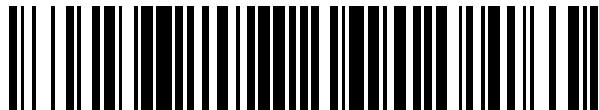


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 648 311**

51 Int. Cl.:

C08B 37/08 (2006.01)

A61K 8/00 (2006.01)

C08L 5/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.11.2014 PCT/CZ2014/000138**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.05.2015 WO15074632**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.11.2014 E 14827154 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.08.2017 EP 3071602**

54 Título: **Nanofibras que contienen derivado éster fotocurable de ácido hialurónico o su sal, nanofibras fotocuradas, método de síntesis de las mismas, preparación que contiene nanofibras fotocuradas y su uso**

30 Prioridad:

21.11.2013 CZ 20130914

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

29.12.2017

73 Titular/es:

**CONTIPRO A.S. (100.0%)
Dolní Dobrouč 401
56102 Dolní Dobrouč, CZ**

72 Inventor/es:

**HUERTA-ANGELES, GLORIA;
BOBEK, MARTIN;
PRIKOPOVA, EVA;
RUZICKOVA, JANA;
MORAVCOVA, MARTINA;
BRANDEJSOVA, MARTINA y
VELEBNY, VLADIMIR**

74 Agente/Representante:

JIMÉNEZ URÍZAR, María

ES 2 648 311 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

Nanofibras que contienen derivado éster fotocurable de ácido hialurónico o su sal, nanofibras fotocuradas, método de síntesis de las mismas, preparación que contiene nanofibras fotocuradas y su uso.

Campo de la invención

- 5 **[0001]** La presente invención se refiere a nanofibras que contienen un éster fotocurable derivado de ácido hialurónico o su sal, nanofibras fotocuradas y los métodos de sus síntesis y uso de la preparación que contiene nanofibras fotocuradas.

Antecedentes de la invención

- 10 **[0002]** El ácido hialurónico (HA o Hialuronano, Figura A) es un glicosaminoglicano lineal que consiste en unidades alternas de ácido D-glucurónico y N-acetil-D-glucosamina. HA no es inmunogénico y por lo tanto tiene un gran potencial en medicina. Se ha encontrado que HA caracterizado por su alto peso molecular, es particularmente útil en una variedad de campos clínicos, incluyendo cicatrización de heridas, cirugía oftálmica y cirugía ortopédica debido a sus propiedades viscoelásticas. HA es también potencialmente útil en una variedad de campos no médicos incluyendo aplicaciones cosméticas.

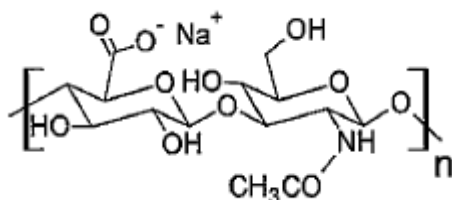


Figura A. Ácido hialurónico (Hialuronano o HA)

- 20 **[0003]** HA es un polímero soluble en agua y produce soluciones altamente viscosas. HA se ha reticulado químicamente por medio de diferentes grupos funcionales tales como compuestos epoxi, divinilsulfona y similares, para prolongar la semivida del biopolímero in vivo, así como para preparar materiales para uso médico en forma de películas o hidrogeles. El problema principal a resolver para aplicaciones médicas y cosméticas de los materiales fabricados a partir del mismo es la eliminación completa de productos químicos y / o catalizadores sin reaccionar después de la reacción. La eliminación de estos componentes es un desafío debido a la conformación macro molecular de HA, sin embargo, es muy importante ya que cuando se administra o se implanta en cuerpos vivos, dichos productos químicos residuales pueden producir efectos adversos, por lo que no se recomiendan para un uso práctico en el campo biomédico.

- 25 **[0004]** De acuerdo con técnica anterior informada, tal como la patente US nº 7951936 que describe un ácido hialurónico reactivo foto-reticulado en el que los grupos funcionales carboxílicos de HA se modificaron químicamente. Las funcionalidades utilizadas para reticulación fotográfica pueden incluir ácido cinámico. Estos derivados de éster de aminoalquilo se unieron al polisacárido por un enlace amida entre el residuo amino del grupo aminoalquilo y el grupo carboxilo de HA. Tal modificación de carboxilo altera la biocompatibilidad de los materiales obtenidos porque se sabe que el grupo carboxilo de HA es el sitio de reconocimiento de receptores de hialuronidasa y HA.

- 30 **[0005]** La solicitud de patente US nº. 2012289478 (A1) describe derivados éster de ácido hialurónico con ácido hidroxicinámico usados como agentes protectores en dermatología. La síntesis de tales ésteres implica el uso de formamida, que es muy tóxica y la activación del grupo carboxilo del ácido hidroxicinámico de sus derivados se realiza usando carbonil diimidazol (CDI). Las soluciones o hidrogeles altamente viscosos obtenidos no se pueden usar para electrohilado porque el CDI puede causar auto-reticulación de HA.

- 35 **[0006]** La acilación de HA ha sido reportada en varios documentos de patente. Por ejemplo, se cataliza por cloroformiatos en el documento WO 2010/105582. Sin embargo, la aplicación de dicho reactivo para la funcionalización de polisacáridos es todavía difícil debido al número de reacciones secundarias que surgen de su alta reactividad, tal como se describe en un artículo de investigación (Wondraczek, et al., Synthesis, Carbohydrate Polymers 2011, 83., 1112 - 1118). Además, una conversión del ácido hialurónico a su forma ácida disminuye las recuperaciones del polímero y aumenta considerablemente la polidispersidad. También se reivindica la necesidad de DMSO anhidro, que es muy costoso a escala industrial. Adicionalmente, una de las desventajas más importantes es la alta cantidad de 4-dimetilaminopiridina (o DMAP) usada para la alimentación de reacción. El problema de usar este reactivo se deriva de sus efectos letales agudos (clasificados como P). Sin embargo, el reactivo se utiliza muy comúnmente para la acilación

como agente de transferencia de acilo. El uso de DMAP para acilación de ácido hialurónico se ha publicado recientemente (Smejkalova et al., Carbohydrate Polymers, 87 (2), 2012, 1460).

5 **[0007]** Ejemplos de la O-acilación en la Patente de Estados Unidos N° 7.041.310 incluyen reacciones que emplean uno o más catalistas ácidos, por ejemplo, ácidos minerales tales como ácido clorhídrico o ácido sulfúrico, ácidos orgánicos tales como ácido sulfónico aromático y ácidos de Lewis tales como eterato de fluoruro de boro o similares, y una reacción con un ácido orgánico que emplea uno o más agentes deshidratantes, por ejemplo, N, N'-díciclohexilcarbodiimida, yoduro de 2-cloro-1-metilpiridinio y N, N'-carbonildiimidazol o similares. Sin embargo, la composición implica un complejo de ácido hialurónico o una sal del mismo y una sal de amonio cuaternario, que en general se considera tóxica.

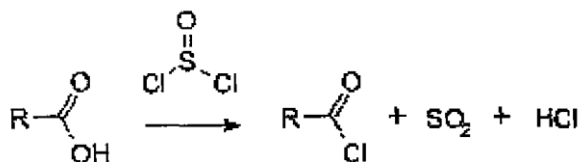
10 **[0008]** Se han descrito condiciones de reacción similares en el documento de patente W02005092929A1 y relacionadas con ésteres butíricos de ácido hialurónico en los que los grupos hidroxilo de ácido hialurónico están esterificados parcialmente con residuos butíricos, caracterizados por un grado de sustitución igual o inferior a 0,1. Estos ésteres con bajo grado de sustitución se obtienen por medio de un procedimiento llevado a cabo en la fase homogénea bajo condiciones anhidras, en el que se utiliza ácido hialurónico en forma de una sal cuaternaria de nitrógeno. Sin embargo, estas condiciones son difíciles de seguir en gran escala. La Patente de Estados Unidos N° 2005 / 0119219A1 se refiere a derivados de éster de ácido hialurónico e hidrogeles preparados por foto-curado. La principal desventaja de la síntesis es que se parte de la sal de tetrabutilamonio del ácido hialurónico en condiciones anhidras, lo que es un proceso costoso y degrada considerablemente el polisacárido.

20 **[0009]** La Patente US N° 824754682 describe derivados de polisacáridos ácidos, en donde el procedimiento de preparación comprende la reacción en fase homogénea usando un disolvente polar prótico tal como formamida y un anhídrido de un ácido alquilcarboxílico, en presencia de un catalizador básico. Existen varias desventajas de la vía sintética tal como el uso de formamida, un disolvente carcinógeno que limita seriamente el escalado de la reacción, así como el uso del polímero modificado en dispositivos médicos. Una segunda limitación es el uso de altas temperaturas durante la reacción (95 °C), lo que degrada el polisacárido. Se usaron condiciones similares en la Patente de Estados Unidos N° 2012/0289478 A1. Se describió la síntesis de ésteres de ácido hialurónico y ácidos cinámicos, caféicos o ferúlicos y el uso de los materiales para reticulación. Sin embargo, esta síntesis implica nuevamente el uso de formamida para la disolución de la mezcla de reacción. La Patente de Estados Unidos N° 5.462.976 estableció claramente que la síntesis de derivados fotocurables de glicosaminoglicanos requiere una temperatura elevada y un tiempo de reacción más largo de modo que el HA se degrada y produce subproductos de reacción desconocidos.

30 **[0010]** En técnica similar, la patente japonesa número JP-19940307050 proporciona un derivado cinámico-fotorreactivo que tiene un espaciador introducido entre el grupo cinámico reactivo y el esqueleto polimérico. La desventaja de su preparación es la vía sintética larga, así como el uso de reactivos muy tóxicos tales como ácido trifluoroacético que perjudican un escalado ascendente eficaz.

35 **[0011]** En la bibliografía se han descrito varios activadores del grupo carboxílico, tales como los utilizados para la formación de enlaces peptídicos. El Esquema 1 muestra la activación del grupo carboxílico con cloruro de tionilo para formar el cloruro de ácido, publicado recientemente en Molecules 2012, 17, 8661-8673. Sin embargo, no todos estos activadores pueden considerarse para ser usados para la modificación de ácido hialurónico en solución acuosa, ya que pueden reaccionar violentamente y / o explosivamente y liberar gases peligrosos al entrar en contacto con agua y otros reactivos en la alimentación de reacción.

40



Esquema 1. Activación del grupo carboxílico por cloruro de tionilo

45 **[0012]** Por otra parte, el electrohilado es un método altamente versátil que produce fibras en la micro o nanoescala. La técnica de electrohilado de líquidos y / o soluciones es bien conocida y descrita en la técnica anterior, tal como las patentes de Estados Unidos N° 4.043.331 y US 5.522.879. El proceso de electrohilado implica la introducción de un líquido en un campo eléctrico, de modo que se producen las fibras. Estas fibras son generalmente atraídas hacia un conductor con un potencial eléctrico atractivo para su recogida. Durante la conversión del líquido en fibras, las fibras se endurecen y / o se secan. Este endurecimiento y / o secado puede ser causado por enfriamiento del líquido, es decir, donde el líquido es normalmente un sólido a temperatura ambiente; por evaporación de un disolvente, o por un mecanismo de curado. Como ejemplo, la solicitud de patente US n° 2011/0020917-A1 describe el electrohilado de poli-caprolactona para la inmovilización de compuestos biológicamente activos. Hay algunos trabajos de investigación relacionados con el electrohilado de polímeros tales como poli (alcohol vinílico) (PVA), pero los autores aclaran que los

50

derivados de PVA no son lo suficientemente reactivos para la reticulación, a continuación, el proceso requiere tratamiento térmico para favorecer la reacción (Zeng y col., Macromolecular Rapid communications, 2005, 26, 157). Sin embargo, el precalentamiento no es favorable para polímeros sensibles tales como HA que se degrada considerablemente con el calentamiento.

5 **[0013]** La patente número US20110111012 describe la formación de apósitos para heridas que utilizan genipina, escuarato de dietilo o ácido oxálico como agentes reticulantes. Sin embargo, los agentes de reticulación incorporados pueden ser difíciles de eliminar de los apósitos. Otra desventaja del procedimiento son las altas temperaturas (150° C) durante el secado, que evidentemente no se pueden aplicar a HA.

10 **[0014]** La solicitud de patente US nº 2010/002155 describe la aplicación externa de apósitos para heridas hechos de nanofibras. Sin embargo, este tipo de material no se puede utilizar también para uso interno debido a la presencia de partículas de plata, que no son absorbibles y biodegradadas en el cuerpo.

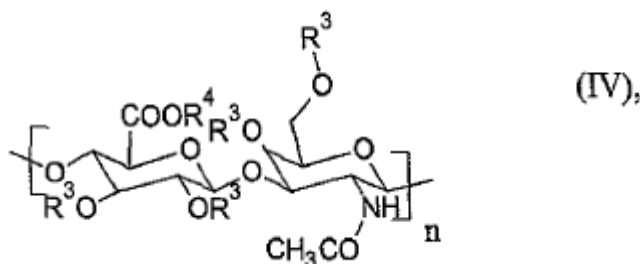
15 **[0015]** Existen varios artículos de investigación que describen el electrohilado del ácido hialurónico nativo. Los artículos se refieren principalmente a mezclas que consisten en ácido HA / gelatina (HA / GE) obtenido en N, N-dimetilformamida y disolventes mezclados con agua (Li et al., Macromolecular Rapid Communications 2006; 27 (2): 114-120). Desafortunadamente, el uso de DMF no es preferido para materiales diseñados para aplicaciones biomédicas debido a su alta toxicidad. La Patente de Estados Unidos Nº US20080071001 se refiere al procedimiento de preparación de una esponja de polisacárido, en la que la formación de reticulación implica el crio-procesamiento del material enfriando la solución a -80°C.

20 **[0016]** Generalmente, como se ha mencionado anteriormente, existen varios inconvenientes y problemas relativos al proceso de preparación de material fabricado a partir de un derivado de HA aplicable en el campo biomédico que comprende la presencia de residuos tóxicos en el material que han de ser eliminados de una manera complicada y costosa usando condiciones de reacción que no son adecuadas para HA, tales como condiciones de alta temperatura y anhidras.

25 **RESUMEN DE LA INVENCION**

30 **[0017]** Los problemas mencionados anteriormente se resuelven en la presente invención con respecto a nanofibras en base a un derivado éster fotocurable de ácido hialurónico o su sal y método de su sintético. Los derivados éster fotocurables del ácido hialurónico o su sal son adecuados para formar nanofibras por electrohilado y la preparación fotocurada a partir de tales nanofibras que es adecuada para uso médico interno y externo. Las principales ventajas de este método son realizar el método utilizando componentes no extremadamente tóxicos bajo las condiciones de reacción suaves, especialmente utilizando mezcla de agua y disolvente polar o no polar miscible en agua. Además, las nanofibras se pueden fotocurar fácilmente (estabilizar) mediante reticulación mediada por irradiación luminosa en ausencia de iniciadores o activadores.

35 **[0018]** El objeto de la invención se refiere a nanofibras que comprenden un éster fotocurable derivado de ácido hialurónico o su sal de fórmula general IV



en la que n es un número entero en el intervalo de 1 a 5000 dímeros.

40 R³ son independientemente H o COCHR¹ en donde R¹ es arilo de 5 o 6 elementos o heteroarilo de 5 o 6 elementos que tiene al menos uno o más heteroátomos idénticos o diferentes seleccionados del grupo que comprende N, O, S, preferiblemente fenilo, furilo, furfurilo, tienilo, tiofenilo, piridilo o imidazolilo;

con la condición de que al menos un R³ del derivado sea COCHR¹;

R^4 es W o una sal farmacéuticamente aceptable, preferiblemente seleccionada entre un grupo que comprende cualquiera de los iones de metales alcalinos o iones de metales alcalinotérreos, más preferiblemente Na^+ , K^+ , Mg^{2+} o Li^+ ; y al menos un polímero portador.

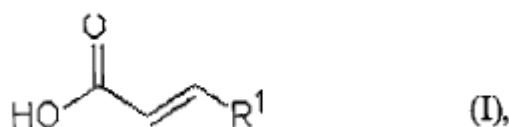
5 [0019] El HA o su sal se modifica principalmente al menos en una posición de grupos OH de ácido D-glucurónico o unidad de N-acetil glucosamina de HA, preferiblemente en la posición C6 de la N-acetil-glucosamina de HA y aleatoriamente a las posiciones C2, C3 de ácido glucurónico o C4 de N - acetil - glucosamina.

10 [0020] La cantidad de grupos fotorreactivos ($-COCHCHR^1$) en el derivado de éster fotosensible de ácido hialurónico o su sal de la invención es de 0,1 a 20% por 100 de dímero de ácido hialurónico o su sal, preferiblemente de 5 a 10%, más preferiblemente 5%. Esta cantidad de grupos fotorreactivos corresponde al grado de sustitución (OS) que se determinó por integración de las señales en 1H NMR (fracciones heteroaromáticas correspondientes, por ejemplo, a furano, tiofeno, piridina, imidazol y similares) relacionadas con el grupo metilo correspondiente al grupo N -acetilo.

[0021] El polímero portador se selecciona de un grupo que comprende alcohol polivinílico (PVA), ácido poliacrílico (PAA), óxido de polietileno (PEO), polivinilpirrolidona (PVP).

