el caso de los alquinos, Esquema 4 para alquenos.

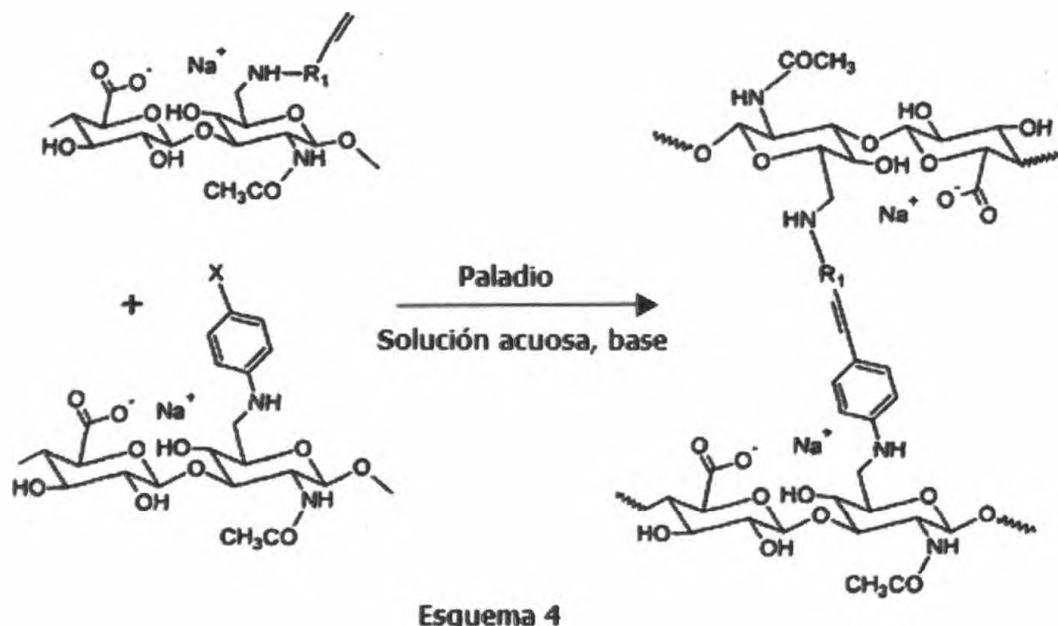


Esquema 3

10

15

20



BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

5

[0023]

La Figura 1 muestra los espectros de ^1H RMN del producto Ib tal como se describe en el Ejemplo 2.

La Figura 2 muestra los espectros de ^1H RMN del producto IIb tal como se describe en el Ejemplo 5.

10

La Figura 3 representa una microestructura SEM del material reticulado descrito en el ejemplo 8 (utilizando TEMED).

Figura 4 (a) muestra el punto de gelificación determinado a (25°C) y la Figura 4 (b) muestra el punto de gelificación determinado a 60 ° C para la reticulación de derivados y Ila, tal como se describe en el Ejemplo 8, en el que se utiliza TEMED como base.

15

La Figura 5 representa una microestructura SEM del material reticulado descrito en el ejemplo 12, en el que la reacción se llevó a cabo utilizando tampón K_2HPO_4 .

La Figura 6 representa una microestructura SEM de material reticulado descrito en el ejemplo 10, en el que se emplea DABCO como base.

20

Figura 7 muestra la microestructura de microfibras preparada con los derivados descritos en el ejemplo 2 y el ejemplo 4, en donde la concentración de ambos derivados es 12%. La figura 7a muestra la microestructura de la fibra antes de la reacción de acoplamiento cruzado y la Figura 7b muestra la microestructura después del acoplamiento cruzado.

25

La Figura 8 muestra la microestructura de microfibras preparada de los derivados descritos en el ejemplo 2 y el ejemplo 4, en donde la concentración de ambos derivados es 14%. La figura 8a muestra la microestructura de la fibra antes del acoplamiento cruzado y la Figura 8b muestra la microestructura después del acoplamiento cruzado.

30

La Figura 9 muestra la microestructura de microfibras preparada de los derivados descritos en el ejemplo 2 y el ejemplo 4, en donde la concentración de ambos derivados es 15%. La figura 9a muestra la microestructura de la fibra antes del acoplamiento cruzado y la figura 9b muestra la microestructura después del acoplamiento cruzado.

35

La Figura 10 representa el grado de hinchamiento en función del tiempo de las fibras preparadas en los Ejemplos 16, 17 y 18 después de inmersión en PBS. El diámetro medio se midió como una función del tiempo determinado por un microscopio óptico.

La figura 11 es la representación gráfica de la biocompatibilidad ensayada de las microfibras preparadas en el ejemplo 17.

La Figura 12 muestra la resistencia a la tracción de las microfibras preparadas en el ejemplo 18.

DEFINICIONES

40

[0024] En esta descripción, se utilizan ciertas expresiones con bastante frecuencia, ya que se refieren a importantes aspectos técnicos de características o realizaciones. Para algunas de estas expresiones, deben utilizarse las siguientes definiciones a menos que el contexto específico en el que se utilizan requiera una interpretación diferente.

[0025] En la presente memoria, el ácido hialurónico se refiere tanto al polisacárido en su forma de un ácido policarboxílico como a sus sales, tales como sal de sodio, potasio, magnesio y calcio y puede tener un peso molecular promedio en peso que varía de 50.000 a 3.000.000 Da.

5 **[0026]** Como se usa en este documento, el grado de sustitución, en caso de un esqueleto de polisacárido, se define como las fracciones reactivas por cada 100 dímeros de sacáridos (en este caso el polisacárido es ácido hialurónico), es decir, que representa el número de dímeros que se modificaron químicamente.

10 **[0027]** Como se usa en este documento, un material reticulado es una red polimérica tridimensional hecha por reticulación química de uno o más polímeros hidrófilos. Este derivado es capaz de hincharse, pero no se disuelve en contacto con agua.

15 **[0028]** Como se usa en este documento, una microfibrilla o fibra es un componente que tiene un eje o geometría axial longitudinal evidente, y tiene además al menos una dimensión espacial que es menor que unos 1000 μm (es decir, 1 mm), opcionalmente menos de o igual a unos 100 μm (es decir, 100 000 nm). El término "micro-tamaño" o "de tamaño micrómetro" como se usa en el presente documento se entiende generalmente por los expertos en la técnica en el sentido de menos de unos 500 μm (es decir, 0,5 mm).

20 **[0029]** Como se describe aquí, catalizador activo de paladio es un complejo de paladio (II) y una base o un complejo de paladio (II) y 2-amino-4, 6-dihidroxipirimidina que se utiliza para catalizar la reacción de acoplamiento cruzado y permite el almacenamiento de una solución de paladio. La reacción puede o no requerir que se lleve a cabo bajo atmósfera inerte.

25 **[0030]** Las bases que pueden usarse para la reacción de acoplamiento cruzado incluyen bases orgánicas o inorgánicas, por ejemplo, DABCO (1, 4-diazabicyclo [2.2.2] octano), TEMED o TMEDA (N, N, N', N'-tetrametil-etano-1,2-diamina), TEA (triethylamina), fosfatos secundarios tales como K_2HPO_4 , carbonatos tales como CsCO_3 , etc.

30 **[0031]** Como se ha descrito antes, la modificación química del ácido hialurónico se llevó a cabo por "oxidación y aminación reductora" para obtener derivados de los tipos I, II o III. Además, la modificación química puede variar desde 8 hasta 15%, dependiendo de las condiciones de reacción. Por ejemplo, la Figura 1 muestra los espectros de ^1H RMN de HA químicamente modificado del tipo Ib caracterizado por DS de 6%. La Figura 2 muestra los espectros de ^1H RMN de HA químicamente modificado del tipo II y DS de 12%. Las fracciones reactivas de acoplamiento cruzado se conectan al esqueleto polimérico por un enlazador que comprende un enlace amina secundaria estable; como se utiliza aquí, una amina secundaria está representada por la fórmula $-\text{C}-\text{NH}-\text{R}$, en donde R significa cualquier cadena de carbono. La gelificación se controló mediante la medición de los datos viscoelásticos dinámicos recogidos durante el transcurso de la reacción de reticulación. La evolución del sistema a un sólido viscoelástico se reveló claramente, como se muestra en la Figura 4 A para la reticulación a 25°C y B a 60°C, respectivamente.

35 Los componentes poliméricos se mezclaron primero en un vial. El catalizador de paladio (II) y la base se añadieron a la solución polimérica y se agitaron fuertemente. La solución se transfirió rápidamente al reómetro y se determinó la gelificación *in situ*. Las mediciones reométricas se realizaron con el fin de evaluar la cinética de reacción (tiempo necesario para la reticulación/gelificación) y para demostrar que se produce la reticulación/gelificación. Durante la reacción de reticulación se aplicaron movimientos oscilatorios de barrido a una frecuencia de 5 Hz. Los resultados típicos para el experimento se muestran en las figuras 4A y B. El objetivo de las mediciones reológicas fue caracterizar el curso del proceso de reticulación catalizada por paladio de los geles basados en HA en términos de "puntos de gel", es decir, el tiempo en el que $G^* = G^{**}$, en el que G^* se define como el módulo de almacenamiento o módulo de elasticidad y G^{**} se define como el módulo de pérdida. Si las curvas de G^* y G^{**} en función del tiempo se cruzan (es decir, $G^* = G^{**}$), eso significa que el material sufre gelificación. Los resultados indican que, para los dos geles, el proceso de reticulación se caracteriza por un tiempo relativamente corto de 660 s en que se llevó a cabo la gelificación a 60°C (Figura 4B), que se prolonga a 4000 s, donde la gelificación se llevó a cabo a 25°C (Figura 4A). Las figuras 3, 5 y 6 muestran la microestructura del material reticulado (andamiaje seco). Se descubrió que DABCO, identificado químicamente como 1, 4-diazabicyclo octano [2.2.2], era un ligando eficaz para la reacción de Sonogashira. Así, 1, 4-diazabicyclo [2.2.2] octano (Figura 6) había producido porosidad uniforme y menor tamaño de poros en comparación con tetrametiletildiamina (TMEDA o TEMED) (Figura 3). Se estudió también la estructura de las muestras reticuladas utilizando K_2HPO_4 como base (Figura 5), en la que se prefiere el uso de K_2HPO_4 debido a la no toxicidad de la base. De acuerdo con la micrografía SEM, es evidente que la base juega un papel crucial durante la reticulación de HA. Las condiciones de reacción tienen un fuerte efecto sobre la microestructura del hidrogel. La porosidad de los andamiajes se determinó como de 300 a 900 μm .

