

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 748 638**

51 Int. Cl.:

D01D 5/06 (2006.01)

C08B 37/08 (2006.01)

D01F 9/00 (2006.01)

A61L 27/20 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.11.2013 PCT/CZ2013/000158**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.06.2014 WO14082611**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.11.2013 E 13826919 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.08.2019 EP 2925916**

54 Título: **Fibras basadas en derivados hidrofobizados de hialuronano, método para su preparación y uso, textiles a base de los mismos y su uso**

30 Prioridad:

27.11.2012 CZ 20120841

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

17.03.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**SCUDLOVA, JOLANA;
BETAK, JIRI;
WOLFOVA, LUCIE;
BUFFA, RADOVAN;
SLEZINGROVA, KLARA;
KLEIN, PAVEL;
MATEJKOVA, ILONA;
BOBEK, MARTIN;
PITUCHA, TOMAS;
VELEBNY, VLADIMIR y
SULAKOVA, ROMANA**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 748 638 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

Fibras basadas en derivados hidrofobizados de hialuronano, método para su preparación y uso, textiles a base de los mismos y su uso

Campo de la invención

5 La invención se refiere a la preparación de fibras biodegradables basadas en derivados hidrófobos de hialuronano. La preparación de fibras se realiza con el uso del método de hilatura húmeda, con la producción de monofilamentos continuos que luego se pueden procesar en hilos y luego en textiles, tejidos de punto, o textiles no tejidos. Las fibras resultantes tienen excelentes propiedades de procesamiento, (resistencia, alargamiento). El uso aplicable de estas fibras está dirigido a la medicina, especialmente en el campo de materiales quirúrgicos, ingeniería de tejidos y sistemas de liberación controlada de fármacos.

Antecedentes de la invención

15 El hialuronano es un polisacárido lineal compuesto por unidades repetidas de disacárido hecho de ácido glucurónico, que se une con N-acetil-glucosamina a través de un enlace glucosídico β -1,3. Las subunidades de disacárido se unen entre sí mediante un enlace β -1,4. Esto es en referencia a una sustancia que ocurre naturalmente en el organismo donde, en particular, juega un papel de organización de la matriz extracelular (EMS). Además, gracias a sus interacciones con los receptores celulares, el hialuronano no solo puede unirlos a la EMS sino que también puede controlarlos de una manera particular a través de esta interacción celular. Además, gracias a su composición, el hialuronano puede unirse a una cantidad sustancial de agua y en consecuencia hidratar los tejidos y, por lo tanto, garantizar no solo el transporte de nutrientes y oxígeno a células específicas, sino también la transferencia de factores de regulación entre las células [1]. El hecho de que el hialuronano se pueda sintetizar prácticamente en cantidades no limitadas de una pureza muy alta con el uso de la fermentación de estreptococos, es también muy ventajoso [2].

25 El hialuronano es una sustancia intrínseca al cuerpo, además no es inmunogénica, teratogénico o de otra manera tóxica, interactúa con receptores celulares específicos, hidrata fuertemente los tejidos y lubrica las articulaciones o el movimiento del párpado en el globo ocular. Por estos hechos, el hialuronano está predeterminado en muchas aplicaciones en la medicina [3 - 5]. Algunas de las formas de aplicación, que podrían ser interesantes, son varios productos textiles, tejidos, tejidos de punto o textiles no tejidos para uso externo o interno.

30 Sin embargo, para estos fines hay una necesidad de fibras que puedan unirse en su superficie o llevar en su estructura sustancias biológicamente activas, y que tengan propiedades físicas y químicas que permitan su procesamiento textil. Hoy en día, puede encontrarse en la bibliografía la descripción del uso de la hilatura húmeda para producir fibras y películas a partir de hialuronato de potasio (Rupprecht [6]) o hialuronato de calcio (Sheehan [7]). En este caso, el hilado se realiza en una solución de etanol que contiene KCl 0,1 M o sales de calcio respectivas. Las fibras preparadas son muy solubles en agua e incluso en ambientes húmedos se desintegran, con lo que pierden tanto su forma como sus propiedades mecánicas en decenas de segundos. Las propiedades mencionadas anteriormente limitan esencialmente las posibilidades de aplicabilidad del hialuronano natural. Hasta el momento, no hay ninguna preparación utilizando las fibras nativas preparadas a partir de hialuronano en el mercado.

35 La preparación de fibras de hialuronano nativo está protegida por el documento de patente internacional WO 2009/050389. Las fibras se obtienen por precipitación en un baño de ácido acético concentrado (80% a 90%). Después las fibras se secan y se alargan. Debido a su preparación a partir de hialuronano nativo, las fibras son muy solubles en agua. Los autores afirman que la solubilidad puede limitarse mediante el tratamiento de la superficie de las fibras con el uso de sustancias hidrófobas de origen vegetal o animal. Por el contrario, las fibras que nosotros hemos preparado a partir de hialuronano hidrofobizado son insolubles inmediatamente después de su preparación, por lo que no es necesario agregar otros agentes más tarde para tratar la superficie y, por lo tanto, el proceso es considerablemente más simple tanto desde el punto de vista tecnológico como económico.