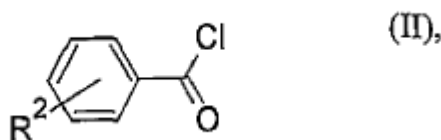
15 [0022] Una cantidad del polímero portador en las nanofibras de la presente invención está en el intervalo de 50% (p / p) a 99% (p / p), preferiblemente en el intervalo de 70% (p / p) a 90% (p / p), más preferiblemente 80% (p / p). Las nanofibras de acuerdo con la invención pueden comprender polímero biológicamente compatible hilable de forma relativamente fácil y polímero biológicamente compatible, preferiblemente gelatina de carboximetil celulosa (CMG), quitosano, policaprolactona (PCL), ácido poliláctico (PLA), poliamida (PA), poliuretano (PUR), poli-ácido (lactida-co-glicólico); y su mezcla o sus copolímeros.

20 [0023] Otro aspecto de la presente invención es un método de síntesis de nanofibras de la presente invención que contiene el derivado éster fotoendurecible de ácido hialurónico o su sal de la fórmula general IV como se ha definido anteriormente que comprende una reacción de activación de α,β - ácido acrílico insaturado sustituido de la fórmula general I

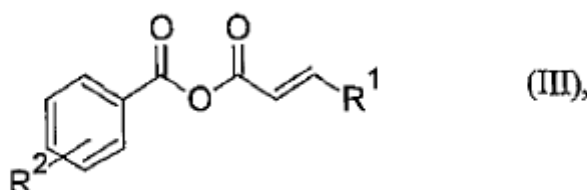


donde

R^1 es un arilo de 5 ó 6 elementos o un heteroarilo de 5 ó 6 elementos que tiene al menos uno o más heteroátomos idénticos o diferentes seleccionados del grupo que comprende N, O, S; con cloruro de benzoilo sustituido o no sustituido o sus derivados de la fórmula general II



35 en la que R^2 es uno o más sustituyentes seleccionados de un grupo que comprende H, $-NO_2$, $-COOH$, haluros, alquiloxi $C_1 - C_6$, preferiblemente haluros, metoxi o etoxi, más preferiblemente Cl; en presencia de una base orgánica que significa una amina alifática preferiblemente una amina terciaria que tiene un grupo alquilo C_3-C_{30} lineal o ramificado, saturado o insaturado, sustituido o no sustituido, preferiblemente amina terciaria, más preferiblemente trietilamina (TEA), diisopropilamina (DIPEA), N , N diisopropilamina (DIEA); una mezcla de agua y un disolvente polar o no polar miscible en agua para formar un anhídrido reactivo de la fórmula general III



donde

R¹ y R² son como se han definido anteriormente (véase también Esquema 2 a continuación, Etapa A, una etapa de activación),

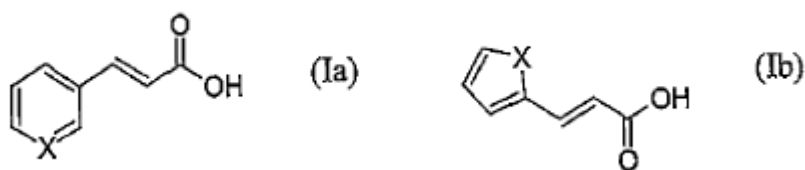
5 que reacciona con ácido hialurónico o una sal del mismo en presencia de una base orgánica, es decir amina alifática preferiblemente una amina terciaria que tiene un grupo alquilo C₃-C₃₀ lineal o ramificado, saturado o insaturado, sustituido o no sustituido, preferiblemente amina terciaria, más preferiblemente trietilamina o diisopropilamina; una mezcla de agua y disolvente polar o no polar miscible con agua (véase también el Esquema 2 a continuación, Etapa B, una etapa de modificación), para formar el derivado éster fotoendurecible de ácido hialurónico o su sal de fórmula general IV como se definió anteriormente que se disuelve en el polímero portador de peso molecular de 5 x 10⁴ g / mol a 1 x 10⁶ g / mol, preferiblemente 4 x 10⁵ g / mol en agua para formar una solución de hilatura que es hilada por electrohilado.

[0024] Las soluciones de hilatura pueden formarse con PEO de diferentes pesos moleculares dependiendo de la aplicación específica.

15 [0025] La concentración del éster fotoendurecible del ácido hialurónico o su sal en la solución de hilatura está en el intervalo de 0,5 a 12% (p / p), preferiblemente de 5 a 7,5% (p / p), más preferiblemente de 5% (p / p).

20 [0026] Los sustituyentes R² de cloruro de benzoilo o sus derivados de fórmula general II tal como se han definido anteriormente pueden estar situados en posiciones orto-, meta- o para- en el grupo cloruro de acilo, preferiblemente en posiciones orto o para-. El uso de cloruro de benzoilo y sus derivados como activadores no se utiliza generalmente para la modificación química de HA porque se cree que cataliza reacciones de transesterificación y puede reaccionar con disolventes orgánicos comunes usados para la modificación química de HA y su aislamiento y purificación respectivos, como etanol, metanol y alquil-alcoholes superiores.

[0027] De acuerdo con una realización preferida de la invención y también el Esquema 2 a continuación (véase la Parte A), la etapa de activación se lleva a cabo mezclando ácido acrílico heteroaromático de 5 o 6 elementos de fórmulas generales la o lb a continuación



25

en la que X se selecciona entre O, S, N, preferiblemente O o N, preferiblemente ácido 3- (2-furil) acrílico, con cloruro de benzoilo como agente activador.

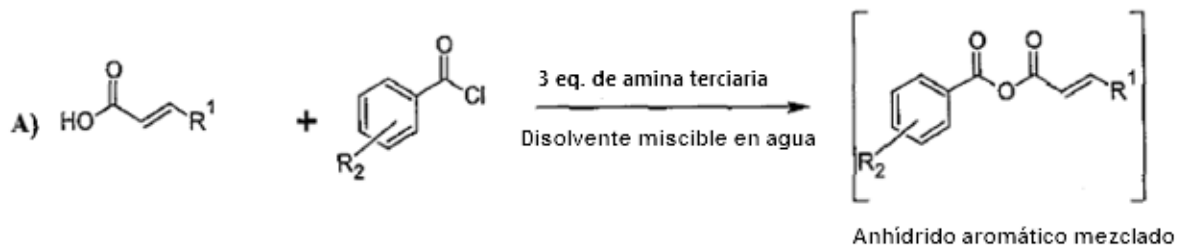
30 [0028] La etapa de activación puede realizarse durante 5 a 120 minutos a cualquier temperatura entre 0°C y 60°C. Sin embargo, si la temperatura es superior a 60°C, la reacción puede generar subproductos, mientras que, si la reacción se enfría, la reacción se hará lenta pero la reacción aún continúa. Por lo tanto, es preferible llevar a cabo la reacción a una temperatura de 25°C a 60°C, más preferiblemente durante 30 minutos a 25 °C.

35 [0029] La activación del cloruro de benzoilo con cualquiera de los derivados de las Figuras la o lb se lleva a cabo casi instantáneamente. Sin embargo, el reactivo intermedio de la estructura III se puede preparar haciendo reaccionar el intermedio la o lb con II bajo agitación vigorosa durante dos a cinco horas, en presencia de una amina terciaria. El tiempo de reacción puede cambiarse debido a factores de agitación, independientemente de que la reacción se lleve a cabo a mayor escala.

40 [0030] Además, la reacción representada en la Parte B se lleva a cabo sin la presencia de 4-dimetilaminopiridina (DMAP), un organocatalizador comúnmente utilizado en la acilación de alcoholes. Este catalizador es muy tóxico y no es aceptable para materiales destinados a uso médico. Esta es una gran ventaja de esta metodología en comparación con el artículo anteriormente referido. Además, se encontró que el uso de la combinación de cloruro de benzoilo o sus derivados de la fórmula general II y DMAP produce un mayor grado de sustitución (> 30%) y auto reticulación de los derivados de HA. Esto es indeseable ya que impide el uso de los derivados de hialuronano para electrohilado (véanse los Ejemplos 14 y 16)

45 **A) Activación de un ácido acrílico -insaturado sustituido y formación del anhídrido reactivo – la etapa de activación.**

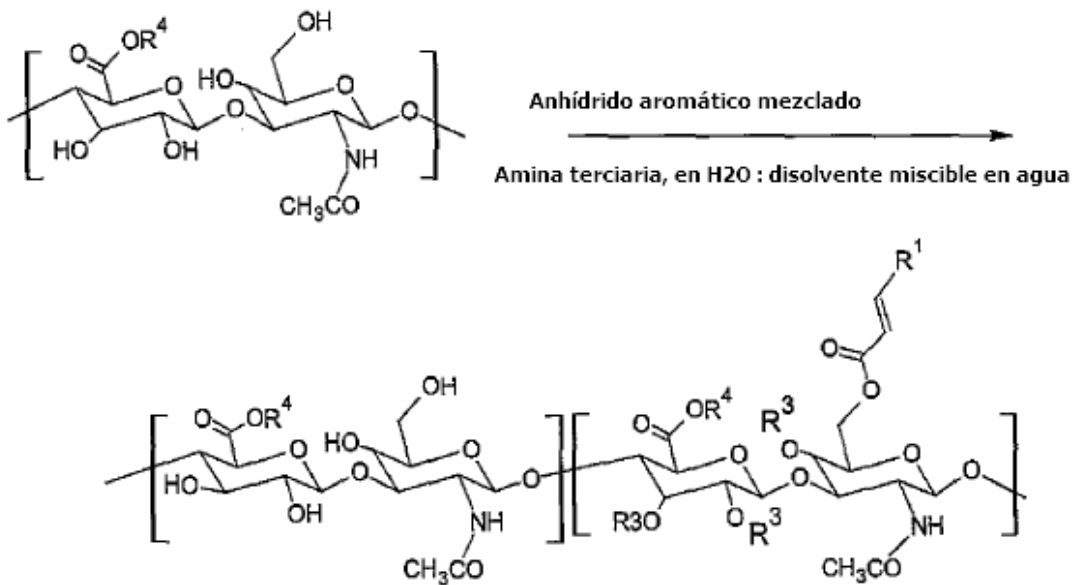
[0031]



B) Una formación del éster fotocurable de HA o su sal - la etapa de modificación

[0032]

5



R¹ = arilo o heteroarilo de 5 ó 6 elementos

R³ = -H, o -COCHCHR¹

R⁴ = H⁺ o iones de metales alcalinos o iones de metales alcalino-térreos

10

Esquema 2

15

5 **[0033]** Además, el ácido hialurónico o su sal, utilizado en la etapa de modificación de acuerdo con el método de la invención tiene un peso molecular (peso promedio de peso molecular) de 5×10^3 a $1,6 \times 10^6$ g / mol, preferiblemente de $1,5 \times 10^4$ a $2,5 \times 10^5$ g / mol, más preferiblemente de $8,5 \times 10^4$ a $1,2 \times 10^5$ g / mol. Sin embargo, el método de la invención no se limita a estos ámbitos de HA o su sal. El peso molecular medio y el número medio de pesos moleculares de los polímeros se determinaron mediante SEC-MALLS, así como la polidispersidad de los derivados.

10 **[0034]** La reacción de la parte B (véase el Esquema 2 anterior, la etapa de modificación) se lleva a cabo durante 1 a 48 horas, preferiblemente 1 a 3 horas; a temperaturas en el intervalo de 0 °C a 80 °C, preferiblemente de 20 °C a 60 °C, más preferiblemente a 25 °C

15 **[0035]** La cantidad de anhídrido reactivo de la invención mezclado con HA o su sal corresponde a 0,01 a 5 equivalentes, preferiblemente 0,5 a 2 equivalentes, más preferiblemente 0,5 equivalentes por dímero de ácido hialurónico o su sal para producir el derivado éster fotocurable de HA o su sal de la invención que tiene unido por covalencia el grupo fotocurable (-COCHCHR¹). Los derivados éster fotocurables ácido hialurónico o su sal de la invención no han cambiado considerablemente la viscosidad y las características fisicoquímicas de HA y se caracterizan por baja polidispersidad. Además, el peso molecular de los derivados ha mostrado un ligero aumento después de la modificación química. Estos derivados se caracterizaron por ¹H y HSQC-RMN, IR y espectroscopias UV.

20 **[0036]** Las etapas de la activación y la modificación (véase el Esquema 2 anterior) se llevan a cabo como se ha descrito anteriormente en la mezcla de agua y un disolvente polar o no polar miscible en agua miscible con agua. El disolvente se selecciona de un grupo que comprende isopropanol, acetona, acetato de etilo, dimetilsulfóxido, acetonitrilo, dimetilformamida, tetrahidro furano, pero es preferiblemente el uso de isopropanol. La cantidad de agua en la mezcla de agua y disolvente polar miscible en agua es de 10% v / v a 99% v / v, preferiblemente 50% v / v.

25 **[0037]** Adicionalmente, esta metodología del método de la invención antes descrito permite un fácil escalado para permitir la preparación de nanofibras de la invención comprendiendo cantidades más altas de los derivados fotocurables de ésteres de HA.

30 **[0038]** Las nanofibras según la presente invención pueden prepararse, por ejemplo, por electro-hilado en el dispositivo para preparación de nanofibras (por ejemplo, 4SPIN®, CONTI PRO-group sro) o por otro método de electrohilado conocido en la técnica, p. ej. centrifugado uniaxial, electrohilado coaxial o electrohilado multiaxial. La caracterización de la malla de fibra se realizó mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) como se describe en la técnica conocida y se muestra en las Figuras 3, 4, 5.

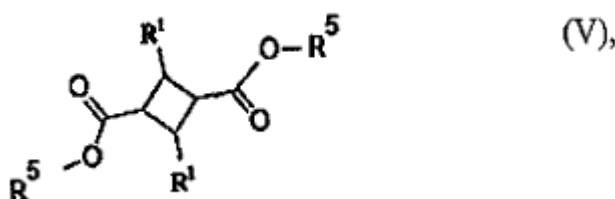
35 **[0039]** Los derivados de ésteres fotocurables de la invención poseen diferente grado de sustitución (OS). Todos ellos se ensayaron para el electrohilado (Tabla 1, Ejemplos 22, 23 y 24). Según los datos experimentales, los derivados éster-HA de la invención que tienen menor grado de sustitución (5-20%) son fácilmente electrohilados y también han mostrado un ligero aumento de viscosidad debido a la modificación (véase la Figura 6). El método de modificación química de HA como se describe en la etapa de modificación (véase Esquema 2) es capaz de dar la viscosidad requerida para el electrohilado, que es muy importante para obtener una recuperación grande (una gran cantidad de producto obtenido del proceso).

40 **[0040]** Las nanofibras de la presente invención, tal como se han descrito anteriormente, preferiblemente forman gel y su diámetro medio está comprendido entre 99 y 150 nm

45 **[0041]** Las fibras obtenidas son capaces de retener su integridad estructural al absorber el exudado. Alternativamente, los polímeros biológicamente compatibles contenidos en las nanofibras de la presente invención aumentan la estabilidad mecánica de las nanofibras tanto en sí mismas como de la preparación final.

50 **[0042]** Las fibras formadoras de gel tienen preferiblemente una absorbancia en el intervalo de al menos 2 a 25 gramos de solución salina al 0,9% por gramo de nanofibra (medida por el método de hinchamiento libre), preferiblemente al menos 10 g / g. Dicha baja capacidad de absorción de agua (aproximadamente 20%) significa que los materiales fabricados de la misma son mecánicamente robustos.

[0043] Adicionalmente, de acuerdo con otra realización de nanofibras de la invención, las nanofibras como se han definido anteriormente, pueden ser fotocuradas por la irradiación de luz dentro del intervalo de longitudes de onda UV-Vis, por lo que ocurre cicloadición de al menos dos grupos éster de al menos dos moléculas de ácido hialurónico o su sal de la fórmula IV, formando el compuesto que tiene anillo de ciclobutano de la fórmula general V



donde

R¹ es como se definió anteriormente y

R⁵ es una cadena principal de ácido hialurónico o su sal.

5 [0044] La irradiación de luz se realiza en el intervalo de longitudes de onda UV-Vis, preferiblemente en el intervalo de 280 nm a 750 nm, más preferiblemente a 302 nm. La irradiación de acuerdo con la invención se lleva a cabo preferiblemente a temperatura ambiente, en un tiempo de exposición entre 2 minutos y 60 minutos, y más preferiblemente entre 3 y 10 minutos. Después de reticular la esterilla de fibras se interconecta y forma una red 3D (ver Figura 5).

10 [0045] La Figura 7 muestra el espectro UV-Vis de las nanofibras de hialuronato de sodio 2-furil-acrílico irradiadas durante diferentes períodos de tiempo a 302 nm para inducir reticulación. Se tomaron alícuotas diferentes de la parte soluble de las nanofibras después de hincharse en agua. Como se observa, la intensidad de los máximos de absorción disminuyó. Con el aumento del tiempo de irradiación UV se observó una disminución significativa. Después de la exposición a luz UV durante 60 minutos casi no se observó absorbancia. Estos materiales después de electrohilado reaccionan perfectamente en el estado sólido sin la presencia de iniciadores ni activadores y son foto-curados. El foto-endurecimiento puede efectuarse también mediante un proceso de polimerización por radicales libres.

15 [0046] Las nanofibras fotocuradas de la invención que comprenden el compuesto que tiene anillo de ciclobutano de la fórmula V, como antes se ha definido, son preferiblemente una parte de la preparación que está en la forma seleccionada de un grupo que comprende capa, película, estera, apósito para heridas o tejido andamio utilizado en cosmética, medicina o medicina regenerativa, por ejemplo, en el dispositivo de cuidado de heridas en parches para uso externo o interno.