60 **[0032]** La reacción de reticulación como se describe en la etapa iii), también se puede aplicar a la formación de microfibras que son insolubles en agua. Las microfibras compuestas de derivados (I) y (III) o (II) se caracterizan por un diámetro de 100 a 250 μm y una sección transversal redonda y se han producido por hilatura en húmedo; después estas microfibras fueron sometidas a reticulación catalizada por acetato de paladio (II) o catalizador activo de paladio. El proceso para la preparación de microfibras y reticulación comprende las siguientes etapas: a) El derivado del tipo de (II) o (III) se mezcla junto con el derivado del tipo (I), se disuelve en agua o tampones fosfato formando una mezcla física simple. Se prepararon soluciones poliméricas consistentes de los componentes (I + III) o (II + III) a partir de 1 a 15% en peso de HA modificado sólido, dependiendo del uso final de la reacción, en la que se prefiere composición de 1

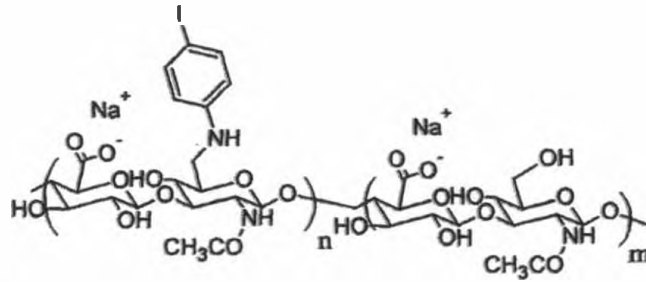
a 5% para hidrogeles (Ejemplos 7 a 15) y se prefiere 12 a 15% para microfibras (Ejemplos 16-18). La concentración específica de los componentes utilizados como se describe aquí para la reticulación de microfibras ha producido fibras con mayor resistencia a la tracción. b) la mezcla física de los derivados en concentraciones como se describe en los Ejemplos 16-18 para la obtención de microfibras reticuladas se prepararon al menos 24 horas antes del hilado. c) Las fibras se prepararon mediante un proceso de hilado húmedo; d) después de eso, la fibra se secó y e) se transfirió a un segundo baño (baño de reticulación) en el que la fibra se reticuló por acoplamiento cruzado durante 2 horas, utilizando una temperatura alta dentro del intervalo de 40 a 80°C, preferiblemente 60°C. f) La fibra se lavo de componentes, usando mezclas de isopropanol-agua y se secó de nuevo durante 24 horas. Las figuras 7, 8 y 9 muestran micrografías obtenidas por el microscopio electrónico de barrido (SEM) de microfibras variando su composición. Las Partes A y B de las figuras 7, 8 y 9 (parte superior) muestran siempre la fractura de la fibra obtenida para ilustrar la homogeneidad obtenida después del proceso de hilatura; p.ej. la Figura 7 (A) muestra la vista en sección de la fibra (fractura) antes de la reticulación, (B) después de la reticulación. En la parte inferior, se muestra la vista longitudinal de la superficie de la fibra antes (C) y después de la reticulación (D). Las microfibras se prepararon usando una composición de aproximadamente 12, 14 y 15% en peso. Se determinó el diámetro medio de los filamentos para cada velocidad de hilado con el microscopio electrónico de barrido a partir de al menos cuatro mediciones diferentes llevadas a cabo en varios lugares a lo largo de la misma fibra. Se descubrió que la composición ha influido en el diámetro de las fibras. La Figura 7 (C) muestra que el diámetro de la microfibra obtenida a partir de 12% en peso presentaba un diámetro medio de 147.3 μm antes de la reticulación y 128 μm después de la reticulación (D). La Figura 8 (C) demostró que la fibra obtenida a partir de 14% en peso, presentaba un diámetro de 223,4 μm antes de la reticulación y después de la reticulación el diámetro de nuevo había disminuido a 151,6 μm (figura 8 (D)). La Figura 9 (C) muestra que la microfibra obtenida mediante el uso de 15% en peso había reducido el diámetro de 217,1 a 153,2 μm . Sin embargo, esta composición revela una relación de hinchamiento constante después de 300 s (Figura 10). Las fibras son capaces de hincharse en contacto con agua y medio fisiológico sin disolver. Se utilizó microscopía óptica para determinar el aumento del diámetro del material después del contacto con PBS. La Figura 10 muestra el grado de hinchamiento de las fibras preparadas en los Ejemplos 16-18. Por otra parte, la biocompatibilidad de las microfibras se caracterizó antes y después de la reticulación. Las microfibras se esterilizaron y se colocaron en una placa de 12 pocillos a una concentración de 1,8 y 3,6 $\mu\text{g/ml}$, para ensayar la compatibilidad por un contacto directo de las células con las fibras. El ensayo se realizó antes y después de la reacción de reticulación por triplicado. La Figura 11 demuestra que las microfibras son citocompatibles después del ensayo con fibroblastos NIH-3T3. Además, las microfibras estaban libres de paladio después del lavado, lo que las hace adecuadas para aplicaciones *in vivo*. La Figura 12 muestra la resistencia a la tracción de la composición que informó de la resistencia a la tracción más alta (15% en peso). La tensión se determinó en una máquina de tensión de tracción Universal (Instron). La resistencia a la tracción se obtuvo antes y después de la reticulación. En otras palabras, la resistencia a la tracción es una medida de la tensión que se requiere para estirar la fibra hasta que la fibra rompe. En primer lugar, la fibra se extiende aplicando la fuerza (carga) de 0,05 N utilizando una velocidad inicial de 1 mm/min y luego se somete a la tensión de tracción a una velocidad de 10 mm/min hasta que se rompe. Para cada tipo de muestra, como mínimo se llevaron a cabo cuatro ensayos y los datos fueron analizados estadísticamente. A partir de los datos experimentales, se descubrió que la mejor composición se obtuvo por una mezcla física de los componentes en 15% en peso. Se determinó el valor de la resistencia a la tracción de estas fibras y se muestra en las Tablas 1 y 2. La medición se realizó antes de la reticulación y después de la reticulación. Como se muestra en la Tabla 1, la fibra presentó un valor de resistencia a la tracción de $51,05 \pm 3,5$ MPa, mientras que la misma composición después de reticulación presentó más del doble de resistencia a la tracción, en este caso $114,63 \pm 4,23$ MPa (Tabla 2).

EJEMPLOS

[0033] Estos ejemplos son meramente para efectos ilustrativos solamente y no se quiere decir que sean limitativos del alcance de las reivindicaciones. Todas las partes, porcentajes, relaciones, etc en los ejemplos son en peso, a menos que se indique lo contrario.

Ejemplo 1. Preparación de componente conteniendo yodo como el grupo terminal (Ia)

[0034] 10 g de hialuronano con un peso molecular medio de 498 kDa, que corresponde a 0,025 mmol de unidad monomérica de HA se solubilizaron en 1000 ml de agua destilada a temperatura ambiente. Se añadieron 2,57 g de NaBr y 38,84 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ a la mezcla. El pH de la reacción se ajustó a 9,0 por adición de NaOH 0,1 M. La reacción se enfrió a 5°C y se evacuó y se relleno con nitrógeno. Se añadieron 53,3 mg de 4-acetamido-TEMPO, seguido de la adición de 3 ml de hipoclorito de sodio. La reacción de oxidación se llevó a cabo durante 15 minutos. El pH de la mezcla de reacción se ajustó a 7,0 por adición de ácido acético. Entonces, se añadieron a la mezcla 1,159 g de *p*-yodo-anilina. La reacción se dejó durante 5 h a temperatura ambiente. Finalmente, se añadió 0,566 g de borano picolina a la reacción y la reacción se agitó durante la noche. La solución se diluyó con 1000 ml de agua y se ultrafiltró utilizando un cassette Centramate (Paal Co) con un punto de corte molecular de 10 kDa. El producto se precipitó con IPA y se lavó tres veces con IPA: agua (100: 0, 80:20, y 60:40) y se secó en el horno a 60°C. El producto de reacción fue totalmente caracterizado por metodologías analíticas. Rendimiento de la reacción: 90%. Peso molecular medido por la SEC-MALLS reportó un valor de 556 kDa y polidispersidad de 1,59. Grado de sustitución (DS) = 6% RMN ^1H (500 MHz, NaOD, δ ppm): 2,02 (s, 3H, -NHCO-CH₃), 3,35-3,84 (m, 14H), 4,46 (d, 2H), 6,68 (d, 2H, J = 8,35), 7,56 (d, 2H, J = 8,35).



DS= (n+m) =100%; n=4-8%

5 **Ejemplo 2. Preparación de compuesto conteniendo bromo como el grupo terminal (Ib)**

10 **[0035]** 10 g de hialuronano con un peso molecular medio de 498 kDa (0,025 mmol) se solubilizaron en 1000 ml de agua destilada a temperatura ambiente. Se añadieron 2,57 g de NaBr y 38,84 g de Na₂HPO₄·12 H₂O a la mezcla. El pH de la reacción se ajustó a 9,0 por adición de NaOH 0,1 M. La reacción se enfrió a 5°C y se evacuó y se rellenó con nitrógeno. Se añadieron 53,3 mg de 4-acetamido-TEMPO, seguido de la adición de 3 ml de hipoclorito de sodio. La reacción de oxidación se llevó a cabo durante 15 minutos. El pH de la mezcla de reacción se ajustó a 7,0 por adición de ácido acético. Después de eso se añadieron a la reacción 0,910 g de *p*-bromoanilina (0,2 equivalentes). La reacción se llevó a cabo durante 5 h a temperatura ambiente. Finalmente, se añadió 0,566 g de borano picolina (0,2 equivalentes) a la mezcla. La reacción se agitó durante la noche a temperatura ambiente. Después de eso la solución se diluyó con 1000 ml de agua y se sometió a ultrafiltración utilizando un cassette Centrimate con un punto de corte molecular de 10 kDa. El producto se precipitó con IPA y se lavó tres veces con IPA: agua (100: 0, 80:20, 60:40). El precipitado se seca en el horno a 60°C. A continuación, el producto de reacción se caracterizó totalmente por metodologías analíticas. Rendimiento de la reacción 10,5 g. El peso molecular medido por SEC-MALLS tiene un valor medio de 853 kDa y polidispersidad 2,01. Grado de sustitución (DS) = 6%. RMN ¹H (500 MHz, NaOD, δ ppm): 2,02 (s, 3H, -NH-CO-CH₃), 3,35-3,84 (m, 14H), 4,46 (d, 2H), 6, 80 (d, 2H, J = 8,35), 7,39 (d, 2H, J = 8,35).