45 En la Solicitud de Patente PV 2010-1001, también se usa un ácido en una concentración del 1 al 99% en peso para preparar fibras a partir del ácido hialurónico, pero el ácido se mezcla con de 1 a 99% de alcohol para conferir mayor resistencia a las fibras. El uso de ácido fosfórico y de baños de metalización también se reivindica. Se prefiere el ácido fórmico, acético, y propiónico mezclado con metanol, etanol, 1-propanol o 2-propanol para la coagulación. Estas fibras también son solubles en comparación con el HA hidrofobizado que nosotros utilizamos. La misma delineación se encuentra en el documento de solicitud de Patente de Estados Unidos US2011/0263724 A1.

La solubilidad descrita anteriormente del hialuronano nativo se puede eliminar utilizando derivados químicamente modificados apropiados basados en hialuronano.

55 En el documento de patente europea EP 216453 A2, los autores hilaron ésteres de ácido hialurónico en un baño de etanol+DMSO con el uso de la hilatura húmeda. Más específicamente, se referían al éster etílico (HYAFF7) y al éster bencílico (HYAFF11). Cuando se esterifica el grupo carboxilo, la esterificación se realiza uniendo un grupo alquilo activado al grupo carboxilo del ácido glucurónico el cual, según el conocimiento actual [8], es importante debido a la especificidad del enlace del ácido hialurónico y los receptores celulares (CD44).

Por el contrario, en los derivados que hemos obtenido dentro del alcance de esta solicitud de patente se modifican solo los grupos hidroxilo, por lo tanto, las propiedades biológicas del grupo carboxilo se mantienen completamente tan bien conservadas como en el caso del hialuronano nativo.

5 Como no es posible conseguir las propiedades mecánicas necesarias para la producción de un monofilamento continuo con el uso del baño utilizado en la patente mencionada anteriormente, los autores de la patente lo usaron para producir textiles no tejidos solamente.

También las otras patentes de la compañía Fidia Advanced Biopolymers tratan de la producción de fibras y textiles no tejidos a partir de ésteres del ácido hialurónico; estas patentes son las siguientes: documentos de patente internacional WO 93/11803, WO 98/08876, y documentos de patente de Estados Unidos US 5658582, US 10 006632802 B2, US 2004/0192643 A1. La preparación de las fibras es la misma en todas las patentes. Primero los ésteres de ácido hialurónico se disuelven en DMSO, seguido de la coagulación con etanol absoluto. Las fibras tienen una longitud que varía de 5 a 100 mm. Su cortedad es causada por la considerable fragilidad de las fibras; la fragilidad es causada por el baño de coagulación, etanol absoluto, usado, como lo demostramos también en nuestro Ejemplo 20. Por lo tanto, los autores reivindican textiles no tejidos solamente ya que no pueden producir un fibra 15 continua con su proceso tecnológico, especialmente con el baño de coagulación elegido. En el caso de nuestra solicitud de patente, la conclusión es la preparación de fibras continuas y su procesamiento en forma de un textil con estructura regular (textil, tejido de punto) donde se puede esperar la distribución homogénea de monofilamento y mejores propiedades de tensión y flexibilidad.

Las fibras mixtas, donde los derivados de hialuronano representan un componente marginal con un contenido 20 máximo de hasta el 10% en peso, también están protegidas por una patente. El resto del material de hilado está hecho de otros polisacáridos, por ejemplo la carragenina, documento de patente internacional WO 2007/006403. Los autores no son capaces de hilar el hialuronano como un soporte polimérico con el uso de su proceso tecnológico; por lo tanto agregan a las fibras en una pequeña cantidad otro polímero que soporta mejor. En el documento de patente internacional WO 2007/009728 A2, se describe una situación similar; los autores hilan carboximetilcelulosa 25 con derivados del ácido hialurónico. Los componentes son disueltos en DMSO y centrifugados en un baño de coagulación de cloruro de zinc en etanol o bromuro de zinc en etanol. Los autores no indican la cantidad de zinc restante en las fibras. Sin embargo, un mayor contenido de zinc, que es un metal pesado, es citotóxico. Esto está probado por las fibras preparadas en el Ejemplo 6 y por el diagrama de viabilidad N°. 5 adjunto.

El documento de patente de Estados Unidos US 2011/0237539 A1 reivindica la producción de fibras hemostáticas a 30 base de polisacáridos. Los autores informan sobre mezclas de los siguientes materiales: alginato, quitosano, ácido hialurónico y gelatina. Reivindican la suspensión de hidróxido de sodio, metanol y agua como solución de coagulación para la mezcla de ácido hialurónico y quitosano. Reivindican el mismo baño de hidróxido de sodio, metanol y agua para la mezcla de gelatina y quitosano. Reivindican una suspensión de cloruro de calcio, etanol y agua para hilar la mezcla de ácido hialurónico y alginato. Sin embargo, también usan ácido hialurónico como uno de 35 los componentes, por lo que el ácido hialurónico no se considera un polímero de soporte de las fibras producidas.