20 [0047] La biocompatibilidad de los derivados ésteres fotoendurecibles de la presente invención se determinó mediante el estudio de citotoxicidad de células de fibroblastos 3T3-NIH (Figura 8 y 10), incluidos como ejemplos en este documento. Se evaluó la biocompatibilidad de los productos, así como su fotocitotoxicidad (Figuras 9 y 11). Así, algunos ejemplos han demostrado que la capa de nanofibra producida de acuerdo con la presente invención puede usarse para cubrir heridas diferentes porque las películas hechas de la misma han estado en contacto con fibroblastos (células de tejido fibroso) sin citotoxicidad aparente. Algunas otras células o una combinación de las mismas pueden cultivarse sobre la capa de nanofibras. Las nanofibras descritas en la presente invención se pueden usar para la formación de capa, película, estera o revestimiento que es una parte de un vendaje para heridas, o una forma de soporte de tejido, pero no se limita a este grupo.

25 [0048] Las preparaciones de la presente invención tales como las películas ya no son solubles en agua después de la reticulación y pueden aplicarse a un punto específico como gel o vendaje hecho de las mismas. La preparación de la invención puede usarse en cosmética, medicina o medicina regenerativa, preferiblemente en el dispositivo de cuidado de heridas, o en parches para el uso externo o interno, como se espera para los derivados modificados químicos de HA.

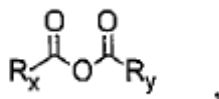
30 [0049] Ventajas del método de síntesis de las nanofibras que comprenden un éster fotocurable derivado de la invención se pueden encontrar en simplicidad, bajo precio de coste y también que puede llevarse a cabo en condiciones de reacción suaves usando reactivos no tóxicos. Los derivados de la presente invención se clasificaron como biocompatibles y no citotóxicos, por lo tanto, son adecuados para uso in vivo. Pueden ser fácilmente electrohilados con alta eficiencia. El método de foto-curado es rápido y eficiente y se caracteriza por ser efectuado sin el uso de un catalizador o iniciador externo.

40

Definiciones de los términos

[0050] El término "haluros" significa F, Cl, Br o I.

[0051] El término "anhídrido aromático mixto" significa anhídrido arilpropen-2-enoico benzoico sustituido o anhídrido heteroarilpropen-2-enoico benzoico, o un componente orgánico caracterizado por la fórmula



45

en el que $R_x \neq R_y$, es decir un anhídrido de ácido no simétrico.

[0052] El término "base orgánica" es una amina alifática preferiblemente una amina terciaria que tiene un grupo alquilo C₃-C₃₀ lineal o ramificado, saturado o insaturado, sustituido o no sustituido

5 **[0053]** El término "dímero HA" significa la repetición de unidades disacárido de ácido hialurónico. Eso significa ácido glucurónico y N-acetil glucosamina. El término "sal farmacéuticamente aceptable" tal como aquí se usa, significa aquellas sales de derivados éster de HA de la invención que son seguras y eficaces para uso tópico in vivo y que poseen una actividad biológica deseada. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen sales de grupos ácidos o básicos presentes en los derivados éster de HA de la invención, preferiblemente iones de metales alcalinos o iones de metales alcalinotérreos, más preferiblemente Na⁺, K⁺, Mg⁺ or Li⁺.

10 **[0054]** El término "grado de sustitución del derivado de éster fotoendurecible HA" es el número (medio) de COCHCHR¹ unido por 100 dímeros de HA o sal. Por ejemplo, 5% significa que 5 de cada 100 dímeros de HA pueden estar sustituidos con un grupo COCHCHR¹.

15 **[0055]** El término "foto-curado" significa foto-polimerización o reticulación en estado sólido. El término se refiere en su mayor parte a un procedimiento caracterizado por polimerización iniciada por fotoactividad de radicales libres o catiónicos, que puede producir una red polimérica de reticulación o interpenetración.

20 **[0056]** El término "nanofibra formadora de gel" significa que las fibras son higroscópicas que al ser absorbidas por el exudado de la herida se vuelven húmedas, resbaladizas o gelatinosas y por lo tanto reducen la tendencia de las fibras circundantes a adherirse a la herida.

25 **[0057]** El término "película" significa una estructura compleja compuesta de nanofibras caracterizada por un área superficial alta y una alta porosidad y se prepara por electrohilado o técnica similar. Estas fibras se caracterizan por un diámetro comprendido entre 50 nm y 1000 nm o mayor. Las nanofibras, que pueden estar reticuladas o no, que comprenden los derivados éster del ácido hialurónico o su sal descritos en esta invención, pueden usarse para el revestimiento o envoltura.

30 **[0058]** El término "polímero portador" se refiere a un polímero que es biocompatible y electrohilable. En otras palabras, es un polímero natural o sintético que está destinado a aplicaciones farmacéuticas y no causa ninguna toxicidad indeseable o sistémica.

25

Breve descripción de los dibujos

[0059]

30 Figura 1. Espectros HSQC de Hialuronato Sodio Acrilato de 2-furilo obtenido por la reacción descrita en el Ejemplo 1

Figura 2. Espectros ¹H del hialuronato trans-3- (3-piridil) acrílico de sodio

35 Figura 3. Micrografías SEM que muestran la morfología de esteras fibrosas después del electro-hilado, observadas en dos ampliaciones diferentes (A) 2 μm y (B) 20 μm (C) después de 10 minutos de irradiación (D) después de 20 minutos de irradiación (302 nm), que corresponde al Ejemplo 22, Tabla 1 (Ejemplo 2)

Figura 4. Micrografías SEM que muestran la morfología de esteras fibrosas electro-hiladas que corresponden al material descrito en el Ejemplo 22, Tabla 1 (Ejemplo 3), observado en A) 2 μm y (B) 20 μm.

Figura 5. Imágenes SEM de fibras electrohilado de muestras descritas en el Ejemplo 24

40 Figura 6. Micrografías SEM representan la morfología de esteras fibrosas electro-hiladas después de la reticulación del derivado (10 minutos) e hinchamiento durante 24 horas en PBS, como se describe en el Ejemplo 27.

Figura 7. Viscosidad dinámica de las muestras antes de la hilatura, mostrando un aumento progresivo de la viscosidad en función del grado de sustitución

45 Figura 8. Espectro UV-Vis de nanofibras de hialuronato de sodio 2-furilo acrílico irradiadas durante diferentes períodos a 302 nm.

Figura 9. Hialuronato 2-furilo-acrílico de sodio y su influencia en la viabilidad celular probada en las células 3T3-NIH, MTT, n = 6

Figura 10. Hialuronato 2-Furil acrílico de sodio y ensayo de fototoxicidad ensayado en concentraciones (c = 1-1000 ug / ml), línea celular 3T3 - NIH, MTT, T24, n = 5.

50 Figura 11. Ester tiofenil- acrílico de sodio de Hialuronano y su influencia en la viabilidad celular probada en las células 3T3-NIH, MTT, n = 6.

Figura 12. Ester tiofenil- acrílico de sodio de hialuronano y ensayo de fototoxicidad ensayado en concentraciones (c = 1-1000ug / ml), línea celular 3T3-NIH, MTT, T24, n=5

Ejemplos

Ejemplo 1 Activación de ácido 2-furil acrílico por cloruro de benzoilo y reacción con hialuronano

[0060] Se disolvió hialuronato sódico (1,0 g, 2,5 mmoles) con un peso molecular medio de $1,5 \times 10^4$ g / mol en 20 ml de agua destilada. Se fue agregando lentamente isopropanol (IPA, 10 ml) a esta solución para evitar una posible precipitación del polisacárido. Posteriormente, se añadieron 0,7 ml de trietilamina correspondiente a 2 equivalentes al dímero de HA a la mezcla de reacción. En un segundo matraz, se disolvieron 0,17 g (1,25 mol) de ácido 2-furil-acrílico en isopropanol (10 ml). Después se añadieron a la reacción 0,7 ml de trietilamina (TEA) (correspondiente a 2 equivalentes al dímero de HA), seguido de la adición de 0,15 ml de cloruro de benzoílo (correspondiente a 0,5 equivalentes de dímero de HA). La activación se llevó a cabo durante 30 minutos a temperatura ambiente (25°C). Después de eso, se añadió la solución a la primera solución (que contenía HA). La reacción se lleva a cabo durante 3 horas a temperatura ambiente. La reacción se terminó por adición de agua, y una solución de cloruro de sodio. Después se precipitó el producto con un exceso de isopropanol (250 ml). El producto se lavó una vez usando 50 ml de isopropanol (100%) después de que se lavó 4 veces con 50 ml de mezclas de isopropanol y agua (85% v / v). Finalmente, el precipitado se lavó tres veces más con isopropanol al 100% y se secó en un horno a 40°C. Rendimiento de la reacción: 95%, Mw del derivado (SEC - MALLS) = $1,21 \times 10^4$ g / mol y polidispersidad = 1,19.

Descripción química del derivado

[0061] El grado de sustitución se calculó que era 2,5% de acuerdo con la ^1H RMN
 ^1H RMN (500 MHz, D₂O), δ ppm, para el enlazador: 6,40 (d, 1H), 7,18 (t, 1H), 7,47 (s, 1H), 7,62 (d, 1H) 7,95(d, 1H)
2D HSQC (figura 2) δ ppm: 6,4 - 114,9 (señal 1), 7,18 - 128,8 (señal 4), 7,47 - 132,2 (señal 3), 7,62 - 129,7 (señal 5), 7,95 - 139,1 (señal 2).
H - H COSY: señal de pico cruzado 6,40 - 7,95 ppm, 7,19 - 7,62 ppm, 7,47 - 7,19 ppm.
RMN DOSY (500 MHz, D₂O) 6,40-7,95 ppm: -11 a -12 log (m² / s), 1,90 - 4,70 ppm: -11 - 12 log (m² / s)
 UV / vis (0,05%; H₂O) λ_{max} = 309 nm.

Ejemplo 2 Activación de ácido 2-furil acrílico por cloruro de benzoílo y reacción con hialuronano

[0062] Se disolvió hialuronato sódico (1,0 g, 2,5 mmoles) con un peso molecular medio de $4,0 \times 10^4$ g / mol en 20 ml de agua destilada. Isopropanol (10 ml) fue añadido lentamente a esta solución para evitar una posible precipitación del polisacárido. Posteriormente, se añadieron 0,7 ml de trietilamina correspondiente a 2 equivalentes al dímero de HA a la mezcla de reacción. En un segundo matraz, se disolvieron 0,17 g (1,25 mmol) de ácido 2-furil-acrílico en isopropanol (10 ml). Después se añadieron a la reacción 0,7 ml de TEA (correspondiente a 2 equivalentes al dímero de HA), seguido por la adición de 0,15 ml de cloruro de benzoílo (correspondiente a 0,5 equivalentes de dímero de HA). La activación se llevó a cabo durante 30 minutos a temperatura ambiente (25°C). Después de eso, se añadió la solución a la primera solución (que contenía HA). La reacción se lleva a cabo durante 3 horas a temperatura ambiente. La reacción se terminó por adición de agua, y una solución de cloruro de sodio. Después se precipitó el producto con un exceso de isopropanol (250 ml). El producto se lavó una vez usando 50 ml de isopropanol (100%) después de 4 veces usando 50 ml de mezclas de isopropanol y agua (85% v / v). Finalmente, el precipitado se lavó tres veces más con IPA al 100% y se secó en un horno a 40°C. El rendimiento de la reacción 98,8%. %, Mw del derivado (SEC-MALLS) = $4,2 \times 10^4$ g / mol y polidispersidad = 1,5.

Descripción química del derivado

[0063] El grado de sustitución se calculó que era de 3,5% en moles de acuerdo con la ^1H RMN.
 ^1H RMN (500 MHz, D₂O), δ ppm, para el enlazador: 6,40 (d, 1H), 7,18 (t, 1H), 7,47 (s, 1H), 7,62 (d, 1H)
2D HSQC (Figura 2), δ ppm: 6,4 - 114,9 (señal 1), 7,18 - 128,8 (señal 4), 7,47 132,2 (señal 3), 7,62 - 129,7 (señal 5), 7,95 - 139,1 (señal 2).
H - H COSY: señal de pico cruzado 6,40 - 7,95 ppm, 7,19 - 7,62 ppm, 7,47 - 7,19 ppm.
RMN DOSY (500 MHz, D₂O): 6,40-7,95 ppm: -11 a -12 log (m² / s), 1,90 4,70 ppm: -11 -12 log (m² / s)
 UV / vis (0,05%; H₂O) λ_{max} = 309 nm.

Ejemplo 3 Activación de ácido 2-furil acrílico por cloruro de benzoílo y reacción con hialuronano

[0064] Se disolvió hialuronato sódico (1,0 g, 2,5 mmoles) con un peso molecular medio de $8,0 \times 10^4$ g / mol en 20 ml de agua destilada. Isopropanol (10 ml) fue añadido lentamente a esta solución para evitar una posible precipitación del polisacárido. Posteriormente, se añadieron 0,7 ml de trietilamina correspondiente a 2 equivalentes al dímero de HA a la mezcla de reacción. En un segundo matraz, se disolvieron 0,17 g (1,25 mmol) de ácido 2-furil-acrílico en isopropanol (10 ml). Después se añadieron a la reacción 0,7 ml de TEA (correspondiente a 2 equivalentes al dímero de HA), seguido por la adición de 0,15 ml de cloruro de benzoílo (correspondiente a 0,5 equivalentes de dímero de HA). La activación se llevó a cabo durante 30 minutos a temperatura ambiente (25°C). Después de eso, se añadió la solución a la primera solución (que contenía HA). La reacción se lleva a cabo durante 3 horas a temperatura ambiente. La reacción se terminó por adición de agua, y una solución de cloruro de sodio. Después se precipitó el producto con un exceso de isopropanol (250 ml). El producto se lavó una vez usando 50 ml de isopropanol (100%) después de 4 veces usando 50 ml de mezclas de isopropanol y agua (85% v / v). Finalmente, el precipitado se lavó tres veces más con IPA al 100% y

se secó en un horno a 40°C. Rendimiento de la reacción: 92,8%, Mw del derivado (SEC-MALLS) = $8,5 \times 10^4$ g / mol y polidispersidad = 1,5.

Descripción química del derivado

5

[0065] El grado de sustitución se calculó que era 5,3% de acuerdo con la RMN ^1H .

RMN ^1H (500 MHz, D_2O), δ ppm, para el enlazador: 6,40 (d, 1H), 7,18 (t, 1H), 7,47 (s, 1H), 7,62 (d, 1H)
2D HSQC (figura 2), δ ppm: 6,4 - 114,9 (señal 1), 7,18 - 128,8 (señal 4), 7,47 - 132,2 (señal 3), 7,62 - 129,7 (señal 5)
7,95 - 139,1 (señal 2).

10 H - H COSY: señal de pico cruzado 6,40 - 7,95 ppm, 7,19 - 7,62 ppm, 7,47 - 7,19 ppm.

RMN de DOSY (500 MHz, D_2O): 6,40-7,95 ppm: -11 a -12 log (m^2/s), 1,90 - 4,02 ppm: -11-12 log (m^2/s)

UV / vis (0,05% H_2O) $\lambda_{\text{max}} = 309$ nm.

Ejemplo 4 Activación de ácido 2-furil acrílico por cloruro de benzoilo y reacción con hialuronano

15 [0066] Se disolvió hialuronato sódico (30,0 g, 75 mmol) con un peso molecular medio de $8,3 \times 10^4$ g / mol en 500 ml de agua destilada. Isopropanol (250 moles) fue añadido lentamente a esta solución para evitar una posible precipitación del polisacárido. Posteriormente, se añadieron a la mezcla de reacción 21 ml de trietilamina correspondiente a 2 equivalentes al dímero de HA. En un segundo matraz, se disolvieron 10,37 g (75 mmol) de ácido 2-furil-acrílico en isopropanol (50 ml). Después se añadieron a la reacción 21 ml de TEA (correspondiente a 2 equivalentes al dímero de HA), seguido de la adición de 9 ml de cloruro de benzoilo (correspondiente a 0,5 equivalentes de dímero de HA). La activación se llevó a cabo durante 30 minutos a temperatura ambiente (25°C). Después de eso, se añadió la solución a la primera solución (que contenía HA). La reacción se lleva a cabo durante 3 horas a temperatura ambiente. La reacción se terminó por adición de agua, y una solución de cloruro de sodio. Después se precipitó el producto con un exceso de isopropanol (2500 ml). El producto se lavó una vez usando 300 ml de isopropanol (100%) después de 4 veces usando 200 ml de mezclas de isopropanol y agua (85% v / v). Finalmente, el precipitado se lavó tres veces más con IPA al 100% y se secó en un horno a 40°C. Rendimiento de la reacción 92,8%, Mw del derivado (SEC - MALLS) = $8,9 \times 10^4$ g / mol y polidispersidad = 1,5

Descripción química del derivado

30 [0067] El grado de sustitución se calculó que era 10% de acuerdo con la RMN ^1H .

RMN de ^1H (500 MHz, D_2O), δ ppm, para el enlazador: 6,40 (d, 1H), 7,18 (t, 1H), 7,47 (s, 1H), 7,62 (d, 1H)
2D HSQC (figura 2), δ ppm: 6,4 - 114,9 (señal 1), 7,18 - 128,8 (señal 4), 7,47 - 132,2 (señal 3), 7,62 - 129,7 (señal 5),
7,95 - 139,1 (señal 2).

H - H COSY: señal de pico cruzado 6,40 - 7,95 ppm, 7,19 - 7,62 ppm, 7,47 - 7,19 ppm.

35 RMN de DOSY (500 MHz, D_2O): 6,40-7,95 ppm: -11 a -12 log (m^2/s), 1,90- 4,70 ppm: -11 -12 log (m^2/s)

UV / vis (0,05% H_2O) $\lambda_{\text{max}} = 309$ nm.