15

20

Ejemplo 3. Preparación de componente que contiene borato como grupo terminal (Ic)

25 **[0036]** 1,0 g de hialuronano oxidado con el peso molecular medio de 251,2 kDa se disolvió en 100 ml de tampón de fosfatos pH 8. A esa solución se añadieron 0,086 g de hidrocloreto de ácido aminofenilborónico. La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 5 horas. Se añadieron 0,084 g de borano picolina (0,03 equivalentes a HA-dímero). La reacción se agitó durante la noche. El producto de reacción se purificó mediante diálisis extensiva contra una solución 0,5% (p / v) de NaHCO₃ / NaCl y después de eso extensivamente contra agua. El rendimiento de la reacción fue de 1,04 g. El peso molecular del producto fue de 121,8 kDa y polidispersidad de 1,46. El grado de sustitución determinado mediante RMN es 8%. RMN ¹H (500 MHz, NaOD, δ ppm): 2,0 (s, 3H), 2,85 (m, 2H), 3,1 (m, 2H), 3,4-4,0 (m, 10H), 4,5 (d, 2H), 7,34 (m, 5H)

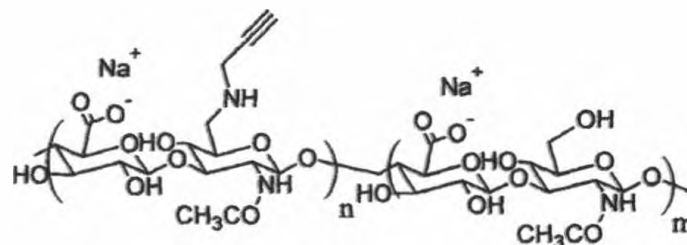
30

Ejemplo 4. Preparación de compuesto que contiene un triple enlace (propargilo) IIa

35 **[0037]** 10,0 g hialuronano oxidado con un peso molecular medio de 798 kDa se disolvieron en 960 ml de agua. Se añadieron a la mezcla de reacción clorhidrato de amina de propargilo (0,3 equivalentes a HA dímero). El pH de la reacción se ajustó mediante la adición de 1 ml de ácido acético hasta que la mezcla alcanza pH 5,5. Después de 5 horas de agitación a temperatura ambiente, se añadió 0-424 g de borano picolina (correspondiente a 0,3 eq. de dímeros de repetición de ácido hialurónico). La reacción procedió durante la noche. El producto se purificó por ultrafiltración. El producto HA propargil-modificado fue completamente caracterizado por técnicas analíticas comunes. Las señales utilizadas para la evaluación cuantitativa de las fracciones amina de propargilo unidas a HA son el metilo asignado a HA en comparación con el metileno asignado al polisacárido modificado. El peso molecular medido por SEC-MALLS tiene un valor medio de 604,4 kDa y polidispersidad 2,15 El grado de sustitución (DS) = 12% FT-IR (KBr, cm⁻¹): 3379 (ν, -OH), 2894, 2131 (ν, C = C), 1614, 1407, 1078, 613. RMN ¹H (500 MHz, NaOD, ppm δ): 2,0 (s, 3H), 2,85 (m, 2H), 3,1 (m, 2H), 3,4-4,0 (m, 10H), 4,5 (d, 2H).

40

45



DS=n=8-15%

Ejemplo 5. Preparación del compuesto conteniendo un triple enlace (butil) IIb

[0038] En general, se disolvió 10,0 g de hialuronato sódico con un peso molecular medio de 130kDa en 960 ml de agua. A esa solución se añadió 2,57 g de bromuro de sodio (2,5mmol). Se añadió 38,8 g de fosfato de sodio a la mezcla de reacción con el fin de llegar a pH = 9,0. Se añadieron los siguientes reactivos en secuencia: 53,3 mg de 4-acetamido-TEMPO previamente disuelto en agua (1 ml) y posteriormente 3.0 ml de hipoclorito de sodio. La mezcla se dejó bajo agitación durante 5 horas. Se permitió a la reacción alcanzar la temperatura ambiente. En este momento, se ajustó el pH potenciométricamente con adición de ácido acético hasta alcanzar pH = 5,5. A esta mezcla se añadió n-butinilo-amina (0,3 mmol). La aminación reductora se llevó a cabo durante 5 horas. Después de eso, se añadió 0,424 g de borano picolina (correspondiente a 0,3 eq. de dímeros de repetición de ácido hialurónico). La reacción se dejó proceder a temperatura ambiente durante la noche. El producto se purificó mediante ultrafiltración. El producto de HA propargil-modificado fue completamente caracterizado por técnicas analíticas comunes. Las señales utilizadas para la evaluación cuantitativa de fracciones de amina de propargilo ligadas a HA son el metilo asignado a HA en comparación con el metileno asignado al polisacárido modificado. El peso molecular medido por SEC-MALLS tiene un valor medio de 440,1 kDa y polidispersidad 1,57. Grado de sustitución (DS) = 12% RMN ¹H (500 MHz, δ ppm): 2,03 (3H, -N-CO-CH₃), 2,64 (2H, t J = 6,6, -NH-CH₂-CH₂-), 2,70 (1H, t; J = 6,6), 3,18 (2H t; J = 6,5, -NH-CH₂-CH₂-), 3,30-3,90 (10H, sceletal), 4,46 (2H, 1a, 1b). FT-IR (KBr, cm⁻¹): 3379 (ν, -O-H), 2894, 2131 (ν, C≡C), 1614, 1407, 1078, 613.

Ejemplo 6. Preparación de compuesto conteniendo un doble enlace (alquilo) III

[0039] En general, se disolvió 1,0 g de hialuronato sódico oxidado con un peso molecular medio de 130kDa y la polidispersidad de 1,9 (2,5 mmol) en 100 ml de agua. Se añadió alil amina, (0,285 g, 0,5 mmol) a la solución anterior. La reacción se agitó durante 5 horas a temperatura ambiente. Después, se añadieron 0,0535 g de borano picolina (0,5 mmol). La reacción procedió a temperatura ambiente durante la noche. La reacción se purificó por diálisis utilizando un tubo con 10 kDa de corte. El rendimiento de la reacción fue 0,6932 g. Los datos SEC MALLS revelaron un peso molecular de 203,05 kDa y polidispersidad de 1,574. La integración de la fracción acetamido revela un grado de sustitución -determinado por la comparación con la señal alquenilo- de 8%.

Ejemplo 7. Reacción de reticulación llevada a cabo usando TEMED y catalizador activo de paladio a 25°C

[0040] La preparación de "catalizador activo" Pd-pirimidina se describe aquí: A un matraz aforado de 10 ml se añadieron 2-amino-4,6-dihidropirimidina (13 mg, 0,10 mmol) y 2 ml de una solución madre de NaOH M 0,10. El ligando de pirimidina se disolvió completamente agitando durante 2 minutos en un baño de agua precalentado a 65°C. A la solución resultante se añadió Pd (OAc)₂ (22,4 mg, 0,1 mmol). La mezcla se agitó vigorosamente a 65°C durante 30 minutos (al aire libre) para dar una solución homogénea de color amarillo-naranja. Después de enfriar a temperatura ambiente, la barra de agitación se retiró y la solución se diluyó hasta 5,00 ml con agua destilada para dar una solución catalizadora de 0,01 M en Pd (II). Un procedimiento general para la reacción de reticulación se describe aquí: se disolvieron 10 mg del componente Ia (0,025 mmol) y 10 mg de componente IIa (0,025 mmol) en 2 ml de agua destilada. A esta solución, se añadió consecutivamente 10 µl (0,0006 mmol) de TEMED (tetrametiletildiamina (TMEDA o TEMED), y 10 µl de solución de catalizador activo de paladio. Se utilizó un mezclador enérgico después de la adición de catalizador para asegurar una buena homogeneización. La reacción se llenó con nitrógeno y se llevó durante 6 h a 25°C. El hidrogel preparado se lavó extensamente con PBS (3x100 ml) y agua destilada (3x100 ml) para eliminar el catalizador. El paladio restante se cuantificó como 215±25 ng/g de masa seca.

Ejemplo 8. Reticulación usando TEMED y acetato de paladio (II) a 25 y 60 ° C

[0041] 20 mg de componente Ia (0,5 mmol) y 20 mg de componente IIa (0,5 mmol) se disolvieron en 1 ml de agua destilada. Se añadieron a esta solución consecutivamente 10 µl (0,0006 mmol) de TEMED (tetrametiletildiamina), y 3 mg de acetato de paladio (II) (0,013 mmol). Se mezcló enérgicamente después de la adición de catalizador para asegurar una buena homogeneización. La reacción se llenó con nitrógeno y se calentó durante 6 horas a 60°C. El hidrogel se lavó extensamente con PBS (3x100 ml) y agua destilada (3x100 ml) para eliminar el catalizador. La estructura del material seco se estudió por SEM después del secado (Figura 3). El curso de la reacción de reticulación fue seguido por reología. Las medidas reológicas se realizaron en un reómetro TA con geometría de cono y placa a temperatura ambiente. Los parámetros de medición fueron τ = 10000 Pa y F = 1 s⁻¹. Soluciones de los componentes Ia y IIa se prepararon a concentraciones de 2% (p/v). Así, 2 mg de acetato de paladio (II) se incorporaron por agitación enérgica a la mezcla polimérica, seguido de 10 µl de TEMED. Después de una buena homogeneización de la mezcla, la solución preparada (500 µl) se transfirió a la célula cilíndrica del reómetro mantenido a temperatura constante 25 o 60°C, respectivamente (Figuras 4A y 4B).