Con respecto a las aplicaciones de las fibras preparadas a partir de ésteres de hialuronano, las fibras cortas están patentadas, especialmente como textiles no tejidos (documento de patente de Estados Unidos US 5658582), las 40 fibras cortas también se utilizan para la preparación de gasas, materiales para costura, redes, textiles no tejidos (documento de patente internacional WO 98/08876, documento de patente de Estados Unidos US 006632802 B2), o también para la preparación de material de vendaje (documento de patente internacional WO 2007/003905). El documento de patente de Estados Unidos US 2004/0192643 A1 también informa sobre los resultados del estudio preclínico y clínico de los materiales HYAFF7 y HYAFF 11 sobre las adherencias post operativas. El material se prueba en forma de una gasa y un textil no tejido.

El documento JP H06 25306 A menciona la posibilidad de producir un derivado del ácido hialurónico C18 acilado y 45 fibras a base de él. Sin embargo, el solicitante no ha tenido éxito produciendo el derivado siguiendo el procedimiento de este documento.

Referencias

1. Radice a kol., Injectable hyaluronic acid derivative with pharmaceuticals/cells, documento de patente de Estados Unidos US20020076810 A1.
- 50 2. Lee S.A., VanSteenberg M., Rupprecht A.; Spectroscopic studies of the physical properties of hyaluronate films: the origin of the phase transition; *Carbohydrate Polymers*; 1995; 28; 61-67.
3. Guillaumie F., Furrer P., Felt- Bayens O., Fuhlendorff B. L., Nymand S.; Comparative studies of various hyaluronic acids produced by microbial fermentation for potential topical ophthalmic applications. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*; 2009; 1421-1430.
- 55 4. Miller R.J., Ávila L.Z.; *Chemistry and Biology of Hyaluronan: Medicinal Uses of Modified Hyaluronate*. Elsevier Ltd. 2004. 505-528.

5. Juhlin L.; Hyaluronan in skin; *Journal of Internal Medicine*; 1997; 242; 61-66.

6. Rupprecht A.; Wet Spinning of Hyaluronic Acid. Preparation of Oriented Samples; *Acta Chemica Scandinavica*; 1979; 33; 779-780.

7. Sheehan J.K., Atkins E.D.T., Nieduszynski I.A.; X-ray diffraction studies on the connective tissue polysaccharides; *J. Mol. Biol.* 1975; 91; 153-163.

8. Banerji S., Wright A.J. a kol.; Structures of the Cd44-hyaluronan complex provide insight into a fundamental carboxyhydrate-protein interaction; *Nature structural and molecular biology*; 2007; 14; 234-239.

9. Kás Jan, Kodíček Milán, Valentová Olga; *Laboratorní techniky biochemie*, VSCHT Praga, 138-139. ISBN: 80-7080-586-2.

10 Compendio de la invención

Las deficiencias resultantes del estado de la técnica, tales como la solubilidad inmediata de las fibras preparadas a partir de hialuronano nativo se resuelven mediante esta invención mediante el uso de hialuronano hidrofobizado. El hialuronano se modifica preferiblemente en un alcohol primario de N-acetil-glucosamina pero la acilación puede ocurrir también en los alcoholes secundarios del ácido glucurónico. Los anhídridos de ácidos grasos con una longitud de cadena preferiblemente de C₁₁ - C₁₈ sirven como agentes de acilación. El grado de sustitución de los derivados útiles para el hilado es:

para derivados de C₁₁ - C₁₂ preferiblemente 30% y más,

para derivados de C₁₃ - C₁₅ preferiblemente 20% y más,

para derivados de C₁₆ - C₁₈ preferiblemente 5% y más.

Según la invención, el método de preparación de las fibras sobre la base de hialuronano C₁₁ - C₁₈ acilado en los grupos hidroxilo del ácido hialurónico, preferiblemente acilado en un alcohol primario de N-acetil-glucosamina, se realiza mediante la preparación de una solución de hilatura que comprende un derivado de hialuronano acilado en una concentración que varía de 0,01% en peso a 15% en peso en una mezcla de agua y 2 propanol, donde el contenido de agua varía del 30% en volumen al 90% en volumen, y el contenido de 2-propanol es del 10% en volumen al 70% en volumen. En una realización preferida se utiliza un derivado basado en palmitoil-hialuronano. Esta solución de hilatura es introducida en el baño de coagulación que contiene la solución acuosa de ácido orgánico o sus sales de metales alcalinos, o metales alcalinotérreos, donde el ácido se selecciona del grupo que comprende el ácido láctico, tartárico, cítrico, málico, ascórbico, oxálico o una combinación de los mismos, para formar las fibras. Después las fibras se lavan con alcohol, por ejemplo etanol, 1-propanol o 2-propanol, y se secan. Finalmente, las fibras se pueden alargar después del lavado. La concentración de la solución acuosa de ácido orgánico en el baño de coagulación es de 0,5% a 30% en peso para el ácido láctico, 0,01% a 57% en peso para el ácido tartárico, 0,5% a 42% en peso para el ácido cítrico, 0,5% a 50% en peso para el ácido málico, 0,5% a 25% en peso para el ácido ascórbico, y 0,5% a 60% en peso para el ácido oxálico. Preferiblemente, el baño de coagulación contiene una solución acuosa de ácido orgánico saturada. En una realización preferida, el baño de coagulación contiene la solución acuosa saturada de ácido láctico. Preferiblemente, la solución de hilatura se desairea antes de su introducción en el baño de coagulación. La temperatura del baño de coagulación varía de 15 a 45° C y el tiempo de mantenimiento de las fibras en el baño de coagulación varía de 10 segundos a 24 horas.