Ejemplo 5. Activación de ácido 2-furil acrílico por cloruro de benzoilo y reacción con hialuronano

40 [0068] Se disolvió hialuronato sódico (1,0 g, 2,5 mmoles) con un peso molecular medio de $2,7 \times 10^5$ g / mol en 20 ml de agua destilada. Isopropanol (10 ml) fue añadido lentamente a esta solución para evitar una posible precipitación del polisacárido. Posteriormente, se añadieron 0,7 ml de trietilamina correspondiente a 2 equivalentes al dímero de HA a la mezcla de reacción. En un segundo matraz, se disolvieron 0,346 g (2,5 mmoles) de ácido 2-furil-acrílico en isopropanol (10 ml). Después se añadieron a la reacción 0,7 ml de TEA (correspondiente a 2 equivalentes al dímero de HA), seguido de la adición de 0,30 ml de cloruro de benzoilo (correspondiente a 0,5 equivalentes de dímero de HA). La activación se llevó a cabo durante 30 minutos a temperatura ambiente (25°C). Después de eso, se añadió la solución a la primera solución (que contenía HA). La reacción se lleva a cabo durante 3 horas a temperatura ambiente. La reacción se terminó por adición de agua, y una solución de cloruro de sodio. Después se precipitó el producto con un exceso de isopropanol (250 ml). El producto se lavó una vez usando 50 ml de isopropanol (100%) después de 4 veces usando 50 ml de mezclas de isopropanol y agua (85% v / v). Finalmente, el precipitado se lavó tres veces más con IPA al 100% y se secó en un horno a 40°C. Rendimiento de la reacción 92,5%, Mw del derivado (SEC - MALLS) = $2,9 \times 10^5$ g / mol y polidispersidad = 1,65

Descripción química del derivado

[0069] Se calculó que el grado de sustitución era del 17% de acuerdo con la RMN ¹H.

RMN de ¹H (500 MHz, D₂O), δ ppm, para el enlazador: 6,40 (d, 1H), 7,18 (t, 1H), 7,47 (s, 1H), 7,62 (d, 2D HSQC (Figura 2), δ ppm: 6,4 - 114,9 (señal 1), 7,18 - 128,8 (señal 4), 7,47 - 132,2 (señal 3), 7,62 - 129,9 (señal 5), 7,95 - 139,1 (señal 2).

5 H - H COSY: señal de pico cruzado 6,40 - 7,95 ppm, 7,19 - 7,62 ppm, 7,47 - 7,19 ppm.

RMN de DOSY (500 MHz, D₂O): 6,40-7,95 ppm: -11 a -12 log (m²/s), 1,90- 4,70 ppm 11 - 12 log (m²/s)

UV / vis (0,05%; H₂O) λ_{max} = 309 nm.

Ejemplo 6 Activación de ácido 2-furil acrílico por cloruro de benzoilo y reacción con hialuronano

10 [0070] Se disolvió hialuronato sódico (1,0 g, 2,5 mmoles) con un peso molecular medio de 5,0 x 10⁵ g / mol en 17 ml de agua destilada. Isopropanol (10 ml) fue añadido lentamente a esta solución para evitar una posible precipitación del polisacárido. Posteriormente, se añadieron 1,0 ml de trietilamina correspondiente a 3 equivalentes al dímero de HA a la mezcla de reacción. En un segundo matraz, se disolvieron 0,173 g (1,25 mmol) de ácido 2-furil-acrílico en isopropanol (10 ml). Después se añadieron a la reacción 1,0 ml de TEA (correspondiente a 3 equivalentes al dímero de HA), seguido de la adición de 0,15 ml de cloruro de benzoilo (correspondiente a 0,5 equivalentes de dímero de HA). La activación se llevó a cabo durante 30 minutos a temperatura ambiente (25°C). Después de eso, se añadió la solución a la primera solución (que contenía HA). La reacción se lleva a cabo durante 3 horas a temperatura ambiente. La reacción se terminó por adición de agua, y una solución de cloruro de sodio. Después se precipitó el producto con un exceso de isopropanol (250 ml). El producto se lavó una vez usando 50 ml de isopropanol (100%) después de 4 veces usando 50 ml de mezclas de isopropanol y agua (85% v / v). Finalmente, el precipitado se lavó tres veces más con IPA al 100% y se secó en un horno a 40°C. Rendimiento de la reacción: 95,8%, Mw del derivado (SEC - MALLS) = 5,2x10⁵ g / mol y polidispersidad = 1,65

Descripción química del derivado

25 [0071] El grado de sustitución se calculó que era 14% de acuerdo con la RMN ¹H.

RMN de ¹H (500 MHz, D₂O) δ ppm, para el enlazador: 6,40 (d, 1H), 7,18 (t, 1H), 7,47 (s, 1H), 7,62 (d, 1H) 2D HSQC (Figura 2), δ ppm: 6,4 - 114,9 (señal 1), 7,18 - 128,8 (señal 4), 7,47 - 132,2 (señal 3), 7,62 - 129,9 (señal 5), 7,95 - 139,1 (señal 2).

H - H COSY: señal de pico cruzado 6,40 - 7,95 ppm, 7,19 - 7,62 ppm, 7,47 - 7,19 ppm.

30 RMN de DOSY (500 MHz, D₂O): 6,40-7,95 ppm: -11 a -12 log (m²/s), 1,90 - 4,70 ppm: -11 - 12 log (m²/s)

UV / vis (0,05%, H₂O) λ_{max} = 309 nm.

Ejemplo 7 Activación de ácido 2-furil-acrílico por cloruro de benzoilo y reacción con hialuronano

35 [0072] Se disolvió hialuronato sódico (1,0 g, 2,5 mmoles) con un peso molecular medio de 1,0 x 10⁶ g / mol en 20 ml de agua destilada. Isopropanol (10 ml) fue añadido lentamente a esta solución para evitar una posible precipitación del polisacárido. Posteriormente, se añadieron 0,7 ml de trietilamina correspondiente a 2 equivalentes al dímero de HA a la reacción mezcla. En un segundo matraz, se disolvieron 0,17 g (1,25 mmol) de ácido 2-furil-acrílico en isopropanol (10 ml). Después se añadieron a la reacción 0,7 ml de TEA (correspondiente a 2 equivalentes al dímero de HA), seguido por la adición de 0,15 ml de cloruro de benzoilo (correspondiente a 0,5 equivalentes de dímero de HA). La activación se llevó a cabo durante 30 minutos a temperatura ambiente (25°C). Después de eso, se añadió la solución a la primera solución (que contenía HA). La reacción se lleva a cabo durante 3 horas a temperatura ambiente. La reacción se terminó por adición de agua, y una solución de cloruro de sodio. Después se precipitó el producto con un exceso de isopropanol (250 ml). El producto se lavó una vez usando 50 ml de isopropanol (100%) después de 4 veces usando 50 ml de mezclas de isopropanol y agua (85% v / v). Finalmente, el precipitado se lavó tres veces más con IPA al 100% y se secó en un horno a 40°C. Rendimiento de la reacción 95,8%, Mw del derivado (SEC - MALLS) = 1..0x10⁶ g / mol y polidispersidad = 1,8

Descripción química del derivado

[0073] El grado de sustitución se calculó que era 4,8% de acuerdo con la RMN ¹H.

50 RMN de ¹H (500 MHz, D₂O) δ ppm, para el enlazador: 6,40 (d, 1H), 7,18 (t, 1H), 7,47 (s, 1H), 7,62 (d, 1H)

2D HSQC (Figura 2), δ ppm: 6,4 - 114,9 (señal 1), 7,18 - 128,8 (señal 4), 7,47 - 132,2 (señal 3), 7,62 - 129,7 (señal 5), 7,95 - 139,1 (señal 2).

H - H COSY: señal de pico cruzado 6,40 - 7,95 ppm, 7,19 - 7,62 ppm, 7,47 - 7,19 ppm.

55 RMN de DOSY (500 MHz, D₂O): 6,40-7,95 ppm: -11 a -12 log (m²/s), 1,90 - 4,70 ppm: -11-12 log (m²/s)

UV / vis (0,05%; H₂O) λ_{max} = 309 nm.

Ejemplo 8 Activación del ácido 2-furil acrílico por cloruro de benzoilo y reacción con hialuronano

5 [0074] Se disolvió hialuronato sódico (1,0 g, 2,5 mmoles) con un peso molecular medio de $1,6 \times 10^6$ g / mol en 20 ml de agua destilada. Isopropanol (10 ml) fue añadido lentamente a esta solución para evitar una posible precipitación del polisacárido. Posteriormente, se añadieron 0,7 ml de trietilamina correspondiente a 2 equivalentes al dímero de HA a la mezcla de reacción. En un segundo matraz, se disolvieron 0,17 g (1,25 mmol) de ácido 2-furil-acrílico en isopropanol (10 ml). Después se añadieron a la reacción 0,7 ml de TEA (correspondiente a 2 equivalentes al dímero de HA), seguido por la adición de 0,15 ml de cloruro de benzoilo (correspondiente a 0,5 equivalentes de dímero de HA). La activación se llevó a cabo durante 30 minutos a temperatura ambiente (25°C). Después de eso, se añadió la solución a la primera solución (que contenía HA). La reacción se lleva a cabo durante 3 horas a temperatura ambiente. La reacción se terminó por adición de agua, y una solución de cloruro de sodio. Después se precipitó el producto con un exceso de isopropanol (250 ml). El producto se lavó una vez usando 50 ml de isopropanol (100%) después de 4 veces usando 50 ml de mezclas de isopropanol y agua (85% v / v). Finalmente, el precipitado se lavó tres veces más con IPA al 100% y se secó en un horno a 40°C. Rendimiento de la reacción 95,8%, Mw del derivado (SEC - MALLS) = $1,7 \times 10^6$ g / mol y polidispersidad = 1,7

Descripción química del derivado

20 [0075] El grado de sustitución se calculó que era 4,2% de acuerdo con la RMN ^1H .
 RMN de ^1H (500 MHz, D_2O) δ ppm, para el enlazador: 6,40 (d, 1H), 7,18 (t, 1H), 7,47 (s, 1H), 7,62 (d, 1H)
 2D HSQC (Figura 2), δ ppm: 6,4 - 114,9 (señal 1), 7,18 - 128,8 (señal 4), 7,47 - 132,2 (señal 3), 7,62 - 129,7 (señal 5)
 7,95 - 139,1 (señal 2).
 H - H COSY: señal de pico cruzado 6,40 - 7,95 ppm, 7,19 7,62 ppm, 7,47 - 7,19 ppm.
 RMN de DOSY (500 MHz, D_2O): 6,40-7,95 ppm: -11 a -12 log (m^2/s), 1,90- 4,70 ppm 11 - 12 log (m^2/s)
 25 UV / vis (0,05%, H_2O) λ_{max} = 309 nm.

Ejemplo 9 Activación de ácido 2-furil acrílico por cloruro de benzoilo y reacción con hialuronano

30 [0076] Se disolvió hialuronato sódico (1,0 g, 2,5 mmol) con un peso molecular medio de $1,6 \times 10^6$ g / mol en 20 ml de agua destilada. Isopropanol (10 ml) fue añadido lentamente a esta solución para evitar una posible precipitación del polisacárido. Posteriormente, se añadieron 0,7 ml de trietilamina correspondiente a 2 equivalentes al dímero de HA a la mezcla de reacción. En un segundo matraz, se disolvieron 0,259 g (1,88 mmol) o 0,75 equivalentes de ácido 2-furil-acrílico en isopropanol (10 ml). Después se añadieron a la reacción 0,7 ml de TEA (correspondiente a 2 equivalentes al dímero de HA), seguido de la adición de 0,21 ml de cloruro de benzoilo (correspondiente a 0,75 equivalentes de dímero de HA). La activación se llevó a cabo durante 30 minutos a temperatura ambiente (0°C). Después de eso, se añadió la solución a la primera solución (que contenía HA). La reacción se lleva a cabo durante 3 horas a 60 °C. La reacción se terminó por adición de agua, y una solución de cloruro de sodio. Después se precipitó el producto con un exceso de isopropanol (250 ml). El producto se lavó una vez usando 50 ml de isopropanol (100%) después de 4 veces usando 50 ml de mezclas de isopropanol y agua (85% v / v). Finalmente, el precipitado se lavó tres veces más con IPA al 100% y se secó en un horno a 40°C. Rendimiento de la reacción 80%. El peso molecular medio del derivado se determinó como $1,59 \times 10^6$ y polidispersidad de 1,52.

Descripción química del derivado

45 [0077] El grado de sustitución se calculó que era 10% de acuerdo con la RMN de ^1H .
 RMN de ^1H (500 MHz, D_2O) δ ppm, para el enlazador: 6,40 (d, 1H), 7,18 (t, 1H), 7,47 (s, 1H), 7,62 (d, 1H)
 2D HSQC (figura 2), δ ppm: 6,4 - 114,9 (señal 1), 7,18 - 128,8 (señal 4), 7,47 - 132,2 (señal 3), 7,62 129,7 (señal 5)
 7,95 - 139,1 (señal 2).
 H - H COSY: señal de pico cruzado 6,40 - 7,95 ppm, 7,19 - 7,62 ppm, 7,47 - 7,19 ppm.
 RMN de DOSY (500 MHz, D_2O): 6,40-7,95 ppm: -11 a -12 log (m^2/s), 1,90 4,70 ppm: 11-12 log (m^2/s)
 50 UV / vis (0,05%; H_2O) λ_{max} = 309 nm.

Ejemplo 10 Activación de ácido 2-furil acrílico por cloruro de benzoilo y reacción con hialuronano

[0078] Se disolvió hialuronato sódico (1,0 g, 2,5 mmoles) con un peso molecular medio de $1,8 \times 10^6$ g / mol en 10 ml de agua destilada. Isopropanol (10 ml) fue añadido lentamente a esta solución para evitar una posible precipitación del polisacárido. Posteriormente, se añadieron 0,7 ml de trietilamina correspondiente a 2 equivalentes al dímero de HA a la

mezcla de reacción. En un segundo matraz, se disolvieron 0,34 g (2,5 mmoles) de ácido 2-furil-acrílico en isopropanol (10 ml). Después se añadieron a la reacción 0,7 ml de TEA (correspondiente a 2 equivalentes al dímero HA), seguido de la adición de 0,29 ml de cloruro de benzoílo (correspondiente a 1,0 equivalentes de dímero HA). La activación se llevó a cabo durante 30 minutos a temperatura ambiente (25°C). Después de esto, la solución se filtró y se añadió a la primera solución (que contenía HA). La reacción se lleva a cabo durante 2 horas a 40°C. La reacción se terminó por adición de agua, y una solución de cloruro de sodio. Después se precipitó el producto con un exceso de isopropanol (250 ml). El producto se lavó una vez con IPA, después con una solución IPA: agua (85% v / v, 4 x 50 ml). Finalmente, el precipitado se lavó tres veces más con IPA al 100% y se secó en un horno a 40°C. Rendimiento de la reacción 99%, Mw del derivado (SEC - MALLS) se determinó como $1,82 \times 10^6$ y polidispersidad = 1,61

Descripción química del derivado

[0079] Grado de sustitución (correspondiente al 12% de grupos fotorreactivos)

RMN de ^1H (500 MHz, D_2O), δ ppm, para el enlazador: 6,40 (d, 1H), 7,18 (t, 1H), 7,47 (s, 1H), 7,62 (d, 1H)

2D HSQC, δ ppm: 6,4 - 114,9 (señal 1), 7,18 - 128,8 (señal 4), 7,47 - 132,2 (señal 3), 7,62 - 129,9 (señal 5), 7,95 - 139,1 (señal 2).

H - H COSY: señal de pico cruzado 6,40 - 7,95 ppm, 7,19 - 7,62 ppm, 7,47 - 7,19 ppm.

RMN de DOSY (500 MHz, D_2O): 6,40-7,95 ppm: -11 a -12 log (m^2/s), 1,90- 4,70 ppm: -11-12 log (m^2/s)

UV / vis (0,05%, H_2O) λ_{max} = 309 nm.

Ejemplo 11 Activación de ácido 3- (2-furil) acrílico por cloruro de 2, 4, 6-triclorobenzoílo y reacción con hialuronano

[0080] Se disolvió hialuronato sódico (30 g, 75 mmol) con un peso molecular medio de 1×10^6 g / mol en 1000 ml de agua destilada. Se añadieron lentamente THF (1000 moles) a esta solución para evitar una posible precipitación del polisacárido. Posteriormente, se añadieron 21 ml de trietilamina (TEA) a la mezcla de reacción (correspondiente a 2 equivalentes al dímero de HA). En un segundo matraz, se disolvieron 5,18 (37,4 mmol) de ácido 2-furfuril-acrílico en THF (300 ml). Después de que se añadieron a la reacción, seguido de la adición de 0,4 ml de 2, 4, cloruro de 6-triclorobenzoílo (correspondiente a 0,5 equivalentes a HA dímero) 21 ml de TEA (correspondiente a 2 equivalentes a HA dímero). La activación se llevó a cabo durante 30 minutos. Después de esto, la solución filtrada (parte soluble) se añadió a la primera solución (que contenía HA). La reacción se lleva a cabo durante 3 horas a temperatura ambiente. La reacción se terminó por adición de agua, y una solución de cloruro de sodio. El producto se lavó una vez con IPA, después con una solución IPA: agua (85% v / v, 4 x 500 ml). Finalmente, el precipitado se lavó tres veces más con IPA al 100% y se secó en un horno a 40°C. Para todas las reacciones, se indica "rendimiento de la reacción". Rendimiento de la reacción: 98% (promedio de tres repeticiones).