Ejemplo 9. Reticulación mediante el uso de CaCO₃ y catalizador activo de paladio a 60°C

[0042] 20 mg de componente Ia (0,5 mmol) y 20 mg de componente IIa (0,5 mmol) se disolvieron en 1 ml de agua destilada. A esa solución, se añadieron consecutivamente 10 mg (0,028 mmol) de carbonato de cesio y 10 µl de la solución (0,01 M) de catalizador activo de paladio preparado como se describe en el Ejemplo 6. Se empleó agitación

energica para asegurar una buena homogeneización. La reacción se llenó con nitrógeno y se agitó durante 24 horas a 60°C. El hidrogel se lavó extensamente con PBS y agua destilada con el fin de eliminar el catalizador.

Ejemplo 10. Reticulación mediante el uso de acetato de paladio (II) y DABCO a 37°C

[0043] 20 mg de componente Ia (0,5 mmol) y 20 mg de componente IIa (0,5 mmol) se disolvieron en 1 ml de agua destilada. A esta solución, se añadieron consecutivamente 10 mg (0,09 mmol) de DABCO (o 1, 4-diazabicyclo [2.2.2] octano) y 1 mg (0,004 mmol) de acetato de paladio (II) previamente disuelto en agua. Se agitó energicamente después de la adición del catalizador para asegurar una buena homogeneización. La reacción se llenó con nitrógeno y se agitó durante 24 horas a 37°C. El hidrogel preparado se lavó extensamente con PBS y agua destilada con el fin de eliminar el catalizador. La estructura del hidrogel se representa en la Figura 6.

Ejemplo 11. Reticulación usando acetato de paladio (II) y TEA a 37°C

[0044] 20 mg de componente Ia (0,5 mmol) y 20 mg de componente IIa (0,5 mmol) se disolvieron en 1 ml de agua destilada. A esa solución, se añadieron consecutivamente 10 µl (0,010 mmol) de TEA y 10 µl de una solución de acetato de paladio (II) (3% p/v) en agua. Se agitó energicamente después de la adición de cada componente para asegurar una buena homogeneización. La reacción se llenó con nitrógeno y se agitó durante 24 horas a 37°C. El hidrogel preparado se lavó extensamente con PBS y agua destilada con el fin de eliminar el catalizador.

Ejemplo 12. Reticulación usando acetato de paladio (II) y K₂HPO₄ a 60°C

[0045] 20 mg de componente Ib (0,5 mmol) y 20 mg de componente IIb (0,5 mmol) se disolvieron en 1 ml de agua destilada. A esa solución, se añadieron consecutivamente 10 mg (0,057 mmol) de K₂HPO₄ y 10 µl de una solución de acetato de paladio (II) (3% p/v) en agua. Se agitó energicamente después de la adición de catalizador para asegurar una buena homogeneización. La reacción se llenó con nitrógeno y se agitó durante 24 horas a 60°C. El hidrogel preparado se lavó extensamente con PBS y agua destilada con el fin de eliminar el catalizador. La caracterización estructural por micrografía SEM se muestra en la Figura 5.

Ejemplo 13. Reticulación usando catalizador activo de paladio y K₂HPO₄ a 60°C

[0046] Se disolvieron 20 mg de componente Ib (0,5 mmol) y 20 mg de componente IIc (0,5 mmol) en 1 ml de agua destilada. A esa solución, se añadieron consecutivamente 10 mg (0,057 mmol) de K₂HPO₄ y 10 µl de una solución de catalizador activo de paladio (0,01 M), preparado como se describe en el Ejemplo 6. Se agitó energicamente después de la adición de cada componente para asegurar una buena homogeneización. La reacción se llevó a cabo durante 5 horas a 60°C.

Ejemplo 14. Reticulación mediante el uso de acetato de paladio (II) en tampón fosfato (pH 6,0)

[0047] 20 mg de componente Ia (0,5 mmol) y 20 mg de IIa componente (0,5 mmol) se disolvieron en 2 ml de tampón de fosfatos pH; 6,0, pH. A esa solución se añadieron consecutivamente 10 mg (0,028 mmol) de TEMED y 10 mg (0,04 mmol) de acetato de paladio (II). Se agitó energicamente después de la adición de catalizador y base para asegurar una buena homogeneización. La reacción se llenó con nitrógeno y se agitó durante 24 horas a 60°C. El hidrogel preparado se lavó extensamente con PBS y agua destilada con el fin de eliminar el catalizador.

Ejemplo 15. Reticulación usando acetato de paladio (II) en tampón fosfato (pH 6,0)

[0048] 20 mg de componente Ib (0,5 mmol) y 20 mg de componente IIa (0,5 mmol) se disolvieron en 2 ml de tampón fosfatos pH; 8,0, A esta solución, se añadieron 10 mg (0,028 mmol) de TEMED y 10 mg (0,04 mmol) de acetato de paladio (II) de forma consecutiva. Se agitó energicamente después de la adición del catalizador y base para asegurar una buena homogeneización. La reacción se llenó con nitrógeno y se agitó durante 24 horas a 60°C. El hidrogel preparado se lavó extensamente con PBS y agua destilada con el fin de eliminar el catalizador.

Ejemplo 16. Reticulación de microfibras utilizando 12% (p/v) de concentración de derivados y catalizador activo de paladio a 60°C

[0049] Formación de microfibras: una mezcla física de los derivados descritos como Ib y IIa se disolvieron en agua para formar una solución acuosa de 12% en peso. La mezcla se agitó vigorosamente debido a la alta viscosidad de la suspensión (mínimo durante 24 h) antes del proceso de hilado para lograr la homogeneidad perfecta. La mezcla se transfirió a una jeringa, que se dejó abierta para permitir escapar al aire atrapado. La configuración experimental básica utilizada para la formación de fibras incluye una jeringa que contiene la solución de polímero que se mantiene usando un soporte. La jeringa se colocó en una bomba de jeringa lineal (Nexus 5000, Chemyx). La jeringa se unió a un tubo de inyección, en donde la mezcla polimérica se inyecta directamente en el baño de coagulación, de manera que las microfibras se obtuvieron utilizando un proceso de hilatura en húmedo. Los experimentos se llevan a cabo a temperatura ambiente con una velocidad media de extrusión de 260 µl/min. El baño de coagulación puede consistir por

ejemplo de un alcohol, por ejemplo, metanol o etanol, y un ácido orgánico, por ejemplo, ácido fórmico o acético, en agua. Sin embargo, no quiere decirse que la composición del baño de coagulación esté destinada a ser limitante para el alcance de la invención, ya que el objeto de la invención es reticular las fibras formadas. Por supuesto, hay también otros métodos útiles para la producción de filamentos de hialuronano tal como se describe previamente en la técnica.

La fibra resultante es forzada a salir del baño y se extiende por laminación entre dos bobinas. La fibra final es entonces deshidratada a temperatura ambiente. El proceso de secado permite gradualmente la evaporación de los componentes volátiles que fueron utilizados para la precipitación de la microfibras.

[0050] Establecimiento de condiciones de reacción para la reticulación de las microfibras: La microfibras fue transferido a un baño, en adelante denominado baño de reticulación que contiene una mezcla de isopropanol y ácido láctico en relación (8: 2). Sin embargo, la composición del baño de reticulación puede variar y puede incluir otros alcoholes y ácidos orgánicos sin afectar a la reacción de reticulación. Variando la cantidad de la solución de "catalizador activo de paladio" de 50 a 100 µl, preparada como se describe anteriormente en el ejemplo 7, las microfibras se dejaron reaccionar en el baño reticulado. La concentración final de catalizador activo de paladio utilizado en el baño de reticulación puede variar, por ejemplo, de 5×10^{-5} a 1×10^{-4} M. La reacción de reticulación se trató a tres temperaturas diferentes: a temperatura ambiente, 37°C y 60°C. Experimentalmente, se observó que la fibra se reticuló a una temperatura de 60°C. Para controlar el tiempo de reticulación, se extrajo una pieza de fibra de la reacción y se ensayó la solubilidad de la fibra en agua. En consecuencia, la reacción se dejó proceder durante 2 horas, que se descubrió ser el mejor tiempo. Después de eso, la microfibras se lavó extensamente con mezclas de isopropanol: agua y se secó de nuevo. La caracterización de la microfibras se hizo por Microscopía Electrónica de Barrido (SEM): Los andamios de microfibras se hacen girar en la parte superior del sustrato de aluminio, revestidos por pulverización iónica con oro y su morfología superficial es examinada por un Microscopio Electrónico de Barrido. Las caracterizaciones morfológicas y estructurales de las microfibras antes y después de la reticulación se obtuvieron por SEM y se muestran en la Figura 7. Los ensayos de tracción se midieron con una máquina de ensayo de tracción Instron 3343 y se analizaron utilizando software Bluehill 2.

Ejemplo 17. Reticulación de microfibras utilizando 14% (p/v) de concentración de derivados y catalizador activo de paladio a 60°C

[0051] Las fibras se prepararon usando un procedimiento similar al descrito en el ejemplo 16, sólo aumentando la concentración de los componentes a 14% en peso. Las fibras se obtuvieron mediante un proceso de hilatura en húmedo usando una velocidad de extrusión de 280 µl/min.

Ejemplo 18. Reticulación de microfibras utilizando 15% (p/v) de concentración de derivados y catalizador activo de paladio a 60°C

[0052] Las fibras se prepararon usando un procedimiento similar al descrito en el ejemplo 16, sólo aumentando la concentración de los componentes a 15% en peso. Las fibras se obtuvieron mediante un proceso de hilatura en húmedo usando una velocidad de extrusión de 300 µl/min.

[0053] La Tabla 1 a continuación representa las propiedades mecánicas de las microfibras como las descritas en el Ejemplo 18 (antes de la reticulación). La Tabla 2 representa las propiedades mecánicas de las microfibras descritas en el Ejemplo 18 (después de la reticulación).