Además, la invención se refiere a las fibras basadas en el derivado C₁₁ - C₁₈ de hialuronano acilado en los grupos hidroxilo del ácido hialurónico, las fibras tienen dimensiones de 50 a 300 μm, y fuerza de tensión en el rango de 0,3 a 1 cN/dtex, y tenacidad en el intervalo de 10 a 40%. Las fibras se pueden utilizar para la producción de tejidos de punto, textiles tejidos, o textiles no tejidos. Los textiles hechos de las fibras de la invención pueden ser utilizados por ejemplo, para la producción de materiales quirúrgicos implantables en la medicina de seres humanos y veterinaria.

Lo importante es que, en comparación con el documento de patente europea EP 216453 A2, los documentos de patente internacional WO 93/11803, WO 98/08876, los documentos de patente de Estados Unidos US 5658582, US 006632802 B2 y US 2004/0192643 A1, se conservan todos los grupos carboxilo de ácido hialurónico presentes, los cuales son responsable de las propiedades biológicas.

Además, se utilizan baños de precipitación más nuevos y más efectivos que son menos dañinos para la salud y el medio ambiente de los seres humanos. Se trata de soluciones que no son tóxicas, no son explosivas y no son inflamables, en comparación con los baños utilizados en el documento PV 2010-1001.

50

	Clase de riesgo	Frases H	Frases P
Ácido fórmico según PV2010-1001	C, inflamable	H226, H314	P210, P260, P280, P305+P351+P338, P301+P330+P331
Ácido acético según PV2010-1001	C, inflamable	H226, H314	P210, P260, P280, P305+P351+P338, P301+P330+P332
Ácido propiónico según PV2010-1001	C	H314	P280, P301+P330+P331, P305+P351+P338
	Clase de riesgo	Frases H	Frases P
Ácido cítrico	Xi	H319	P280, P305+P351+P338
Ácido D,L-málico	Xn, Xi	H302, H318, H315, H335	P261, P280, P305+P351+P338
Ácido tartárico	Xi	H319, H335, H315	P280, P305+P351+P338
Ácido láctico	Xi	H315, H318	P280, P305+P351+P338
Ácido ascórbico	--	--	--
Ácido oxálico	Xn	H302, H312	P302+P352

5 Las fibras de hialuronano hidrofobizado tienen propiedades considerablemente mejoradas para el procesamiento textil en comparación con las fibras de hialuronano natural; esto es causado principalmente por una mayor tensibilidad. En esta realización, las fibras no se rompen y es posible producir fibras de cientos de metros o kilómetros de longitud, mientras que las fibras pueden ser procesadas adicionalmente en máquinas de operación por procedimientos textiles comunes tales como tejiendo, haciendo punto, etc. La tensibilidad es muy importante en el procesamiento de las fibras. Durante la tejeduría, se produce un estrés dinámico en una urdimbre y una trama, durante la formación de la propulsión del cobertizo y la trama. Durante la tejeduría de punto, el estrés dinámico del hilo se produce al retraer la bobina y al apretar el bucle [Study texts, Technical University of Liberec]. Los valores de la tensibilidad de las fibras vienen dados principalmente por el derivado utilizado y la disposición de su estructura química para resultados de tracción buenos [Rogovin Z.A. Chemie a technologie umelych vlaken, 1956].

10 El uso de los ácidos orgánicos reivindicados como baños de precipitación no es claramente obvio ya que en comparación con los ácidos mencionados anteriormente en la solicitud de patente PV2010-1001 (ácido fórmico, acético, propiónico) estos ácidos son sólidos. Los intentos de preparar las fibras en agua o alcohol solamente no tuvieron éxito. Por lo tanto, fue necesario encontrar empíricamente, las mezclas que son más útiles para la resistencia y la tensibilidad de las fibras de manera que fuera posible procesar las fibras obtenidas en máquinas textiles operativas.

15 Otro ejemplo de ambigüedad es el uso de ácido láctico para un baño de precipitación. El ácido láctico está comúnmente disponible como una solución acuosa al 80%, siendo esta solución muy viscosa; por lo tanto, no es posible precipitar las fibras en esta solución.