Descripción química del derivado

[0081] Grado de sustitución (correspondiente al 3% de grupos fotosensibles)

RMN de ^1H (500 MHz, D_2O), δ ppm, para el enlazador: 6,40 (d, 1H), 7,18 (t, 1H), 7,47 (s, 1H), 7,62 (d, 1H)

2D HSQC, δ ppm: 6,4 - 114,9 (señal 1), 7,18 - 128,8 (señal 4), 7,47 - 132,2 (señal 3), 7,62 - 129,9 (señal 5), 7,95 - 139,1 (señal 2).

H - H COSY: señal de pico cruzado 6,40 - 7,95 ppm, 7,19 - 7,62 ppm, 7,47 - 7,19 ppm.

RMN de DOSY (500 MHz, D_2O) 6,40 - 7,95 ppm: -11 a -12 log (m^2/s), 1,90 - 4,70 ppm: -11 - 12 log (m^2/s).

UV / vis (0,05%; H_2O) λ_{max} = 309 nm.

Ejemplo 12 Activación de ácido 3- (2-furil) acrílico por cloruro de 2, 4, 6-triclorobenzoílo y reacción con hialuronano

[0082] Se disolvió hialuronato sódico (30 g, 75 mmol) con un peso molecular medio de $8,5 \times 10^4$ g / mol en 600 ml de agua destilada. Se añadieron lentamente THF (300 ml) a esta solución para evitar una posible precipitación del polisacárido. Posteriormente, se añadieron 21 ml de trietilamina (TEA) a la mezcla de reacción (correspondiente a 2 equivalentes al dímero de HA). En un segundo recipiente, se disolvieron 10,36 g (75 mmol) de ácido 2-furfuril-acrílico en THF (300 ml). Después se añadieron a la reacción 21 ml de ETA (correspondiente a 2 equivalentes al dímero de HA), seguido de la adición de 12 ml de cloruro de 2, 4,6-triclorobenzoílo (correspondiente a 1 equivalente al dímero de HA). La activación se llevó a cabo durante 30 minutos. Después de esto, la solución filtrada (parte soluble) se añadió a la primera solución (que contenía HA). La reacción se lleva a cabo durante 3 horas a temperatura ambiente. La reacción se terminó por adición de agua, y una solución de cloruro de sodio. El producto se lavó una vez con IPA, después con una solución IPA: agua (85% v / v, 4 x 500 ml). Finalmente, el precipitado se lavó tres veces más con IPA al 100% y se secó en un horno a 40°C. Para todas las reacciones, se indica "rendimiento de la reacción". Esto significa el porcentaje de ganancia/pérdida del producto en comparación con la cantidad de HA-Na en la reacción. Un rendimiento de la

reacción fue 91% (promedio de tres reacciones). Determinación del peso molecular por SEC-MALLS es $9,0 \times 10^4$ g / mol y polidispersidad = 1,52

Descripción química del derivado

- 5 **[0083]** Grado de sustitución (correspondiente al 6,2% de grupos fotosensibles)
 RMN de ^1H (500 MHz, D_2O) δ ppm, para el engarce: 6,40 (d, 1H), 7,18 (t, 1H), 7,47 (s, 1H), 7,62 (d, 1H)
 2D HSQC, δ ppm: 6,4 - 114,9 (señal 1), 7,18 - 128,8 (señal 4), 7,47 - 132,2 (señal 3), 7,62 - 129,9 (señal 5), 7,95 - 139,1 (señal 2).
 H - H COSY: señal de pico cruzado 6,40 - 7,95 ppm, 7,19 - 7,62 ppm, 7,47 - 7,19 ppm.
 10 RMN de DOSY (500 MHz, D_2O): 6,40-7,95 ppm: -11 a -12 log (m^2/s), 1,90- 4,70 ppm: -11-12 log (m^2/s)
 UV / vis (0,05%; H_2O) λ_{max} = 309 nm.

Ejemplo 13 Activación del ácido 3- (2-furil) acrílico por cloruro de benzoilo y reacción con hialuronano

- 15 **[0084]** Se disolvió hialuronato sódico (30 g, 75 mmol) con un peso molecular medio de $8,5 \times 10^4$ g / mol en 600 ml de agua destilada. Se añadieron lentamente THF (300 ml) a esta solución para evitar una posible precipitación del polisacárido. Posteriormente, se añadieron 31 ml de trietilamina (TEA) a la mezcla de reacción (correspondiente a 3 equivalentes al dímero de HA). En un segundo matraz, se disolvieron 20,73 g de ácido 2 furfurilacrílico correspondiente a 2 equivalentes de dímero HA en THF (300 ml). Después se añadieron a la reacción 31 ml de TEA (correspondiente a 3 equivalentes al dímero HA), seguido de la adición de 0,2 ml de cloruro de benzoilo (correspondiente a 2 equivalentes al dímero HA). La activación se llevó a cabo durante 30 minutos a 0°C. Después de esto, la solución filtrada (parte soluble) se añadió a la primera solución (que contenía HA). La reacción se lleva a cabo durante 3 horas a 0 ° C. La reacción se terminó por adición de agua, y una solución de cloruro de sodio. Después se precipitó el producto con un exceso de isopropanol (1000 ml). El producto se lavó una vez con IPA, después con una solución IPA: agua (85% v / v, 4 x 500 ml). Finalmente, el precipitado se lavó tres veces más con IPA al 100% y se secó en un horno a 40°C. La determinación del peso molecular por SEC-MALLS es $9,0 \times 10^4$ g / mol y polidispersidad = 1,52.
- 20
- 25

Descripción química del derivado

- [0085]** Grado de sustitución (que corresponde a $18 \pm 2\%$ de grupos fotosensibles)
 RMN de ^1H (500 MHz, D_2O), δ ppm, para el enlazador: 6,40 (d, 1H), 7,18 (t, 1H), 7,47 (s, 1H), 7,62 (d, 1H)
 30 2D HSQC, δ ppm: 6,4 - 114,9 (pico cruzado, señal 1), 7,18 - 128,8 (señal 4), 7,47 - 132,2 (señal 3), 7,62 - 129,7 (señal 5),
 7,95 - 139,1 (señal 2).
 H - H COSY: señal de pico cruzado 6,40 - 7,95 ppm, 7,19 - 7,62 ppm, 7,47 - 7,19 ppm.
 RMN de DOSY (500 MHz, D_2O): 6,40-7,95 ppm: -11 a -12 log (m^2/s), 1,90- 4,70 ppm: -11 -12 log (m^2/s)
 35 UV / vis (0,05%; H_2O) λ_{max} = 309 nm.

Ejemplo 14 Activación de ácido 3- (2-furil) acrílico por cloruro de 2, 4, 6-triclorobenzoilo y adición a Hyaluronano, en donde la reacción es catalizada por OMAP

- 40 **[0086]** Se disolvió hialuronato sódico (30 g, 75 mmol) con un peso molecular medio de $8,5 \times 10^4$ g / mol en 600 ml de agua destilada. Se añadieron lentamente THF (300 ml) a esta solución para evitar una posible precipitación del polisacárido. Posteriormente, se añadieron 31 ml de trietilamina (TEA) a la mezcla de reacción (correspondiente a 3 equivalentes al dímero de HA), seguido de 0,458 g de 4-dimetil aminopiridina (DMAP), correspondiente a 0,05 equivalentes de dímero de HA. En un segundo matraz, se disolvieron 31 g de ácido 2 furfurilacrílico correspondiente a 3 equivalentes de dímero de HA en THF (300 ml). Después se añadieron a la reacción 31 ml de TEA (correspondiente a 3 equivalentes al dímero HA), seguido de la adición de 35,1 ml de cloruro de 2, 4, 6 triclorobenzoilo (correspondiente a 3 equivalentes al dímero HA). La activación se llevó a cabo durante 30 minutos. Después de esto, la solución filtrada (parte soluble) se añadió a la primera solución (que contenía HA). La reacción se lleva a cabo durante 3 horas a temperatura ambiente. La reacción se terminó por adición de agua, y una solución de cloruro de sodio. Después se precipitó el producto con un exceso de isopropanol (1000 ml). El producto se lavó una vez con IPA, después con una solución IPA: agua (85% v / v, 4 x 250 ml). Finalmente, el precipitado se lavó tres veces más con IPA al 100% y se secó en un horno a 40°C. Para todas las reacciones, hemos informado de "rendimiento de la reacción". Esto significa el porcentaje de ganancia / pérdida del producto en comparación con la cantidad de HA-Na en la reacción. Rendimiento de la reacción: 99%. Debido a la alta viscosidad del derivado, el peso molecular no puede determinarse por la metodología SEC-MALLS debido a la posible reticulación.
- 45
- 50

55

Descripción química del derivado

[0087] Grado de sustitución (correspondiente al 30-40% de grupos fotosensibles)

RMN de ^1H (500 MHz, D_2O), δ ppm, para el enlazador: 6,40 (d, 1H), 7,18 (t, 1H), 7,47 (s, 1H), 7,62 (d,

2D HSQC, δ ppm: 6,4 - 114,9 (señal 1), 7,18 - 128,8 (señal 4), 7,47 - 132,2 (señal 3), 7,62 - 129,9 (señal 5), 7,95 - 139,1 (señal 2).

H - H COSY: señal de pico cruzado 6,40 - 7,95 ppm, 7,19 - 7,62 ppm, 7,47 - 7,19 ppm.

RMN de DOSY (500 MHz, D_2O): 6,40-7,95 ppm: -11 a -12 log (m^2/s), 1,90 - 4,70 ppm: -11 - 12 log (m^2/s)

UV / vis (0,05%, H_2O) $\lambda_{\text{max}} = 309$ nm.

Ejemplo 15 Activación de ácido 2-tienil acrílico por cloruro de 2, 4, 6-triclorobenzoilo y reacción con hialuronano

[0088] Se disolvió hialuronato sódico (5,0 g, 12,5 mmol) con un peso molecular medio de $1,01 \times 10^5$ g / mol en 100 ml de agua destilada. Se añadieron lentamente THF (50 ml) a esta solución para evitar una posible precipitación del polisacárido. Posteriormente, se añadieron 3,5 ml de trietilamina correspondiente a 2 equivalentes al dímero de HA a la mezcla de reacción. En un segundo matraz, se disolvió 1,0 g de ácido 2-tienil-acrílico en THF (50 ml). Después se añadieron a la reacción 2,5 ml de TEA (correspondiente a 3 equivalentes al dímero HA), seguido por la adición de 0,95 ml de cloruro de benzoilo (correspondiente a 0,5 equivalentes de dímero de HA). La activación se llevó a cabo durante 30 minutos a 60°C. Después de esto, la solución se filtró y se añadió a la solución que contenía HA. La mezcla de reacción se agitó durante 3 horas a 60 °C. La reacción se terminó por adición de agua, y una solución de cloruro de sodio. Después se precipitó el producto con un exceso de isopropanol (250 ml). El producto se lavó una vez con IPA, después con una solución IPA: agua (85% v / v, 4 x 50 ml). Finalmente, el precipitado se lavó tres veces más con IPA al 100% y se secó en un horno a 40°C. Rendimiento de la reacción 92,18%, Mw del derivado (SEC - MALLS) = $1,08 \times 10^5$ y polidispersidad = 1,482

Descripción química del derivado

[0089] Grado de sustitución (correspondiente al 5% de grupos fotosensibles)

RMN de ^1H (500 MHz, D_2O), δ ppm, para el enlazador: 6,40 (d, 1H), 7,18 (t, 1H), 7,47 (s, 1H), 7,62 (d, 1H)

2D HSQC, δ ppm: 6,4 - 114,9 (señal 1), 7,18 - 128,8 (señal 4), 7,47 - 132,2 (señal 3), 7,62 - 129,9 (señal 5), 7,95 - 139,1 (señal 2).

H - H COSY: señal de pico 6,40 - 7,95 ppm, 7,19 - 7,62 ppm, 7,47 - 7,19 ppm.

RMN de DOSY (500 MHz, D_2O): 6,40-7,95 ppm: -11 a -12 log (m^2/s), 1,90- 4,70 ppm: -11 -12 log (m^2/s)

UV / vis (0,05%; H_2O) $\lambda_{\text{max}} = 314$ nm.

Ejemplo 16. Activación de ácido 3- (2-tienil) acrílico por cloruro de 2, 4, 6-triclorobenzoilo y adición a Hyaluronano, en donde la reacción es catalizada por OMAP

[0090] Se disolvió hialuronato sódico (5,0 g, 12,5 mmol) con un peso molecular medio de $1,01 \times 10^5$ g / mol en 100 ml de agua destilada. Se añadieron lentamente THF (50 ml) a esta solución para evitar una posible precipitación del polisacárido. Posteriormente, se añadieron a la mezcla de reacción 5,2 ml de trietilamina correspondiente a 3 equivalentes al dímero de HA, seguido de 0,076 g de 4-dimetilaminopiridina (DMAP). En un segundo matraz, se disolvieron 6,36 g de ácido 2-tienil-acrílico en THF (50 ml). Después se añadieron a la reacción 5,2 ml de TEA (correspondiente a 3 equivalentes al dímero HA), seguido de la adición de 5,8 ml de cloruro de 2, 4,6 triclorobenzoilo (correspondiente a 3 equivalentes de dímero HA). La activación se llevó a cabo durante 30 minutos a temperatura ambiente (25 °C). Después de esto, la solución se filtró y se añadió a la primera solución (que contenía HA). La reacción se lleva a cabo durante 3 horas a temperatura ambiente. La reacción se terminó por adición de agua, y una solución de cloruro de sodio. El producto se lavó una vez con IPA, después con una solución IPA: agua (85% v / v, 4 x 50 ml). Finalmente, el precipitado se lavó tres veces más con IPA al 100% y se secó en un horno a 40°C. Rendimiento de la reacción: 95%. Debido a la alta viscosidad del derivado, el peso molecular no puede ser determinado por la metodología SEC-MALLS.

Descripción química del derivado

[0091] Grado de sustitución (correspondiente al 30% de grupos fotosensibles)

RMN de ^1H (500 MHz, D_2O), δ ppm, para el enlazador: 6,40 (d, 1H), 7,18 (t, 1H), 7,47 (s, 1H), 7,62 (d, 1H)

2D HSQC, δ ppm: 6,4 - 114,9 (señal 1), 7,18 - 128,8 (señal 4), 7,47 - 132,2 (señal 3), 7,62 - 129,7 (señal 5), 7,95 - 139,1 (señal 2).

H - H COSY: señal de pico 6,40 - 7,95 ppm, 7,19 - 7,62 ppm, 7,47 - 7,19 ppm.

RMN de DOSY (500 MHz, D_2O): 6,40-7,95 ppm: -11 a -12 log (m^2/s), 1,90- 4,70 ppm: -11 -12 log (m^2/s)

UV / vis (0,05%, H_2O) $\lambda_{\text{max}} = 314$ nm.

Ejemplo 17 Activación del ácido 3- (2-furanil) acrílico por cloruro de 4-metoxibenzoílo y reacción con hialuronano

5 [0092] Se disolvieron 1,0 g de sal sódica de ácido hialurónico (2,5 mmol, $8,5 \times 10^4$ g / mol) en 20 ml de agua destilada. Se añadió lentamente tetrahidrofurano (10 ml) a esta solución seguido de 0,7 ml de trietilamina (5 mmol). En un segundo matraz se solubilizaron 0,17 g de ácido furil acrílico (1,25 mmol) en 10 ml de tetrahidrofurano, después de 5 minutos de mezclado se añadieron 0,7 ml de trietilamina (TEA), seguido de 0,17 ml de cloruro de p-metoxi benzoílo (1,25 mmol). Se dejó que la activación se produjera durante 30 minutos. Después de eso, se añadió la segunda solución a la primera (que contenía ácido hialurónico). La mezcla se dejó reaccionar durante 2 horas a temperatura ambiente. A
10 continuación, se añadieron 200 ml de isopropanol absoluto, seguido de 1 ml de una solución super saturada de cloruro sódico. El producto se lavó 3 veces con isopropanol al 100%, y 4 veces con una solución de isopropanol: agua (85:15) y 2 veces más con isopropanol al 100%. El producto de reacción se secó en una estufa durante la noche y se caracterizó. La determinación del peso molecular por SEC MALLS es $9,5 \times 10^4$ g / mol y polidispersidad = 1,52

15 Descripción química del derivado

[0093] Grado de sustitución (correspondiente al 1% de grupos fotosensibles)

RMN de ^1H (500 MHz, D_2O), δ ppm, para el enlazador: 6,40 (d, 1H), 7,18 (t, 1H), 7,47 (s, 1H), 7,62 (d, 1H)
20 UV / vis (0,05%; H_2O) λ -max = 309 nm.

Ejemplo 18 Activación del ácido 3- (2-furanil) acrílico por cloruro de 4-nitrobenzoílo y reacción con hialuronano

[0094] Se disolvieron 1,0 g de sal sódica de ácido hialurónico (2,5 mmoles, 5×10^3 g / mol) en 20 ml de agua destilada. A esta solución se añadieron lentamente 10 ml de tetrahidrofurano seguido por 0,7 ml de trietilamina (5 mmol). En un
25 segundo matraz, se solubilizaron 0,17 g de ácido furil acrílico (1,25 mmol) en 10 ml de tetrahidrofurano, después de 5 minutos de mezclado se añadieron 0,7 ml de trietilamina (TEA), seguido de 0,23 g de cloruro de p-nitro-benzoílo 1,25 mmol). Se dejó que la activación se produjera durante 30 minutos. Después de eso, se añadió la segunda solución a la primera (que contenía ácido hialurónico). La mezcla se dejó reaccionar durante 2 horas a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron 200 ml de isopropanol absoluto, seguido de 1 ml de una solución super saturada de cloruro sódico. El producto se lavó 3 veces con isopropanol absoluto y 4 veces con una solución de isopropanol: agua (85:15) y
30 2 veces con isopropanol absoluto. El producto de reacción se secó en una estufa durante la noche y se caracterizó. La determinación del peso molecular por SEC-MALLS es de $5,5 \times 10^3$ g / mol y la polidispersidad = 1,52

Descripción química del derivado

[0095] Grado de sustitución (correspondiente al 1% de grupos fotosensibles)

35 RMN de ^1H (500 MHz, D_2O), δ ppm, para el enlazador: 6,40 (d, 1H), 7,18 (t, 1H), 7,47 (s, 1H), 7,62 (d, 1H)
UV / vis (0,05%; H_2O) λ -max = 309 nm.