Tabla 1

Etiqueta muestra	Carga a rotura (Cursor)	Deformación por tracción a rotura (Cursor)	Tenacidad a rotura (Cursor)	Módulo (Tangente 0,5%)	Tensión de tracción a rotura (Cursor)
	(N)	(mm/mm)	(cN/tex)	(MPa)	(MPa)
1	2,70	0,19	2,70383	>1334,425	55,08204
2	2,36	0,15	2,36366	>1462,406	48,15201
3	2,58	0,17	2,58496	>1538,254	52,66032
4	2,59	0,17	2,58656	>1429,957	52,69302
5	2,29	0,14	2,29136	>1480,453	46,67916
Media	2,51	0,17	2,50607	1449,099	51,05331
Desviación estándar	0,17190	0,01776	0,17190	75,209	3,50188
Mediana	2,58	0,17	2,58496	1462,406	52,66032
Coefficiente de Variación	6,85926	10,74236	6,85926	5,190	6,85925

Tabla 2

Etiqueta muestra	Carga a rotura (Cursor)	Deformación por tracción a rotura (Cursor)	Tenacidad a rotura (Cursor)	Módulo (Tangente 0,5%)	Tensión de tracción a rotura (Cursor)
	(N)	(mm/mm)	(cN/tex)	(MPa)	(MPa)
1	2,39	0,10	2,39025	>4872,143	118,88104
2	2,33	0,11	2,33154	>4722,472	115,96108
3	2,19	0,09	2,18782	>4720,472	108,81340
4	2,31	0,09	2,30931	>4516,462	114,85558
Media	2,30	0,10	2,30473	4707,887	114,62778
Desviación estándar	0,08509	0,00775	0,08509	146,053	4,23190
Mediana	2,32	0,10	2,32042	4721,472	115,40833

5 Ejemplo 19. Medición de la viabilidad de las células antes y después de la reacción de reticulación

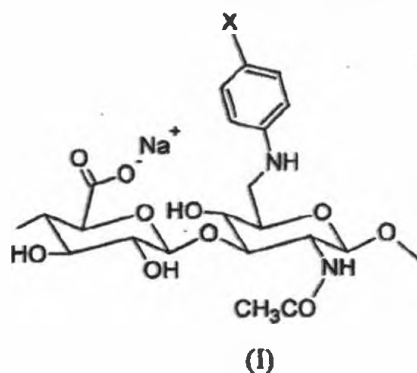
[0054] Fibras preparadas como se describe en el Ejemplo 16 se esterizaron en autoclave (120°C / 20 minutos) y posteriormente se transfirieron al medio de cultivo que consiste en EagleMedium Modificado de Dulbecco con 10% de suero fetal bovino, 5 g / l de D-glucosa, 20uM L- glutamina, 100 U / ml de penicilina y 100 µg / ml de estreptomycin. Se preparó una solución de fibras a una concentración de 3,6 mg de muestra por mL de medio de cultivo. Las fibras se suspendieron durante la noche. Esta suspensión se ensayo usando dos concentraciones diferentes: 1,8 y 3,6 mg / ml. Se ensayaron líneas celulares y viabilidad para la línea celular NIH-3T3. Las células se sembraron en placa de cultivo de 12 pocillos y se cultivaron durante 24 h antes de usar una densidad de 3000c por pocillo. Después de la incubación anterior, las células se transfirieron al medio de cultivo para tener un contacto directo con la fibra y productos disueltos. La incubación se llevó a cabo durante 24, 48 y 72 horas, respectivamente. Después de cada período de incubación, se utilizó un ensayo MTT (usando 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difenil bromuro de tetrazolio) para investigar la viabilidad celular. El ensayo se preparó como se indica; se disolvió MTT a una concentración de 5 mg/ml en medio de cultivo. Se transfirió 20 µl de la solución MTT al pocillo y se incubó durante 2,5 h. La medición de la microplaca de absorbancia se leyó usando un VersaMax a dos valores diferentes de absorbancia, en este caso 570 y 690 nm. La evidencia gráfica de la biocompatibilidad se muestra en la Figura 11.

Referencias

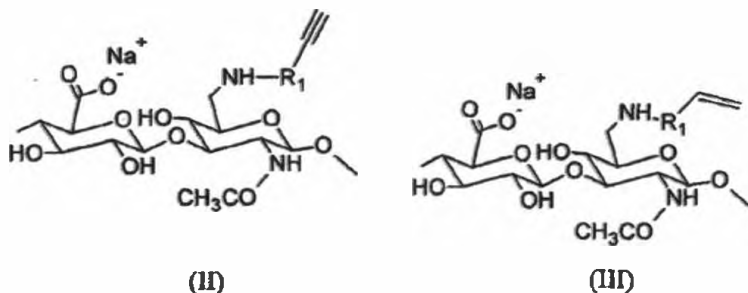
- [0055]
- Collins, M. N., & Birkinshaw, C. (2007). Comparison of the effectiveness of four different crosslinking agents with hyaluronic acid hydrogel films for tissue-culture applications. *Journal of Applied Polymer Science*, 104(5), 3183-3191.
- Matarasso, S. L., & Herwick, R. (2006). Hypersensitivity reaction to nonanimal stabilized hyaluronic acid. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 55(1), 128-131.
- Murty, K. V. S. N., & Vasella, A. (2001). Oligosaccharide Analogues of Polysaccharides, Parth21 , Towards New Cellulose I Mimics: Synthesis of Dialkynyl C-glucosides of peri-Substituted Anthraquinone. *Helvetica Chimica Acta*, 84(4), 939-963.
- Roy, R., Das, S. K., Santoyo-González, F., Hernández-Mateo, F., Dam, T. K., & Brewer, C. F. (2000). Synthesis of "Sugar-Rods" with Phytohemagglutinin Cross-Linking Properties by Using the Palladium-Catalyzed Sonogashira Reaction. *Chemistry -A European Journal*, 6(10), 1757-1762.
- Schanté, C. E., Zuber, G., Herlin, C., & Vandamme, T. F. Chemical modifications of hyaluronic acid for the synthesis of derivatives for a broad range of biomedical applications. *Carbohydrate Polymers*, 85(3), 469-489.
- Yeom, J., Bhang, S. H., Kim, B.-S., Seo, M. S., Hwang, E. J., Cho, I. H., Park, J. K., & Hahn, S. K. Effect of Cross-Linking Reagents for Hyaluronic Acid Hydrogel Dermal Fillers on Tissue Augmentation and Regeneration. *Bioconjugate Chemistry*, 21(2), 240-247.

Reivindicaciones

- 5 1. Un proceso de preparación de un derivado de hialuronano reticulado, **caracterizado porque** se lleva a cabo por una reacción de acoplamiento C-C en agua, tampón de fosfatos o una mezcla de un ácido orgánico y un alcohol, y en presencia de un catalizador activo de paladio, en el que la reacción de acoplamiento C-C tiene lugar entre un derivado de hialuronano con un grupo terminal aril-haluro y/o aril-borato, y un derivado de hialuronano que lleva un grupo alquenilo o alquinilo.
- 10 2. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** primero se prepara un derivado de hialuronano amina secundaria que lleva un terminal arilo sustituido, según la fórmula (I):



- 15 en la que X = halógeno o un grupo funcional borato, a continuación, se prepara un derivado de hialuronano amina secundaria que lleva un compuesto insaturado que contiene un triple o un doble enlace, de acuerdo con la fórmula (II) o (III):



- 20 en la que R1 es un grupo alifático C₁₋₁₅, y luego el derivado de la fórmula (I) se mezcla con el derivado de la fórmula (II) o (III), a continuación, se añade un catalizador de paladio activo estable en agua a fin de obtener el derivado de hialuronano reticulado.

- 25 3. El proceso de acuerdo con la reivindicación 2, **caracterizado porque** X es I, Br o B-(OH)₃, y R₁ es metileno o etileno.
- 30 4. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** el catalizador activo de paladio se selecciona entre el grupo que comprende un complejo de acetato de paladio (II) y una base inorgánica u orgánica, y un complejo de paladio (II) y 2-amino-4,6-dihidropirimidina, mientras que la concentración del catalizador activo de paladio en la mezcla de reacción está en el intervalo de 1x10⁻⁵ a 1x10⁻³ M.
- 35 5. El proceso de acuerdo con la reivindicación 4, **caracterizado porque** el catalizador activo de paladio es un complejo de acetato de paladio (II) y una base inorgánica u orgánica, la concentración del catalizador activo de paladio en la mezcla de reacción está en el intervalo de 1x10⁻⁴ a 1x10⁻³ M, preferiblemente 5x10⁻⁴, mientras que el derivado de hialuronano reticulado resultante está en la forma de un hidrogel.
- 40 6. El proceso de acuerdo con la reivindicación 5, **caracterizado porque** la base se selecciona del grupo que comprende DABCO, TEMED, TEA, fosfatos secundarios, tales como K₂HPO₄, carbonatos, tales como CaCO₃.
7. El proceso de acuerdo con la reivindicación 5, **caracterizado porque** la base se TEMED o DABCO.

8. El proceso de acuerdo con la reivindicación 4, **caracterizado porque** el derivado de la fórmula (I) se mezcla con el derivado de la fórmula (II) o (III) y la mezcla se extruye en un baño de coagulación con el fin de obtener microfibras de derivado de hialuronano, y luego las microfibras se transfieren al baño de reticulación que contiene un catalizador activo de paladio con el fin de obtener microfibras de derivado de hialuronano reticuladas.

5

9. El proceso de acuerdo con la reivindicación 8, **caracterizado porque** el catalizador activo de paladio es un complejo de paladio (II) y 2-amino-4,6-dihidroxipirimidina y la concentración del catalizador activo de paladio en el baño de reticulación está dentro del intervalo de 1×10^{-5} a 1×10^{-4} M, preferiblemente 5×10^{-5} .

10

10. El proceso de acuerdo con la reivindicación 8 o 9, **caracterizado porque** el baño de coagulación consiste en una mezcla de un alcohol y un ácido orgánico y el baño de reticulación consiste en una mezcla de un alcohol y ácido láctico y el catalizador activo de paladio.