Experimentalmente, esta concentración de la composición se ha encontrado óptima:

ácido láctico - preferiblemente solución acuosa a de 0,5% - 30%

ácido tartárico – preferiblemente de 0,01% a solución saturada (57%)

25 ácido cítrico - preferiblemente de 0,5% a solución saturada (42%)

ácido málico - preferiblemente de 0,5% - 50%

ácido ascórbico - preferiblemente de 0,5% a solución saturada (25%)

o cualquier combinación de los mismos.

30 Sorprendentemente, cuando se usa un ácido más fuerte (fórmico, cítrico, láctico, málico, tartárico) podría haberse esperado que la fuerza del ácido influya en la reducción del peso molecular del derivado de ácido hialurónico (hidrólisis ácida de sacáridos). La reducción del peso molecular conduce a la reducción de la resistencia de la fibra [Hladik V., Textilní viákna, 1970]. Sin embargo, cuando se usaron soluciones acuosas de ácido fórmico o la mezcla de ácido fórmico y alcohol las fibras del HA hidrofobizado que se produjeron no fueron enrolladas con éxito con el uso de rodillos de bobinado para otras operaciones. La fibra se rompió durante el intento de enrollarla (aumento de

las necesidades de resistencia). La resistencia baja es causada por la disminución del peso molecular.

Sin embargo, con el uso de los baños reivindicados (ácido tartárico, cítrico, láctico, málico, ascórbico) la resistencia no es baja. Los resultados de la medición, con el uso de SEC-MALLS, de las fibras preparadas con el uso de varios baños muestran que el Pm de las fibras preparadas con el uso del ácido cítrico, láctico, málico, y tartárico disminuye pero las propiedades de las fibras se conservan.

5

	Preparado según el	Pm HA (kDa)	P Ka	Resistencia (cN/tex)	Tensibilidad
derivado hidrofobizado de HA	Ejemplo 1	253	--	--	--
ácido fórmico	Ejemplo 24	88	3,75	No fue posible medirlo	
ácido acético	Ejemplo 26	167	4,76	5,60	16,13
ácido propiónico	Ejemplo 25	193	4,88	3,00	11,00
ácido ascórbico	Ejemplo 10	120	4,1	9,37	21,07
ácido láctico	Ejemplo 12	137	3,86	5,77	21,90
ácido málico	Ejemplo 11	130	3,46	7,50	25,83
ácido cítrico	Ejemplo 5	106	3,15	7,80	20,53
ácido tartárico	Ejemplo 8	95	3,01	4,93	16,49

Por lo tanto, el compendio de la invención radica en el uso de los mencionados derivados hidrofobizados de hialuronano en combinación con los baños mencionados y debido a esto, estas fibras muestran nuevas propiedades mejoradas en la forma de fibras insolubles, continuas, biodegradables, con mejor tensibilidad. Debido a esto estas fibras pueden ser procesadas por técnicas textiles convencionales tales como el tejer, hacer punto, etc. El procesamiento puede llevarse a cabo en aparatos operativos convencionales (Ejemplo 29), lo que hasta ahora no había sido posible para las fibras de los derivados de HA o de HA nativo. En la solicitud de patente PV 2010-1001 solo se informa sobre textiles hechos a mano. Sin embargo, hay más demanda de la resistencia y especialmente la tensibilidad de las fibras procesadas por máquinas textiles.

10

En cuanto a la degradabilidad en un organismo, el palmitoil hialuronano parece ser el más importante derivado de hialuronano de partida. El ácido palmítico es una parte de la grasa animal (corporal). La cadena de palmitano normalmente se degrada por β -oxidación en el cuerpo.

15

Las fibras se preparan con el uso del método de hilatura húmeda. Los baños de coagulación para la preparación de estas fibras son específicos y se componen de:

20

- soluciones acuosas de ácidos orgánicos,
- soluciones acuosas de sales de ácidos orgánicos,
- o cualquier combinación de los mismos.

La concentración de las soluciones para la preparación de las fibras varía de 0,01% a soluciones saturadas.

25

Las fibras producidas a partir de un baño de precipitación se lavan adicionalmente con un alcohol inferior (etanol, 1-propanol, 2-propanol) y preferiblemente se pueden estirar. Las fibras producidas tienen un diámetro de 50 - 300 μ m, según los parámetros de hilatura utilizados (boquilla giratoria, velocidad de extrusión y velocidad de bobinado, relación de estiramiento) y son producidas como filamentos continuos y adicionalmente torcidas en forma de cables retorcidos adecuados para el procesamiento de máquinas por técnicas textiles. Las fibras son insolubles en agua solamente se hinchan. No muestran propiedades citotóxicas y son enzimáticamente degradables. Tanto la resistencia como la tracción son adecuadas para un procesamiento adicional de las fibras, tal como retorcerlas en hilos, o para preparar un tejido hecho a punto, y textiles tejidos o no tejidos.