Ejemplo 19 Activación del ácido trans-3- (3-piridil) acrílico y reacción con hialuronano

[0096] Se disolvieron 1,0 g de sal sódica de ácido hialurónico (2,5 mmoles, $8,5 \times 10^4$ g / mol) en 20 ml de agua
40 destilada. Se añadió lentamente isopropanol (10 ml) a esta solución, seguido de 0,7 ml de trietilamina (5 mmol). En un segundo matraz se solubilizaron 0,19 g de ácido trans-3- (3-piridil) acrílico (1,25 mmol) en 10 ml de isopropanol, después de 5 minutos de mezclado se añadieron 0,8 ml de diisopropiletilamina (DIPEA), seguido de 0,15 ml de cloruro de benzoílo (1,25 mmol). Se permitió la activación durante 30 minutos. Después de eso, se añadió la segunda solución a la primera (que contenía ácido hialurónico). La mezcla se dejó reaccionar durante 2 horas a temperatura ambiente. A
45 continuación, se añadieron 200 ml de isopropanol absoluto, seguido de 1 ml de una solución super saturada de cloruro sódico. El producto se lavó 3 veces con isopropanol absoluto y 4 veces con una solución de isopropanol: agua (85:15) y 2 veces con isopropanol absoluto. El producto de reacción se secó en una estufa durante la noche y se caracterizó. La determinación del peso molecular por SEC-MALLS es de $9,0 \times 10^4$ g / mol y la polidispersidad = 1,6. El grado de sustitución se determinó como 9% (correspondiente a la cantidad de grupos fotosensibles). Los espectros de RMN ^1H
50 se representan en la Figura 2.

Descripción química del derivado

[0097] RMN de ^1H (500 MHz, D_2O) δ ppm, para el engarce: 6,74 (d, 1H, J = 15,9), 7,53 (m, 1H), 7,70 (d, 1H, J = 17,5), 8,09 (1H), 8,55 (m, 1H), 8,76 (m, 1H).

UV / vis (0,05%; H₂O) $\lambda_{\text{max}} = 263 \text{ nm}$.

Ejemplo 20 Activación del ácido 3- (4-imidazolil) acrílico y reacción con hialuronano

5 **[0098]** Se disolvieron 1,0 g de sal sódica de ácido hialurónico (2,5 mmol, $8,5 \times 10^4 \text{ g / mol}$) en 20 ml de agua destilada. Se añadió lentamente Isopropanol (10 ml) a esta solución, seguido de 0,7 ml de trietilamina (5 mmol). En un segundo destello, se solubilizaron 0,173 g de ácido 3- (4-imidazolil) acrílico (1,25 mmol) en 10 ml de isopropanol, después de 5 minutos de mezclado se añadieron 0,7 ml de trietilamina (TEA), seguido de 0,15 ml de benzoil cloruro (1,25 mmol). Se dejó que la activación se produjera durante 30 minutos. Después de eso, se añadió la segunda solución a la primera (que contenía ácido hialurónico). La mezcla se dejó reaccionar durante 2 horas a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron 200 ml de isopropanol absoluto, seguido de 1 ml de una solución super saturada de cloruro sódico. El producto se lavó 3 veces con isopropanol absoluto y 4 veces con una solución de isopropanol: agua (85:15) y 2 veces con isopropanol absoluto. El producto de reacción se secó en una estufa durante la noche y se caracterizó.

15 Descripción química del derivado

[0099] Grado de sustitución (correspondiente al 5% de grupos fotosensibles)

RMN de ¹H (500 MHz, D₂O), δ ppm, para el enlazador: 6,40 (m, 1H), 7,30 (m, 1H), 7,38 (m, 1H), 7,52 (2H), 7,71 (m, 1H) 1H).

UV / vis (0,05%; H₂O) $\lambda_{\text{máx}} = 286 \text{ nm}$.

20

Ejemplo 21 Activación de ácido fenilacrílico por cloruro de benzoilo y reacción con ácido hialurónico

25 **[0100]** Se disolvieron 1,0 g de sal sódica de ácido hialurónico (2,5 mmoles, $5 \times 10^3 \text{ g / mol}$) en 10 ml de agua destilada. Se añadió lentamente isopropanol (5 ml) a esta solución, seguido de 0,7 ml de trietilamina (5 mmol). En un segundo matraz, se disolvieron 0,37 g de ácido fenilacrílico (2,5 mmoles) en 5 ml de isopropanol, después de 5 minutos de mezclado se añadieron 0,7 ml de trietilamina (5 mmol), seguido de 0,29 ml de cloruro de benzoilo (2,5 mmoles). La activación se llevó a cabo durante 30 minutos. Después de eso, se añadió la segunda solución a la primera (que contenía ácido hialurónico). La mezcla se dejó reaccionar durante 2 horas a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron 200 ml de isopropanol absoluto, seguido de 1 ml de una solución super saturada de cloruro sódico. El producto se lavó 3 veces con isopropanol absoluto, y 4 veces con una solución de isopropanol: agua (85: 15) y 2 veces con isopropanol absoluto. El producto de reacción se secó en una estufa durante la noche y se caracterizó.

30

Descripción química del derivado

[0101] Grado de sustitución (correspondiente al 9% de grupos fotosensibles)

35 RMN de ¹H (500 MHz, D₂O), δ ppm, para el enlazador: 6,64 (d, J = 16,4, 1H), 7,50 (s ancho, 3H), 7,70 (m, 2H), 7,22 = 16,5, 1H).

UV / vis (0,05%; H₂O) $\lambda_{\text{max}} = 281 \text{ nm}$.

Ejemplo 22. Obtención de nanofibras que comprenden HA nativo y derivados éster de HA

40 **[0102]** Se prepara una disolución disolviendo los derivados descritos en la Tabla 1. Así, las soluciones que tienen una concentración del derivado éster particular de HA de los ejemplos descritos anteriormente y óxido de polietileno era de 5% (p / v) en agua, manteniendo una proporción de 80:20 (HA / PEO de $4 \times 10^5 \text{ / g / mol}$) y se utilizaron. Estas capas de nanofibras se formaron a partir de estas soluciones. El electrohilado se realizó utilizando una multi-boquilla ancha utilizando el dispositivo 4spin® (CONTIPRO, Biotech s.r.o.). Sin embargo, la producción de las nanofibras no está limitada a ese dispositivo. Las nanofibras se produjeron utilizando un electrodo colector a una distancia de 20 cm y una tensión eléctrica variable de 60-80 kV. Y una tensión superficial de la solución ($58,1 \text{ mN.m}^{-1}$). La conductividad y la viscosidad de las soluciones producidas se reanuda en la Tabla 1. Se pueden obtener nanofibras de diferentes tamaños de diámetro de 99 a 150 nm (ver Tabla 1). La microestructura de las nanofibras se caracterizó por SEM (como ejemplo seleccionado, la microestructura del derivado con un grado de sustitución del 5% correspondiente a los ejemplos anteriores se muestra en las Figuras 3 y 4, respectivamente). La tabla contiene también una muestra de referencia de nanofibras obtenida a base de ácido hialurónico nativo (en la entrada 1) y los derivados de éster preparados en los ejemplos descritos anteriormente que formaron (Ejemplos 2,3,4, 12,13) o nanofibras no formadas (descrito en los Ejemplos 14, 16). En los dos últimos ejemplos se utiliza el catalizador tóxico DMAP que induce la auto-reticulación de los derivados antes de electrohilado. Las nanofibras fueron al menos preparadas tres veces independientes.

55

Tabla 1. Parámetros de procesamiento de HA y Hialuronato de 3- (2-furanil) acrilato de sodio como se describe en los ejemplos anteriores.

Ejemplos	Foto DS(%)	Viscosidad	Conductividad eléctrica $\mu\text{S cm}^{-1}$	Diámetro de fibra promedio (nm)
HA+PEO (400,000)	0	3.54	6.2-7.3	109.1-121.68
2	4.2±2	1.25	4.1	133.1
3	5.3±2	1.40	4.9	120.7± 10
12	6.2±2	1.54	4.5	127.4
4	10±2	1.79	4.9	126.5±3.5
13	18±2	1.85	4.4	141.5±15.9
14,16	30-40	3.5	4.2	no
no= noobtenido				

5 **Ejemplo 23. Obtención de nanofibras que comprenden el derivado éster de HA preparado en el Ejemplo 3 y diferente composición de óxido de polietileno**

10 **[0103]** La solución de hilatura se preparó disolviendo los derivados del Ejemplo 3, caracterizados por un peso molecular de $8,6 \times 10^4$ g / mol y un óxido de polietileno de peso molecular de 6×10^5 g / mol en agua. La solución se preparó
 15 agitando durante 8 horas. La concentración utilizada fue de 9,7% (p / p) y la relación en peso de HA / PEO fue (74/26). El hilado se realizó por electrohilado de una multi-boquilla ancha en el dispositivo 4Spin® de Contipro Biotech sro, en el que el electrodo colector tenía una tensión eléctrica entre (60 a 80) kV, la solución había mostrado una tensión superficial de solución de 55,1 mN.m⁻¹ y una conductividad de 7,35 mS.cm⁻¹, y una viscosidad de 6,72 Pa.s. El diámetro medio de las nanofibras hiladas electrostáticamente detectadas por microscopía electrónica de barrido y análisis de imágenes fue de aproximadamente 261 nm.

Ejemplo 24 Obtención de nanofibras que comprenden el derivado éster de HA en el Ejemplo 3 y alcohol polivinílico

20 **[0104]** Una disolución se prepara disolviendo los derivados descritos en el Ejemplo 3. Así, se formó una concentración de 5% (p / p en agua y alcohol polivinílico (PVA) de peso molecular 4×10^5 g / mol manteniendo una relación de 80:20 (HA / PVA). Estas capas de nanofibras se formaron a partir de estas soluciones. El electrohilado se realizó utilizando una
 25 multi-boquilla ancha utilizando el dispositivo 4spin® (CONTIPRO, Biotech sro), sin embargo, la producción de las nanofibras no se limita a ese dispositivo. Las nanofibras se produjeron utilizando un electrodo colector a una distancia de 20 cm y una tensión eléctrica variable de 60-80 kV, y una tensión superficial de la solución (58,1 mN.m⁻¹) y una conductividad de 7,35 mS.cm⁻¹, y una viscosidad de 6,5 Pa.s. La microestructura de nanofibras hiladas electrostáticamente se muestra en la Figura 5

30 **Ejemplo 25. Obtención de nanofibras que comprenden el derivado éster de HA en el Ejemplo 3 y polivinilpirrolidona**

35 **[0105]** Se prepara una solución disolviendo los derivados descritos en el Ejemplo 3 en una mezcla 1: 1 de agua y etanol. De este modo, se formó una concentración de 5% (p / p en agua y polivinilpirrolidona (PVP) de peso molecular 4×10^5 g / mol, manteniendo una proporción de 80:20 (HA / PVP) a partir de estas soluciones. se realizó utilizando una multi-boquilla ancha utilizando el dispositivo 4spin® (CONTIPRO, Biotech sro). Sin embargo, la producción de las nanofibras no se limita a ese dispositivo. Las nanofibras se produjeron utilizando un electrodo colector a una distancia de 20 cm y tensión eléctrica variable de 60-80kV.

Ejemplo 26. Obtención de nanofibras que comprenden derivados éster de HA y PEO

5 [0106] Se prepara una solución disolviendo los derivados descritos en el ejemplo 15 o con el derivado descrito en el ejemplo 20. Por lo tanto, las soluciones que tienen una concentración de este derivado éster particular de HA de los ejemplos anteriormente descritos y óxido de polietileno era 5% (w / v) en agua, manteniendo una proporción de 80:20 (HA / PEO de 4×10^5 g / mol) se prepararon y se usaron. Estas capas de nanofibras se formaron a partir de estas soluciones. El electrohilado se realizó utilizando una multi-boquilla ancha utilizando el dispositivo 4spin® (CONTIPRO, Biotech s.r.o.). Sin embargo, la producción de las nanofibras no está limitada a ese dispositivo. Las nanofibras se produjeron utilizando un electrodo colector a una distancia de 20 cm y una tensión eléctrica variable de 60-80 kV.

Ejemplo	FotoDS (%)	Viscosidad Pa.s	Conductividad eléctrica $\mu\text{S cm}^{-1}$	Diámetro de fibra promedio
15	5±2	1.29	4.8	99.58 ± 10.9
20	5±2	1.35	5.2	100.22 ± 4.4

10 Ejemplo 27. Reticulación inducida por UV de nanofibras

15 [0107] Se prepararon diferentes especímenes de esterillas de nanofibras como se describe en el Ejemplo 22 y se expusieron a irradiación UV dentro de un horno diseñado por Eppendorf Czech & Slovakia s.r.o bajo la designación CL-1000 (302 nm). Este dispositivo proporciona una radiación UV uniforme en la región UV / Vis del espectro que es usualmente de 280 a 315 nm con una potencia constante (aproximadamente $6,75 \text{ mW.cm}^{-2}$). El valor máximo de la energía de radiación relativa se declara a una longitud de onda de 302 nm. La radiación UV es emitida por cinco tubos paralelos de descarga de gas, cada uno de los cuales tiene una salida de 8 vatios situada debajo de la pared superior. La dosis de radiación fue $E = 24300 \mu\text{J.cm}^{-2}$ y a una potencia constante ($6,75 \text{ mW.cm}^{-2}$). Las nanofibras se exponen durante 5, 10, 20, 30 y 60 minutos durante 10 o 60 minutos. La microestructura de las nanofibras después de la hinchazón en PBS correspondiente al ejemplo 3 sobre la mesa 1, se muestra en la figura 6.

Ejemplo 28. Cálculo del contenido de agua del material de nanofibras obtenido de las mismas

25 [0108] Las muestras de forma circular con un diámetro medio de 5,0 cm se cortaron con una herramienta especial. El área de las muestras se determinó como 0,0078 metros cuadrados. Para ser más precisos, la cantidad inicial de derivado se ponderó para tener en todos los casos aproximadamente 0,2 g ó 0,5 g por muestra respectivamente. A continuación, las muestras se sumergieron en agua desmineralizada o solución salina con una concentración de 0,9% (p / v) de cloruro sódico disuelto en agua. Las muestras se sumergieron en un volumen definido de 30 ml para 0,5 g de muestra y 12 ml en el caso de 0,2 g de muestra durante 5 minutos. Después de sumergir el material, la muestra se filtra a través de una malla (tamaño de poro de 90-160 μm). El material se ponderó a continuación, de manera que se determinó la cantidad de agua absorbida o solución salina (w_s). La absorción de agua se determina por la fórmula $Q_w = (w_d - w_s / w_d) \times 100$. Donde w_d y w_s son el peso de las muestras secas e hinchadas, respectivamente.

Hinchazón de los medios	Peso inicial (g)	Tiempo de reticulación (m)	Absorción de agua Q_w
H ₂ O	0.2	10	20.0
H ₂ O	0.5	10	20.6
0.9% (w/v) NaCl	0.2	10	10.2
0.9% (w/v) NaCl	0.2	60	17.1

Ejemplo 29 Ensayo de viabilidad de células del éster de furan-2-acrilato sódico de hialuronano

35 [0109] La biocompatibilidad de los ésteres de ácido hialurónico preparada como se describe en los ejemplos descritos anteriormente (1-9) se examinaron usando en líneas celulares 3T3-NIH. Por lo tanto, se disolvió 0,1 (p / v) % de solución del derivado en medios de cultivo de células completos mezclando a fondo (durante la noche). Después de esto, la solución se filtró a través de un dispositivo de filtración estéril (0,22 μm), formando concentraciones finales del derivado tal como 1, 0,5 y 0,1 mg / ml. Se sembraron 3000 líneas de células (3T3-NIH) en pocillos de placas de ensayo de 96 pocillos. Las células se cultivaron durante 24 horas antes de tratarse con las soluciones analizadas. La viabilidad celular

se midió 0, 24, 48, 72 horas después del tratamiento usando el ensayo de bromuro de 3- (4,5 - dimetiliazol - 2 - il) - 2,5 - difeniltetrazolio (MTT). Brevemente, se añadieron 20 µl de solución madre de MTT (5 mg / ml) a 200 µl de medio de cultivo celular en cada pocillo. Las placas se incubaron a 37°C en una incubadora de cultivo celular durante 2,5 horas. La solución de MTT se eliminó y se añadieron 220 µl de solución de lisis. Las células se lisaron durante 30 minutos a temperatura ambiente en un agitador orbital y la densidad óptica se midió mediante el lector de microplacas VERSAmax a 570 nm. El diseño del experimento se completó con un conjunto de células de control cultivadas en medio común sin tratamiento y muestras en blanco. MTT se utilizó para obtener información básica sobre el metabolismo celular y la proliferación. Por lo tanto, se encontró que estos derivados no eran citotóxicos hasta una concentración de 1000 µg / ml.