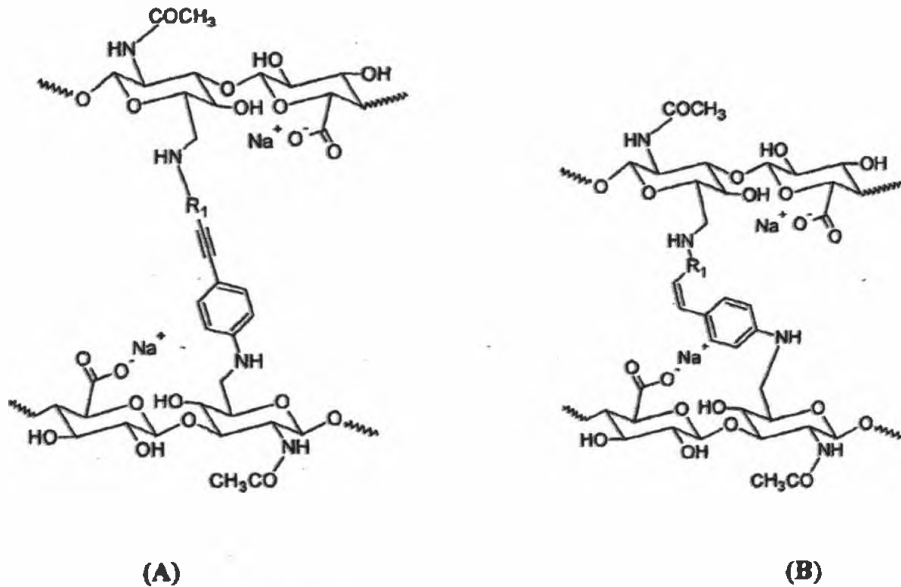
15

11. El proceso de acuerdo con la reivindicación 10, **caracterizado porque** el alcohol en el baño de reticulación se selecciona de metanol, etanol e isopropanol.

12. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** la reticulación se lleva a cabo a temperaturas de entre 25 y 100°C, preferiblemente 60°C.

20

13. Un hidrogel de acuerdo con la fórmula A o B

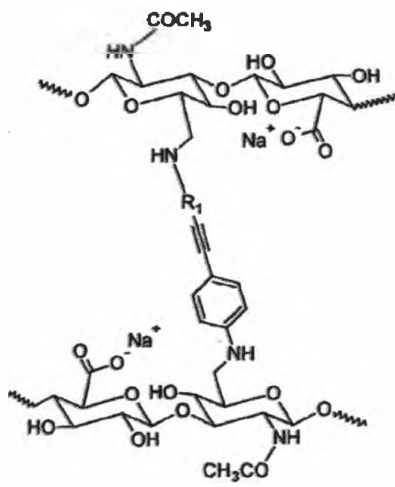


en la que R₁ es un sustituyente alifático C₁₋₁₅.

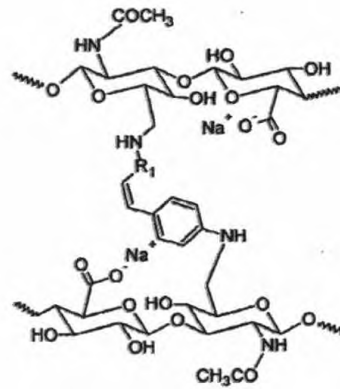
25

14. El hidrogel de acuerdo con la reivindicación 13, **caracterizado porque** R₁ es etileno o etileno.

15. Una microfibra basada en un derivado de hialuronano según la fórmula A o B



(A)



(B)

en la que R₁ es un sustituyente alifático C₁₋₁₅.

5 16. La microfibra según la reivindicación 15, **caracterizada porque** tiene el diámetro de 100 a 300 nm.