30

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra un monofilamento preparado según el Ejemplo 12, el monofilamento es fotografiado con el uso de microscopía electrónica de barrido.

35

La Figura 2 y la Figura 3 muestran los diagramas que presentan la influencia de los derivados utilizados para la producción de fibras en la viabilidad celular. Específicamente, la Figura 2 muestra los resultados de las pruebas de la influencia del derivado de palmitoil hialuronano preparado según el Ejemplo 1 sobre la viabilidad. En el diagrama, la viabilidad celular (porcentaje de control en el tiempo 0) frente al tiempo (horas) se representa gráficamente. La

Figura 3 muestra los resultados de las pruebas de la influencia del derivado palmitoil hialuronano preparado según el Ejemplo 4 sobre la viabilidad. En el diagrama, se representa gráficamente la viabilidad celular (porcentaje de control en el tiempo 0) frente al tiempo (horas).

5 Las Figuras 4 a 8 muestran diagramas que presentan los resultados de la influencia de las fibras producidas a partir de varios baños de precipitación en la viabilidad celular. Específicamente, la Figura 4 muestra los resultados de la influencia de las fibras preparadas según el Ejemplo 3 (el baño de precipitación es una solución acuosa de ácido cítrico) en la viabilidad celular, la Figura 5 muestra los resultados de la influencia de las fibras preparadas según el Ejemplo 12 (el baño de precipitación es una solución acuosa de ácido láctico) en la viabilidad celular, la Figura 6 muestra los resultados de la influencia de las fibras preparadas según el Ejemplo 8 (el baño de precipitación es una solución acuosa de ácido tartárico) en la viabilidad celular, la Figura 7 muestra los resultados de la influencia de las fibras preparadas según el Ejemplo 11 (el baño de precipitación es una solución acuosa de ácido málico) en la viabilidad celular.

La Figura 8 muestra el diagrama que presenta la influencia de los productos de degradación de las fibras en la viabilidad celular.

15 La Figura 9 muestra los hilos de palmitoil hialuronano. El hilo de la izquierda es de dos monofilamentos, el hilo de la derecha es de tres monofilamentos.

La Figura 10 muestra la ilustración del procesamiento de las fibras de hialuronano hidrófobo como un tejido de punto de trama de una cara (la parte blanca).

20 La Figura 11 muestra la ilustración del procesamiento de las fibras de hialuronano hidrófobo como un tejido de punto de doble trama.

La Figura 12 muestra la ilustración del procesamiento de las fibras de hialuronano hidrófobo en una tela tubular.

Realizaciones preferidas de la invención.

25 El peso molecular se midió con el uso de un aparato de HPLC de Shimadzu con un detector de dispersión de luz miniDAWN de Wyatt Technologies (el llamado método SEC-MALLS). Dichos pesos moleculares son peso promedio, a menos que se indique lo contrario.

30 Se realizó la identificación y determinación del grado de sustitución con el uso de RMN. El grado de sustitución (DS) se calculó a partir de la integral de las señales de un sustituyente apropiado (por ejemplo, acilo C16) y la señal de CH₃GlcN a 2,0 ppm. El grado de sustitución del 100% corresponde a la unión de un sustituyente en cada unidad de dímero de hialuronano. Los espectros de RMN de los derivados se midieron en un BRUKER AVANCE 500 (500 MHz) en D₂O, en la mezcla de D₂O/2-propanol-d₈ a una velocidad de 4:1. Los desplazamientos químicos se calibraron según el estándar interno de ácido 3-trimetilsililpropanoico deuterizado (TSPA). Se midieron los siguientes espectros: ¹H RMN, ¹³C RMN, HH COSY, HSQC y DOSY-RMN. Se usaron el software TOPSPIN 1.2 de Bruker y el software SpinWorks 3.1 para el procesamiento de datos de la experimentación.

35 Se prepararon los derivados acilados (palmitoil hialuronano, estearoil hialuronano) de manera similar según el Ejemplo 1. El grado de sustitución depende de los equivalentes utilizados, dicho rango es el siguiente:

HDA 0,5 eq	HDA 1 eq	HDA 2 eq
DS ≤ 12%	DS 12% - 30%	DS 35% - 55%

Los derivados acilados de undecanoil hialuronano se prepararon de una manera similar según el Ejemplo 2.

40 Las imágenes del microscopio electrónico de barrido se hicieron con el uso de un aparato Tescan VEGA II LSU con cátodo de wolframio y una resolución máxima de 3 nm. El voltaje de aceleración del haz primario fue de 5 kV, distancia de trabajo 3 = 4 mm, las imágenes se hicieron en condiciones de alto vacío.