10 **Ejemplo 30. Evaluación de fotocitotoxicidad para el derivado éster de furan-2-acrilato sódico de hialuronano**

15 **[0110]** Se sembraron 10.000 células (3T3-NIH) en pocillos de placas de 96 pocillos. Las células se cultivaron durante 24 horas antes del tratamiento con las soluciones ensayadas en medio completo. Después de eso, las células se enjuagaron con PBS y se incubaron durante una hora con el derivado previamente disuelto en PBS (1-1000ug / ml). Las células con derivado se irradiaron con una dosis de 0,1 J / cm² UVA / UVB con lámpara (Oriol Instruments). La potencia de la lámpara se determinó usando un fotómetro PMA 2100 (Solar light Co.). 10 minutos después de la exposición se extrajo el sobrenadante y se añadió medio completo. La viabilidad celular se midió 24 horas después de la irradiación y utilizando el método MTT. El diseño del experimento se completó con un conjunto de células de control cultivadas en medios comunes sin tratamiento e irradiación UV y también con control positivo y negativo. El ensayo de fotocitotoxicidad puede utilizarse para identificar un posible efecto fototóxico del derivado éster de furan-2-acrilato sódico de hialuronano. El ensayo de fotocitotoxicidad se repitió mínimamente cuatro veces y se calculó la media (porcentaje) con respecto al control y error estándar de las medias (SEM). Se midió la densidad óptica y se calculó el porcentaje relativo al control en función del tiempo.

25 **Ejemplo 31. Ensayo de viabilidad celular de éster tiofenilacrílico sódico de hialuronano**

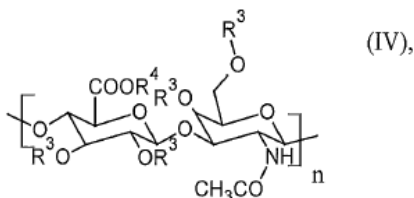
30 **[0111]** Se examinó el éster tiofenilacrílico sódico de hialuronano preparado como se describe en los ejemplos anteriores y su biocompatibilidad utilizando líneas celulares 3T3-NIH. Por lo tanto, se disolvió una disolución de 0,1 (p / v) % del derivado en medios de cultivo de células completos mezclando a fondo (durante la noche). El método descrito en el Ejemplo 7 se realizó también para este derivado. También se encontró que estos derivados no eran citotóxicos hasta una concentración de 1000 µg / ml.

Ejemplo 32. Evaluación de fotocitotoxicidad para el éster tiofenilacrílico sódico derivado de Hyaluronan

35 **[0112]** Se examinó éster tiofenilacrílico de sodio de Hialuronano preparado como se describe en los ejemplos anteriores y su biocompatibilidad usando líneas celulares 3T3-NIH y prueba de fotocitotoxicidad. El método descrito en el Ejemplo 9 se realizó también para este derivado. También se encontró que este derivado no era fotocitotóxico. Todos los derivados han sido probados como no citotóxicos y no fotocitotóxicos para las líneas celulares 3T3-NIH. Por lo tanto, la viabilidad de las células después de su tratamiento no ha cambiado significativamente en todo el intervalo supervisado.

Reivindicaciones

1. Nanofibras a base de derivados éster de ácido hialurónico y su sal, **caracterizadas porque** comprenden un derivado éster fotoendurecible de ácido hialurónico o su sal de fórmula general IV



5

en la que n es un número entero en el intervalo de 1 a 5000 dímeros,
 R^3 son independientemente H o COCHCHR^1 en donde R^1 es arilo de 5 o 6 elementos que tiene al menos uno o más heteroátomos idénticos o diferentes seleccionados de un grupo que comprende N, O, S siempre que al menos un R^3 del derivado sea COCHCHR^1
 R^4 es H^+ o una sal farmacéuticamente aceptable;
 y al menos un polímero portador.

10

2. Nanofibras según la reivindicación 1, **caracterizadas porque** R^1 se selecciona de un grupo que comprende fenilo, furilo, urfurilo, tienilo, tiofenilo, piridilo o imidazolilo;
 R^4 se selecciona entre un grupo que comprende cualquiera de los iones de metales alcalinos o iones de metales alcalino-térreos, preferiblemente Na^+ , K^+ , Mg^{2+} o Li^+ .

15

3. Nanofibras según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, **caracterizadas porque** la cantidad de COCHCHR^1 en el derivado éster HA fotoendurecible es de 0,1 a 20% con respecto a 100 dímeros de ácido hialurónico o su sal, preferiblemente de 5 a 10%, más preferiblemente 5%.

20

4. Nanofibras según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizadas porque** el polímero portador se selecciona de un grupo que comprende alcohol polivinílico, ácido poliacrílico, óxido de polietileno, polivinilpirrolidona; estando la cantidad del polímero portador en el intervalo de 50% (p / p) a 99% (p / p), preferiblemente en el intervalo de 70 a 90% (p / p), más preferiblemente 80% (p / p).

5. Las nanofibras de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizadas porque** comprenden adicionalmente polímero biológicamente compatible, preferiblemente carboximetilcelulosa, gelatina, quitosano, policaprolactona, ácido poliláctico, poliamida, poliuretano, ácido poli (lactida-co-glicólico); y su mezcla o sus copolímeros.

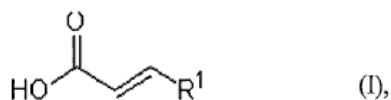
25

6. Las nanofibras de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizadas porque** su diámetro medio está comprendido entre 1 y 500 nm, preferentemente entre 99 y 300 nm.

7. Las nanofibras según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizadas porque** están en forma de gel.

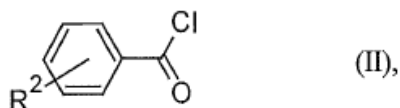
8. Un método de síntesis de nanofibras de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizado porque** un ácido α , β -acrílico sustituido insaturado de fórmula general I

30

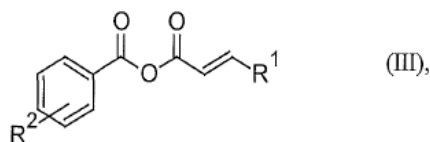


donde
 R^1 es un arilo de 5 ó 6 elementos o un heteroarilo de 5 ó 6 elementos que tiene al menos uno o más heteroátomos idénticos o diferentes seleccionados del grupo que comprende N, O ó S; se activa con cloruro de benzoilo sustituido o no sustituido o sus derivados de fórmula general II

35



en la que R^2 es uno o más sustituyentes seleccionados de un grupo que comprende H, NO_2 , $-\text{COOH}$, haluros, $\text{C}_1\text{-C}_6$ alquiloxi, preferiblemente haluros, metoxi o etoxi, más preferiblemente Cl; en presencia de una base orgánica, preferiblemente amina terciaria, más preferiblemente trietilamina, diisopropiletilamina o N, N-diisopropiletilamina; una mezcla de agua y un disolvente polar o no polar miscible en agua para formar un anhídrido reactivo de la fórmula general III

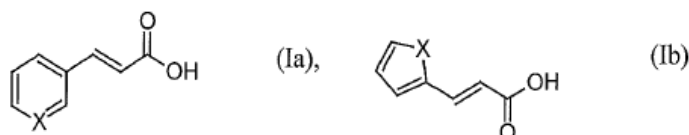


donde

R^1 y R^2 son como se definen anteriormente

que reacciona con ácido hialurónico o una sal del mismo en presencia de una base orgánica, preferiblemente amina terciaria, más preferiblemente trietilamina, diisopropiletilamina o N, N-diisopropiletilamina; una mezcla de agua y un disolvente polar o no polar miscible en agua para formar el derivado éster fotoendurecible de ácido hialurónico o su sal de la fórmula general IV según se define en la reivindicación 1 o la reivindicación 2 que se disuelve en un polímero portador de peso molecular de 5×10^4 g / mol a 1×10^6 g / mol, preferiblemente 4×10^5 g / mol en agua para formar una solución de hilatura que se hila por electrohilado.

9. El método de acuerdo con la reivindicación 8, **caracterizado porque** el ácido acrílico α,β - insaturado sustituido es ácido acrílico aromático o heteroaromático de 5 o 6 elementos de fórmulas generales Ia o Ib



en donde X se selecciona entre C, O, S, N, preferiblemente O o N y el cloruro de benzoilo sustituido de la fórmula general II es cloruro de triclorobenzoilo, preferiblemente un ácido acrílico α,β -insaturado sustituido es ácido 3- (2-furil) acrílico .

10. El método de acuerdo con las reivindicaciones 8 ó 9, **caracterizado porque** el polímero portador se selecciona de un grupo que comprende alcohol polivinílico, ácido poliacrílico, óxido de polietileno, polivinilpirrolidona.

11. El método de acuerdo con la reivindicación 8 ó 9, **caracterizado porque** la activación del ácido acrílico α,β - insaturado sustituido de la fórmula general I se lleva a cabo durante 5 a 120 minutos a una temperatura en el intervalo de 0°C a 60°C preferiblemente de 25°C a 60°C , más preferiblemente durante 30 minutos a 25°C .

12. El método según la reivindicación 8, **caracterizado porque** la cantidad de anhídrido reactivo mezclado con ácido hialurónico o su sal corresponde a 0,01 a 5 equivalentes, preferiblemente 0,5 a 2 equivalentes, más preferiblemente 0,5 equivalentes por dímero de ácido hialurónico o su sal.

13. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12, **caracterizado porque** el ácido hialurónico o su sal tiene un peso molecular de 5×10^3 a $1,6 \times 10^6$ / mol, preferiblemente de $1,5 \times 10^4$ a $2,5 \times 10^5$ g / mol, más preferiblemente de $8,5 \times 10^4$ a $1,20 \times 10^5$ g / mol.

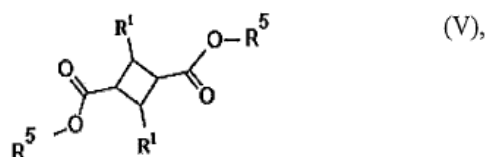
14. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 13, **caracterizado porque** la formación del éster fotocurable derivado de ácido hialurónico o su sal se lleva a cabo durante 1 a 48 horas, preferiblemente 1 a 3 horas; a temperaturas dentro del intervalo de 0°C a 80°C , preferiblemente de 20°C a 60°C , lo más preferiblemente a 25°C

15. El método según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 14, **caracterizado porque** el disolvente polar o no polar miscible en agua se selecciona de un grupo que comprende isopropanol, acetona, acetato de etilo, dimetilsulfóxido, acetonitrilo, dimetilformamida, tetrahidrofurano, preferiblemente isopropanol, tetrahidrofurano, lo más preferiblemente isopropanol; siendo la cantidad de agua en la mezcla agua y disolvente polar miscible en agua de 10% a 99% v / v, preferiblemente 50% v / v.

16. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 15, **caracterizado porque** la concentración del éster fotocurable derivado de ácido hialurónico o su sal en la solución de hilado está en el intervalo de 0,5 a 12% (p / v), preferiblemente de 5 a 7,5% (p / v), más preferiblemente 5% (p / v).

17. Un método de foto-endurecimiento de nanofibras definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizado porque** las nanofibras se fotocuran por irradiación de luz dentro del intervalo de longitudes de onda UV-

Vis, por lo que ocurre la cicloadición de al menos dos grupos éster de al menos dos moléculas de ácido hialurónico o su sal de fórmula IV, formando el compuesto que tiene anillo de ciclobutano de fórmula general V



donde

- 5 R^1 es como se define en la reivindicación 1 y
 R^5 es una cadena principal de ácido hialurónico o su sal.
18. El método de acuerdo con la reivindicación 17, **caracterizado porque** la luz UV tiene el intervalo de longitud de onda de 280 nm a 750 nm, preferiblemente 302 nm; el fotocurado se lleva a cabo durante 2 min a 60 min, preferiblemente durante 3 min a 10 min.
- 10 19. Nanofibras fotocuradas a base de derivados de ácido hialurónico **caracterizadas porque** comprenden el compuesto que tiene anillo de ciclobutano de la fórmula V, definido en la reivindicación 17.
20. Una preparación que comprende nanofibras fotocuradas, **caracterizada porque** las nanofibras fotocuradas son como se definen en la reivindicación 19 y que la preparación está en una forma seleccionada de un grupo que comprende una capa, una película, una estera, un vendaje de herida o un almacén de tejido.
- 15 21. La preparación definida en la reivindicación 20 para uso en cosmética, medicina o medicina regenerativa.
22. La preparación definida en la reivindicación 21 en el dispositivo de cuidado de heridas, o en parches para uso externo o interno.

20

25

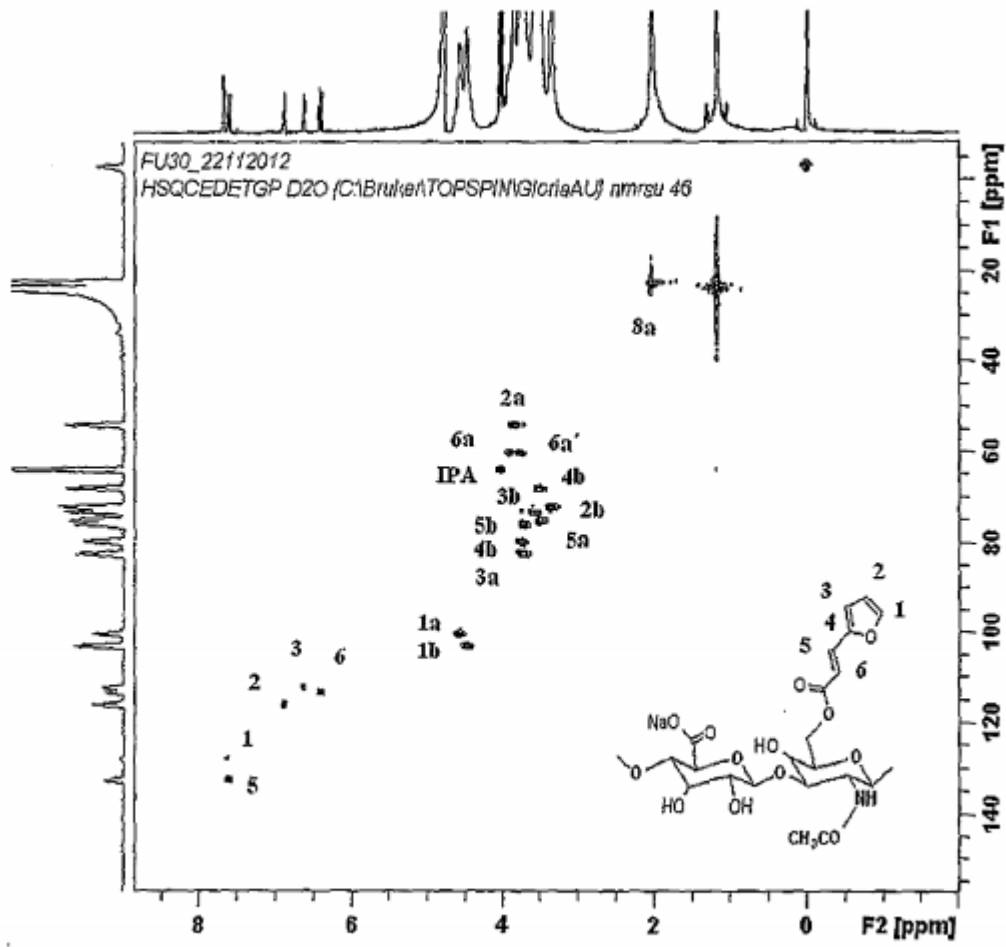
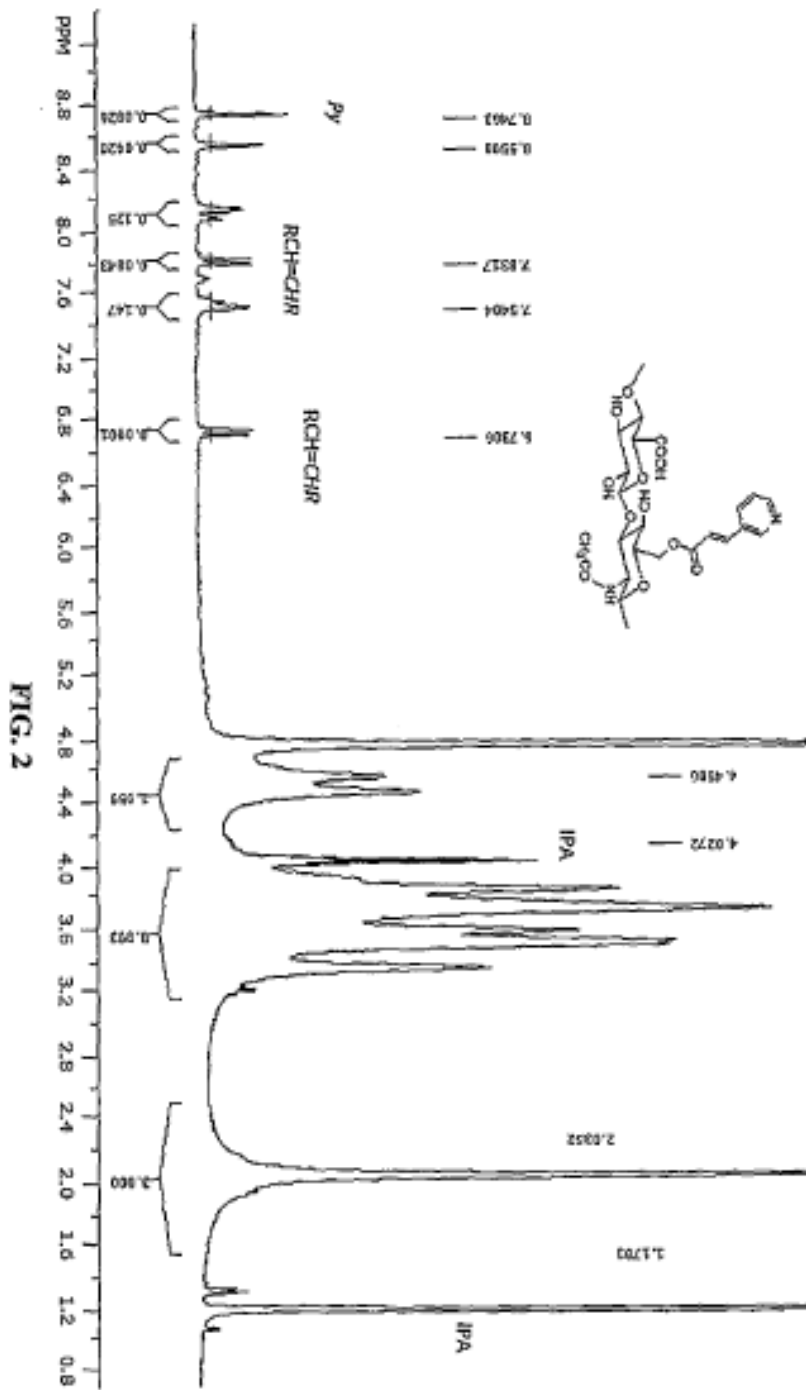