10

15

20

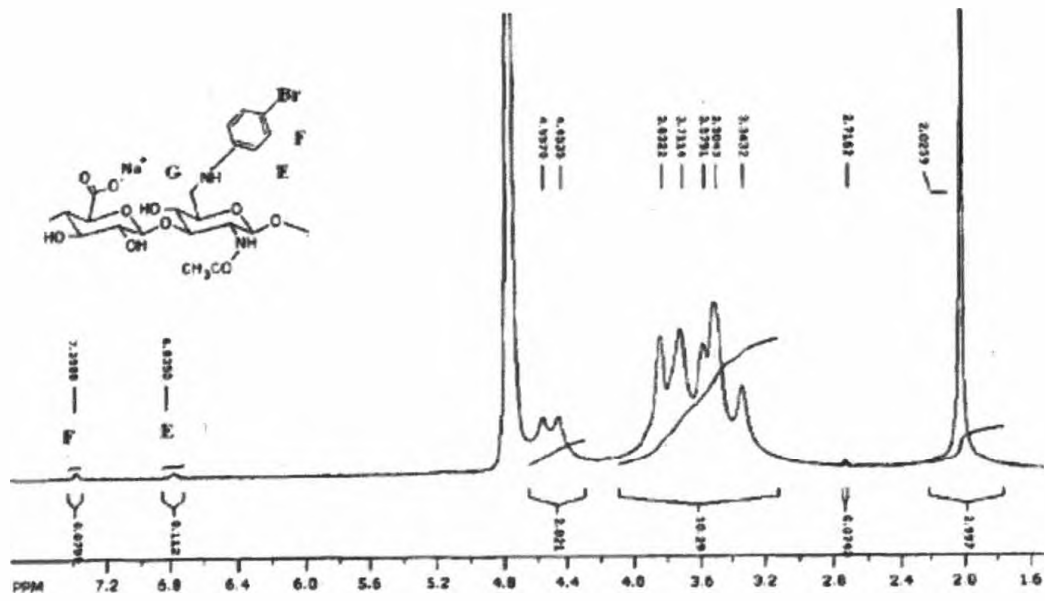


Figura 1

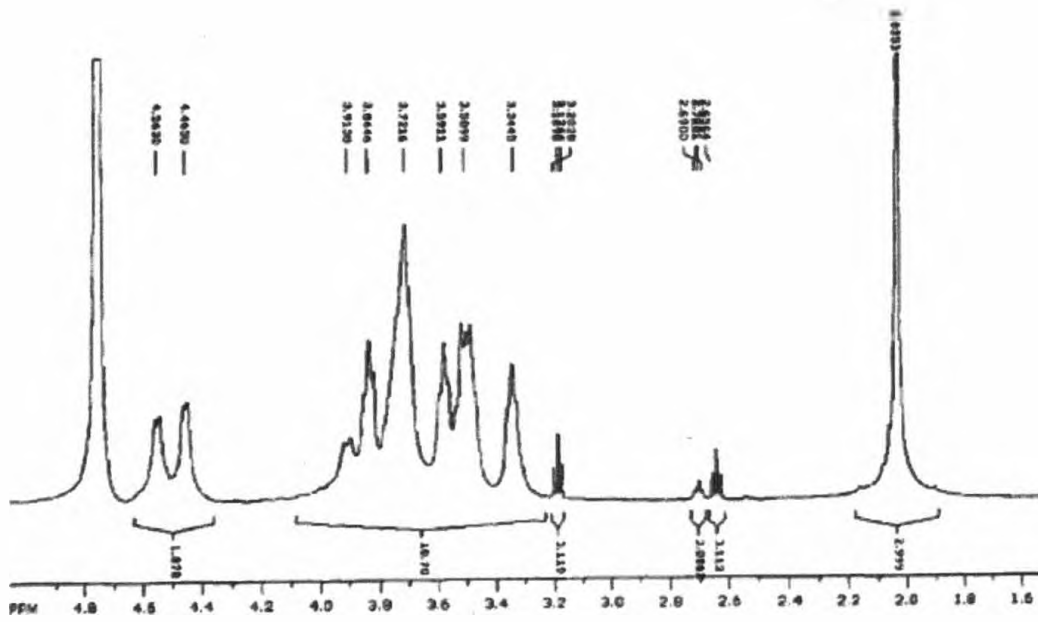


Figura 2

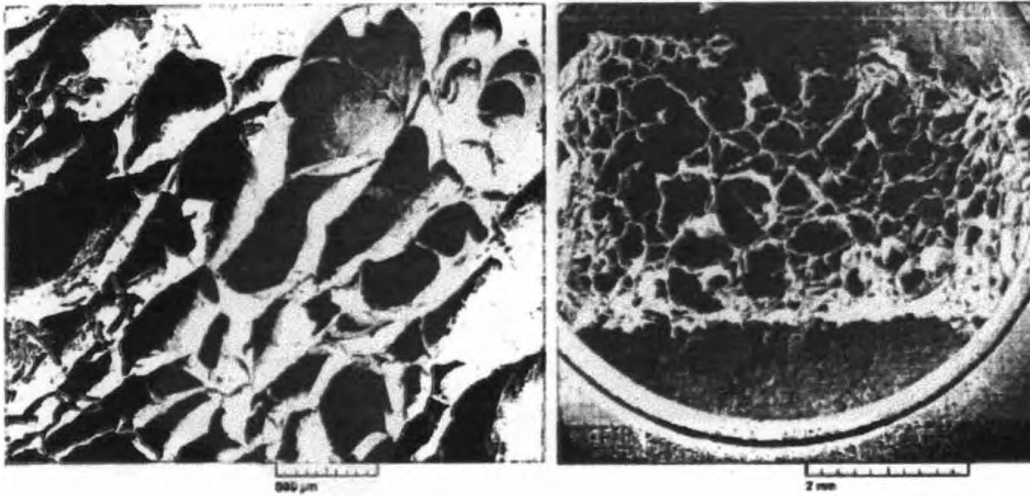


Figura 3

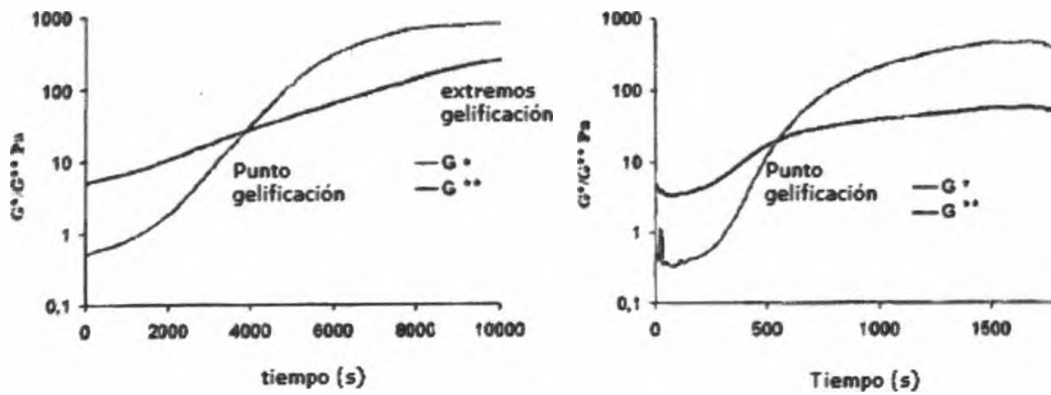


Figura 4

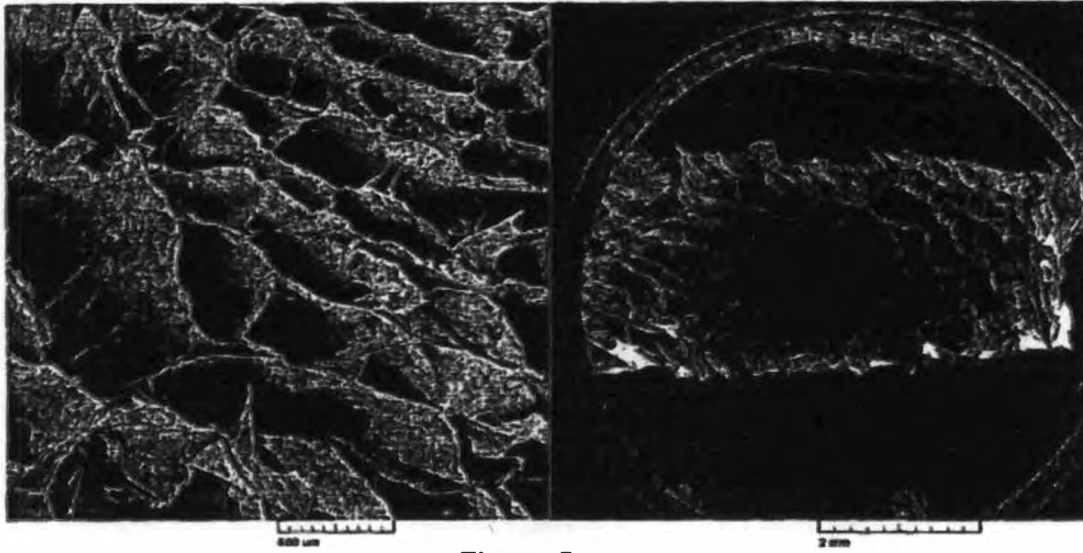


Figura 5

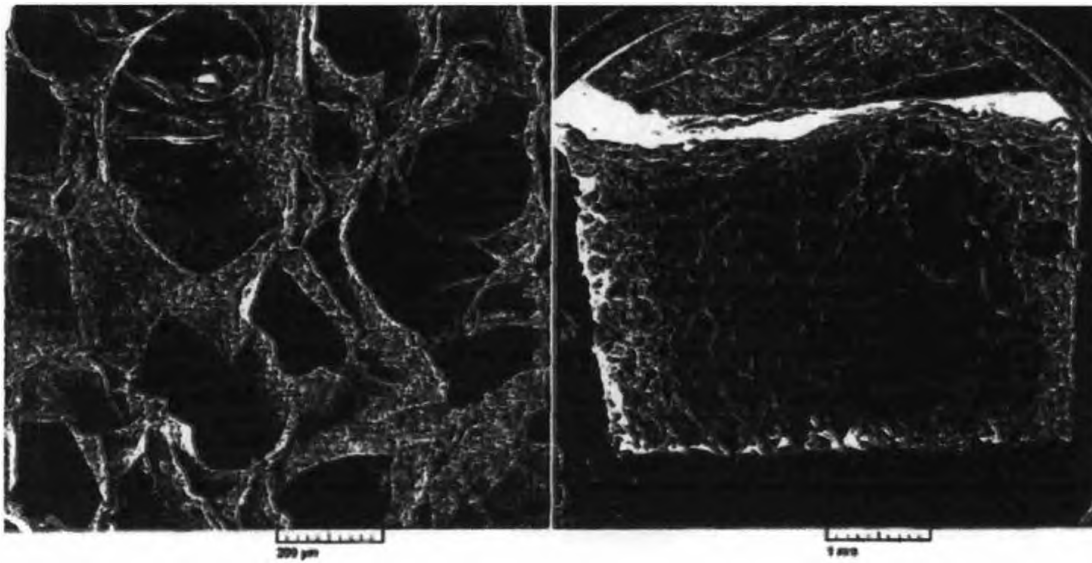