Ejemplos

Ejemplo 1

45 Se disolvió hialuronano de sodio (HA-Na, 15 g; 250 kDa) en 300 ml de agua destilada, después de su completa disolución, se añadieron 300 ml de tetrahidrofurano (THF) a la solución. Después se añadieron trietilamina (TEA) (2,5 eq), dimetilaminopiridina (DMAP) (0,04 eq), y anhídrido de ácido palmítico (HDA) (2 eq) a la solución. Esta solución se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente y luego 0,5 horas a 45° C (temperatura de la solución). Después se añadieron 300 ml de agua destilada con 5 eq de NaCl (en base a HA-Na) y 300 ml de agua destilada para lavar el matraz de reacción a la solución homogénea. La solución se agitó y luego se precipitó con 900 ml de 100% 2-propanol, se lavó una vez con 100% de 2-propanol (500 ml) y 4 veces con 80% de 2-propanol (500 ml) y 2 veces con 100% de 2-propanol (500 ml). Se secó el derivado húmedo en una estufa de secado durante 48 horas a

40° C. El derivado de palmitoil hialuronano preparado de este modo mostró un grado de sustitución del 36% (determinado con RMN) y Pm de 250 kDa .

Ejemplo 2

5 Se disolvieron 5,0 g de hialuronano sódico (12,5 mmoles, 250 kDa) en 100 ml de agua destilada. Luego se añadieron 70 ml de THF. Luego se añadieron TEA (7,0 ml; 4 eq) y DMAP (153,0 mg; 0,1 eq) a la solución. En la misma se disolvió ácido undecanoico (9,3 g; 4 eq) en 30 ml de THF, luego TEA (7,0 ml; 4 eq) y cloroformiato de etilo (4,76 ml, 4 eq) y se añadieron a la solución. El ácido se activó a de 0 – 5° C durante 15 minutos. Después de la activación del ácido, el precipitado, es decir, el anhídrido mixto de ácido undecanoico y cloroformiato de etilo, se filtró en la solución preparada de HA. La reacción se realizó durante 5 horas a temperatura ambiente. Después la mezcla de reacción se diluyó con 50 ml de agua con 4,0 g de NaCl. El derivado acilado se aisló de la mezcla de reacción mediante precipitación con el uso de 4 veces el volumen de 2-propanol absoluto. Después de la decantación, el precipitado fue repetidamente lavado, primero con solución acuosa de 2-propanol (80% en volumen) y luego con 2-propanol absoluto. Después, el precipitado se secó durante 48 horas a la temperatura de 40° C. El grado de sustitución se determinó como de 37% (determinado por RMN).

15 Ejemplo 3

La carga de 1 g de palmitoil hialuronano con el grado de sustitución del 36% y Pm de 250 kDa se disolvió en la mezcla de 10 ml de agua desmineralizada y 10 ml de 2-propanol. La solución resultante al 5,3% se desaireó por centrifugación e introdujo en el baño de coagulación con el uso del cargador NEXUS 6000 a la velocidad de extrusión de 200 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$. El baño de coagulación contenía solución acuosa saturada de ácido cítrico a temperatura ambiente. La fibra pasó a través del baño de la longitud de 0,4 m a la velocidad de 1,2 $\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$ y fue conificada y enrollada, con el uso de un conjunto de rodillos de bobinado, en un rodillo parcialmente sumergido en 100% de 2-propanol, donde se lavó, durante aproximadamente 1 hora.

Ejemplo 4

25 La carga de 1,3 g de palmitoil hialuronano con el grado de sustitución del 15% y Pm de 250 kDa se disolvió en la mezcla de 10 ml de agua desmineralizada y 10 ml de 2-propanol. La solución resultante al 6,8% se desaireó por centrifugación e introdujo en el baño de coagulación con el uso del cargador NEXUS 6000 a la velocidad de extrusión de 200 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$. El baño de coagulación contenía solución acuosa saturada de ácido cítrico a temperatura ambiente. La fibra pasó a través del baño de la longitud de 0,4 m a la velocidad de 1,2 $\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$ y fue conificada y enrollada, con el uso de un conjunto de rodillos de bobinado, en un rodillo parcialmente sumergido en 100% de 2-propanol, donde se lavó, durante aproximadamente 1 hora.

Ejemplo 5

35 La carga de 1,32 g de palmitoil hialuronano con el grado de sustitución del 46% y Pm de 250 kDa se disolvió en una mezcla de 11 ml de agua desmineralizada y 11 ml de 2-propanol. La solución resultante al 6,3% se desaireó por centrifugación y se introdujo en el baño de coagulación con el uso del cargador NEXUS 6000 a la velocidad de extrusión de 200 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$. El baño de coagulación contenía solución acuosa saturada de ácido cítrico a temperatura ambiente. La fibra pasó a través del baño de la longitud de 0,4 m a la velocidad de 1,2 $\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$ y fue conificada y enrollada, con el uso de un conjunto de rodillos de bobinado, en un rodillo parcialmente sumergido en 100% de 2-propanol, donde se lavó, durante aproximadamente 1 hora.