FIG.1



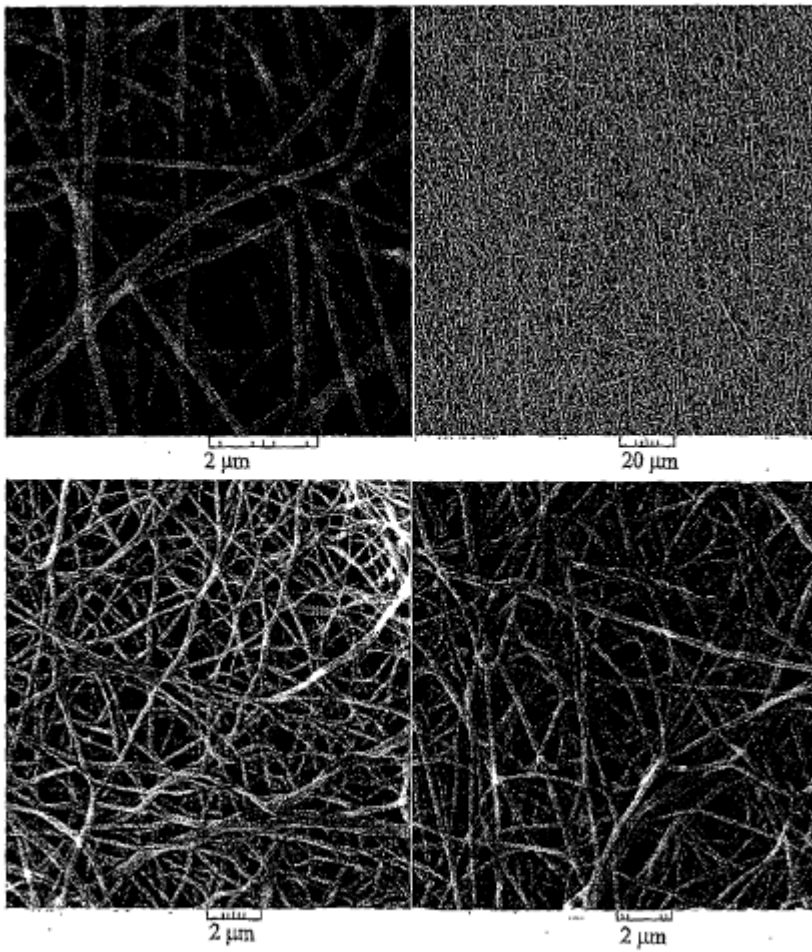


FIG. 3

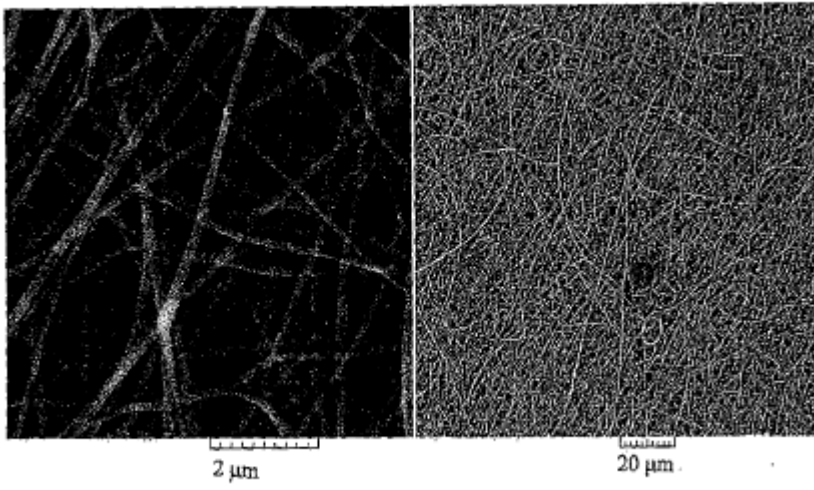


FIG. 4

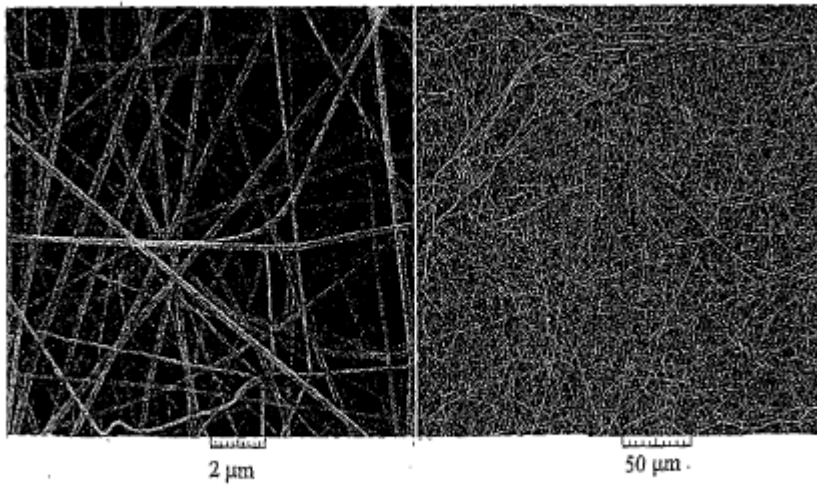


FIG. 5

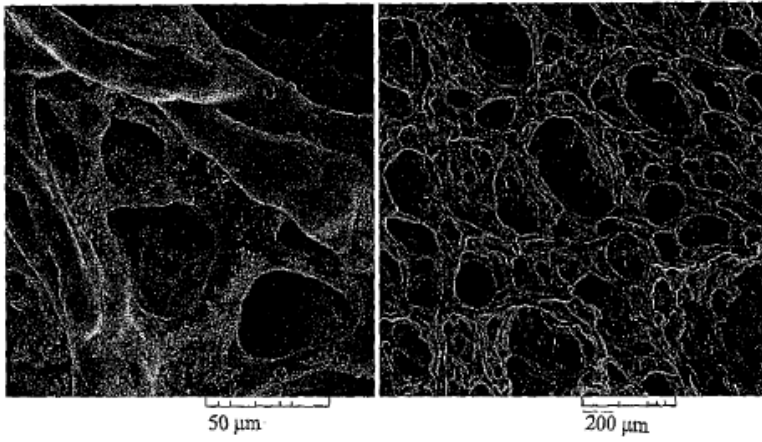


FIG.6

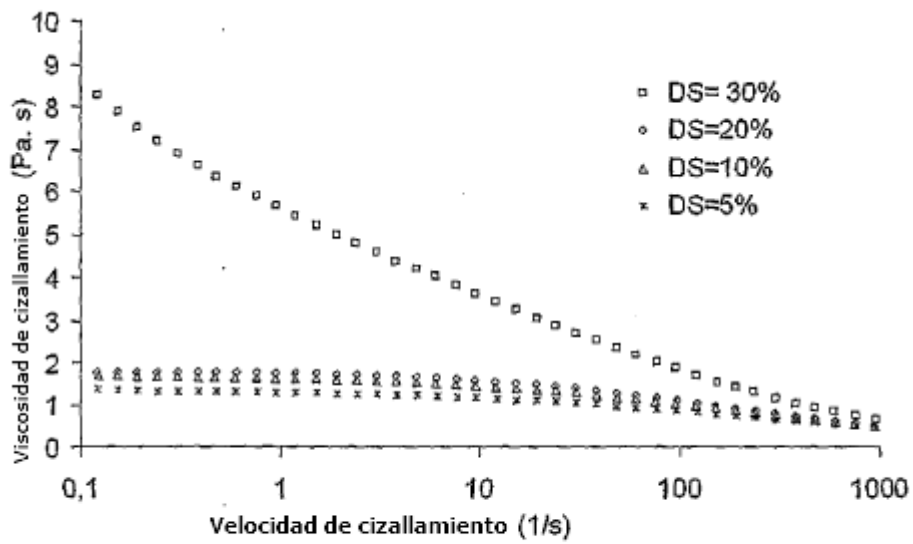


FIG.7

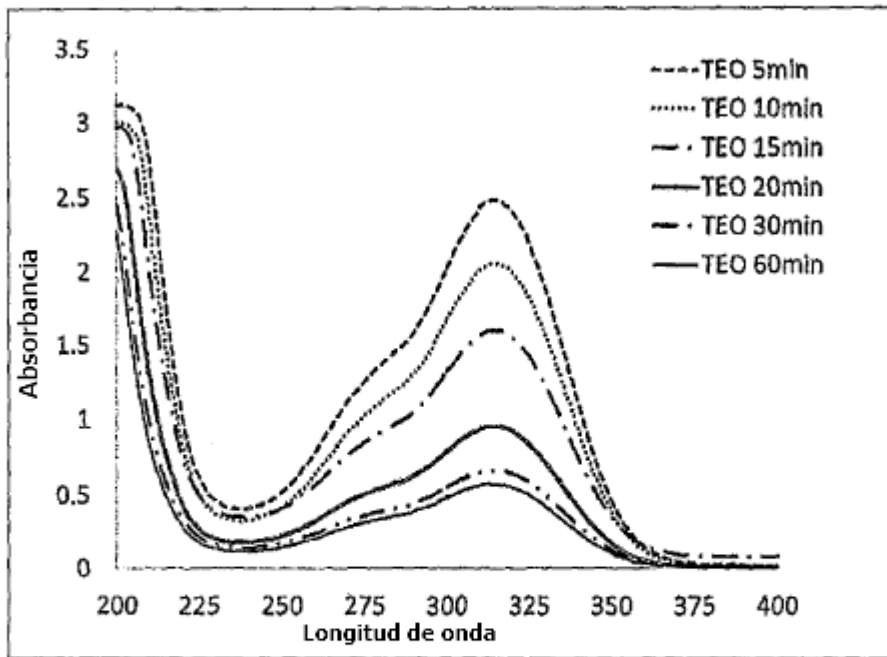


FIG. 8

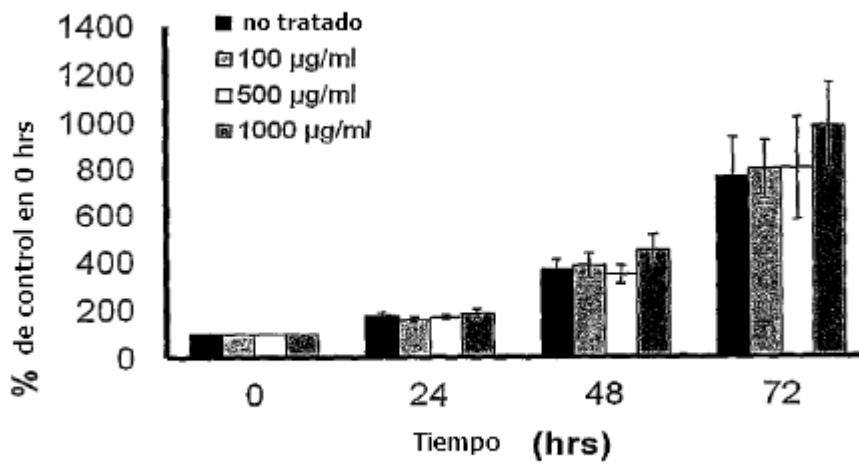


FIG.9

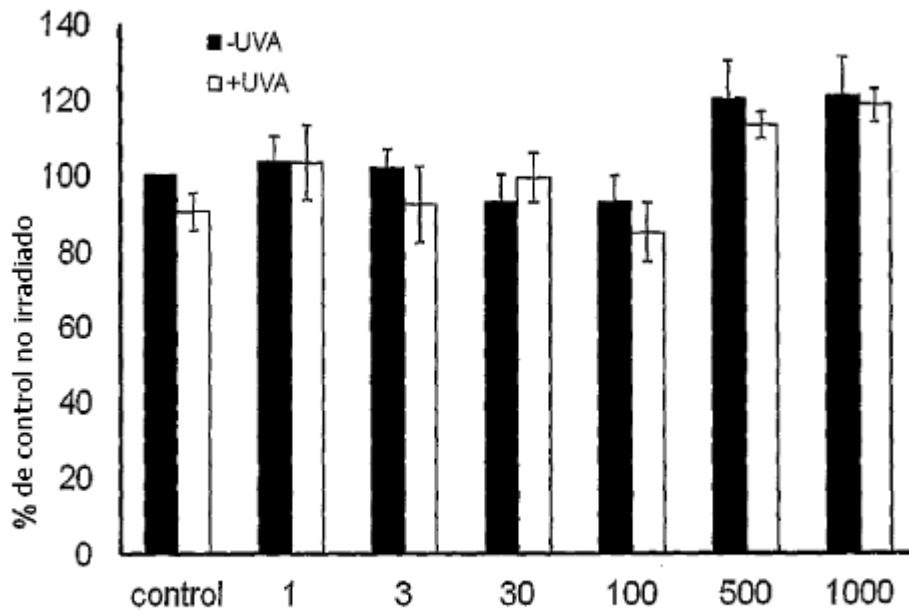


FIG. 10

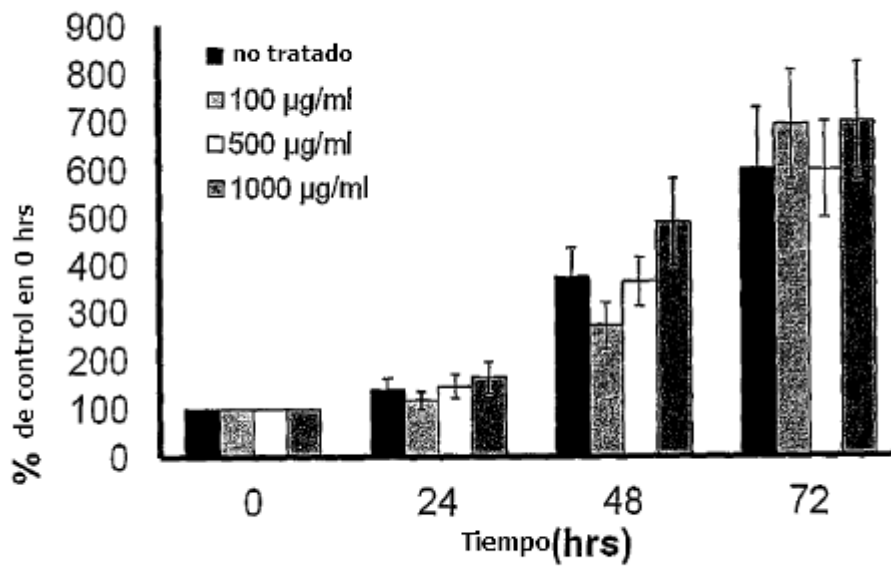


FIG. 11

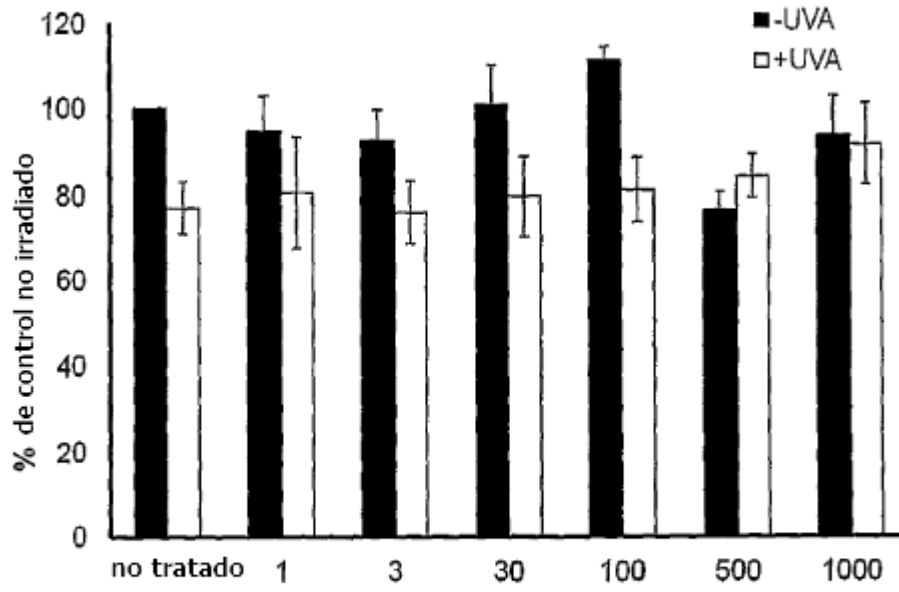


FIG. 12