Figura 6

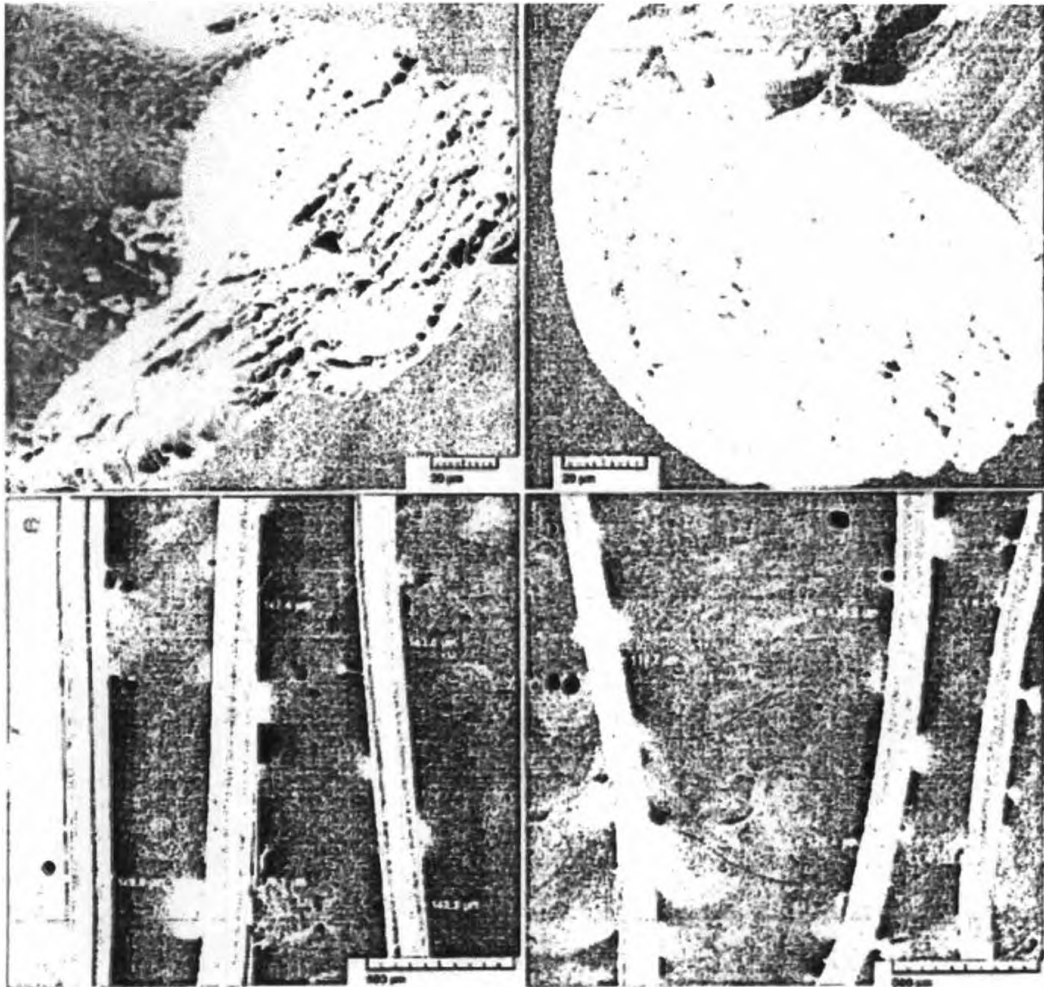


Figura 7

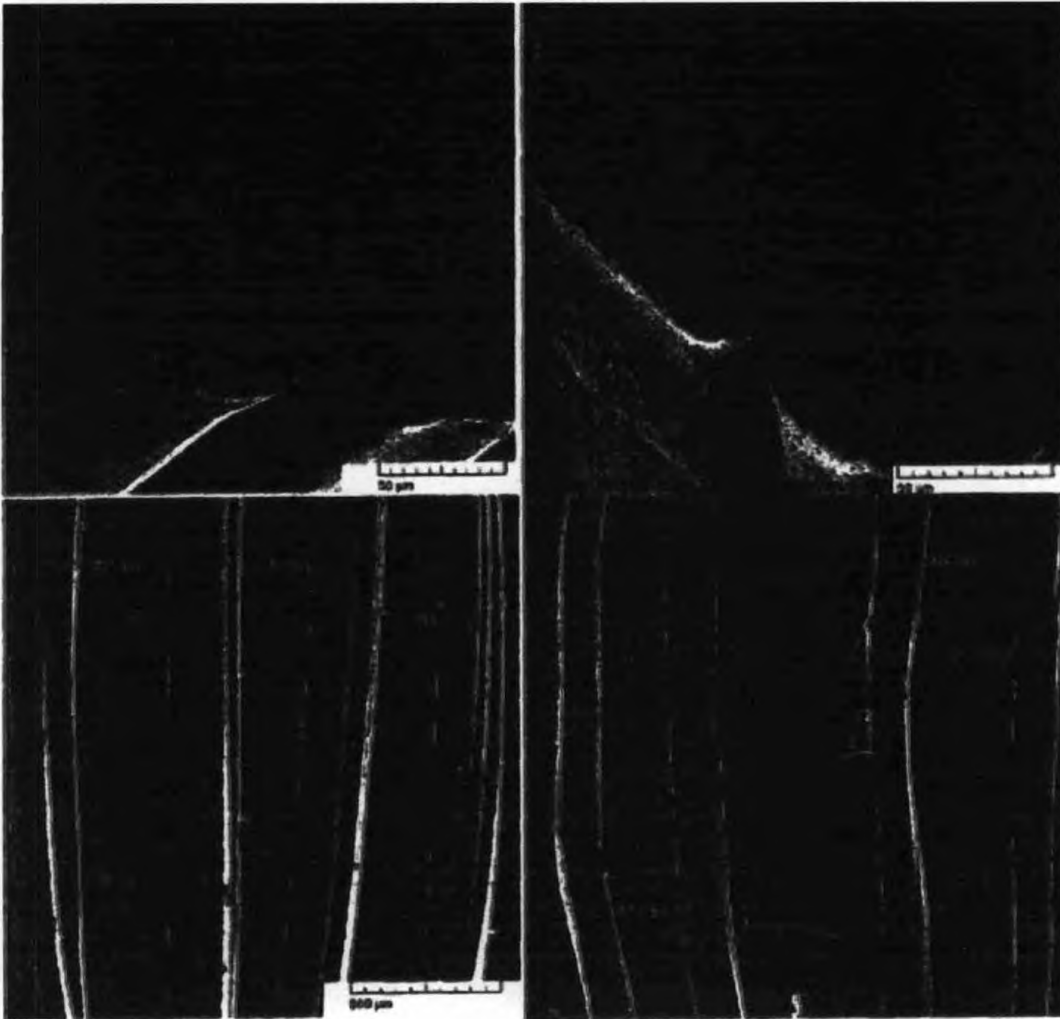


Figura 8

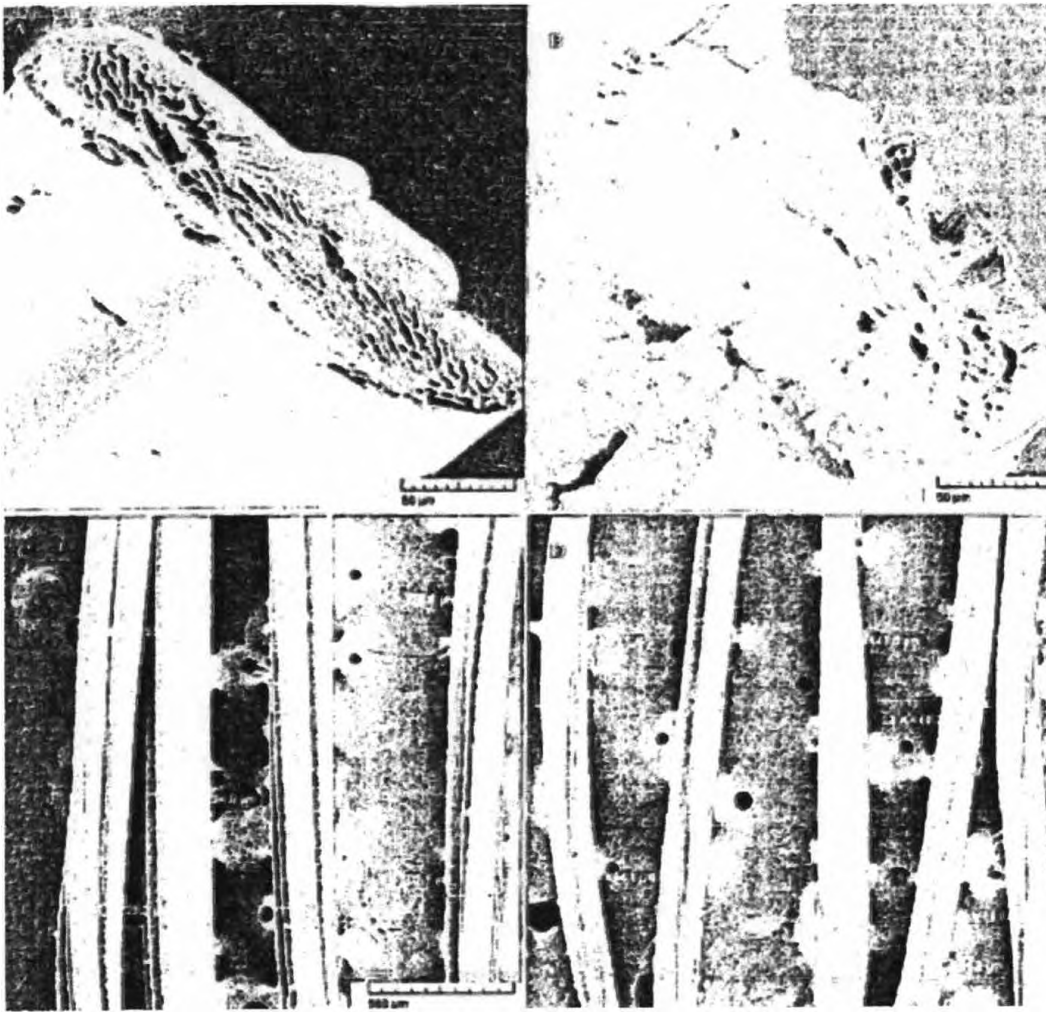


Figura 9

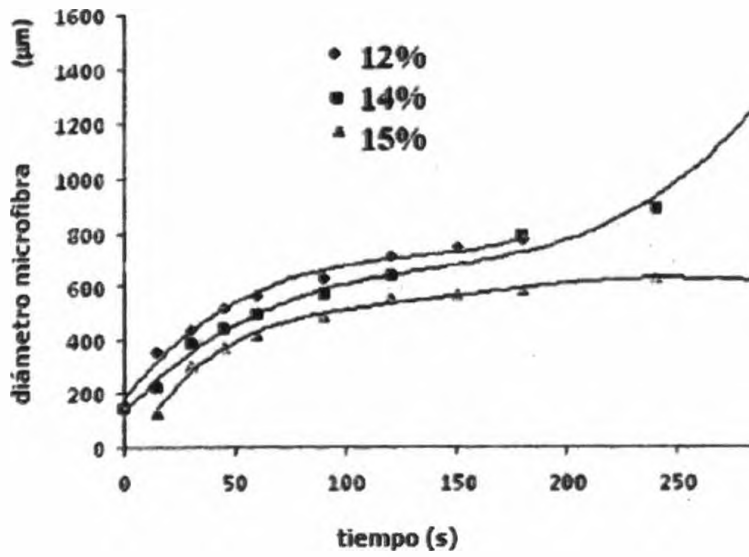


Figura 10

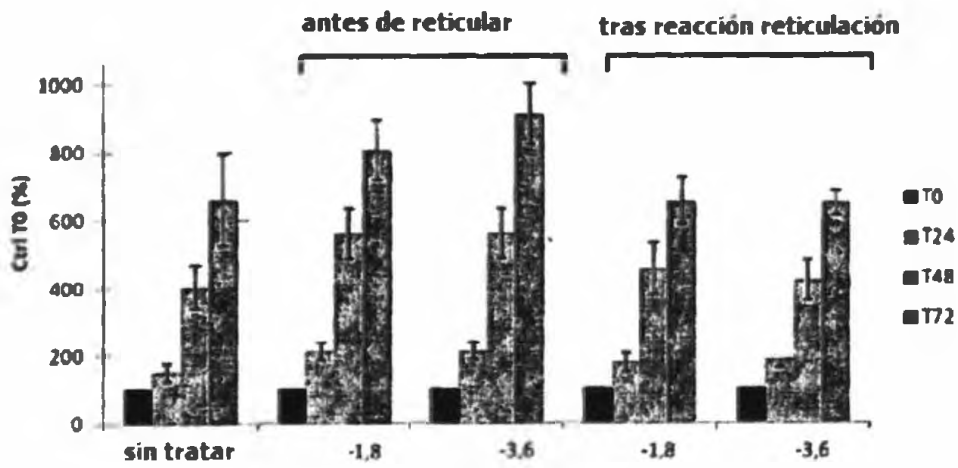


Figura 11

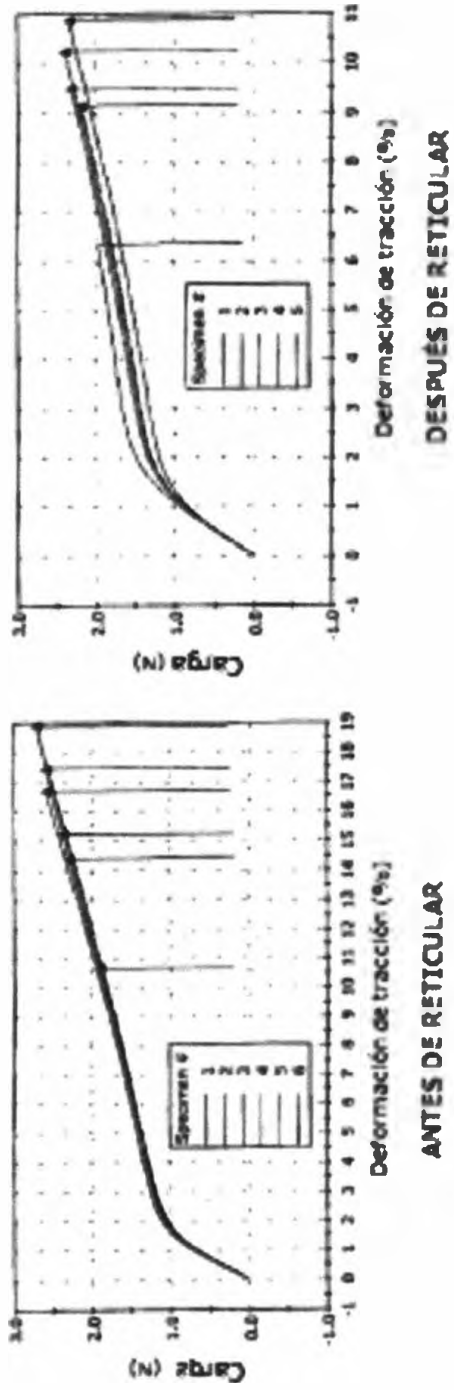


Figura 12