Ejemplo 6

40 La carga de 0,95 g de estearoil hialuronano con el grado de sustitución del 35% y Pm de 130 kDa se disolvió en la mezcla de 10 ml de agua desmineralizada y 10 ml de 2-propanol. La solución resultante al 5% se desaireó por centrifugación e introdujo en el baño de coagulación con el uso del cargador NEXUS 6000 a la velocidad de extrusión de 200 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$. El baño de coagulación contenía solución acuosa saturada de ácido cítrico a temperatura ambiente. La fibra pasó a través del baño de la longitud de 0,4 m a la velocidad de 1,2 $\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$ y fue conificada y enrollada, con el uso de un conjunto de rodillos de bobinado, en un rodillo parcialmente sumergido en 100% de 2-propanol, donde se lavó, durante aproximadamente 1 hora.

Ejemplo 7

50 La carga de 0,5 g de undecanoil hialuronano con grado de sustitución de 37% y Pm de 250 kDa se disolvió en la mezcla de 10 ml de agua desmineralizada y 10 ml de 2-propanol. La solución resultante al 2,7% se desaireó por centrifugación y se introdujo en el baño de coagulación con el uso del cargador NEXUS 6000 a la velocidad de extrusión de 200 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$. El baño de coagulación contenía solución acuosa saturada de ácido cítrico a temperatura ambiente. La fibra pasó a través del baño de la longitud de 0,4 m a la velocidad de 1,2 $\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$ y fue conificada y enrollada, con el uso de un conjunto de rodillos de bobinado, en un rodillo parcialmente sumergido en 100% de 2-propanol, donde se lavó, durante aproximadamente 1 hora.

55

Ejemplo 8

La carga de 1,32 g de palmitoil hialuronano con grado de sustitución de 46% y Pm de 250 kDa se disolvió en una mezcla de 11 ml de agua desmineralizada y 11 ml de 2-propanol. La solución resultante al 6,3% se desaireó por centrifugación y se introdujo en el baño de coagulación con el uso del cargador NEXUS 6000 a la velocidad de extrusión de 200 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$. El baño de coagulación contenía solución acuosa saturada de ácido tartárico a temperatura ambiente. La fibra pasó a través del baño de la longitud de 0,4 m a la velocidad de 1,2 $\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$ y fue conificada y enrollada, con el uso de un conjunto de rodillos de bobinado, en un rodillo parcialmente sumergido en 100% de 2-propanol, donde se lavó, durante aproximadamente 1 hora.

Ejemplo 9

La carga de 1,1 g de palmitoil hialuronano con grado de sustitución de 52% y Pm de 250 kDa se disolvió en una mezcla de 10 ml de agua desmineralizada y 10 ml de 2-propanol. La solución resultante al 5,7% se desaireó por centrifugación y se introdujo en el baño de coagulación con el uso del cargador NEXUS 6000 a la velocidad de extrusión de 200 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$. El baño de coagulación contenía solución acuosa saturada de ácido cítrico a temperatura ambiente. La fibra pasó a través del baño de la longitud de 0,4 m. a la velocidad de 1,2 $\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$ y fue conificada y enrollada, con el uso de un conjunto de rodillos de bobinado, en un rodillo parcialmente sumergido en 100% de 2-propanol, donde se lavó, durante aproximadamente 1 hora.

Ejemplo 10

La carga de 1,32 g de palmitoil hialuronano con grado de sustitución de 46% y Pm de 250 kDa se disolvió en una mezcla de 11 ml de agua desmineralizada y 11 ml de 2-propanol. La solución resultante al 6,3% se desaireó por centrifugación y se introdujo en el baño de coagulación con el uso del cargador NEXUS 6000 a la velocidad de extrusión de 200 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$. El baño de coagulación contenía solución acuosa saturada de ácido ascórbico a temperatura ambiente. La fibra pasó a través del baño de la longitud de 0,4 m a la velocidad de 1,2 $\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$ y fue conificada y enrollada, con el uso de un conjunto de rodillos de bobinado, en un rodillo parcialmente sumergido en 100% de 2 propanol, donde se lavó, durante aproximadamente 1 hora.

Ejemplo 11

La carga de 1,32 g de palmitoil hialuronano con grado de sustitución de 46% y Pm de 250 kDa se disolvió en una mezcla de 11 ml de agua desmineralizada y 11 ml de 2-propanol. La solución resultante al 6,3% se desaireó por centrifugación y se introdujo en el baño de coagulación con el uso del cargador NEXUS 6000 a la velocidad de extrusión de 200 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$. El baño de coagulación contenía solución acuosa saturada de ácido málico a temperatura ambiente. La fibra pasó a través del baño de longitud de 0,4 m a la velocidad de 1,2 $\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$ y fue conificada y enrollada, con el uso de un conjunto de rodillos de bobinado, en un rodillo parcialmente sumergido en 100% de 2-propanol, donde se lavó, durante aproximadamente 1 hora.

Ejemplo 12

La carga de 1,32 g de palmitoil hialuronano con grado de sustitución de 46% y Pm de 250 kDa se disolvió en una mezcla de 11 ml de agua desmineralizada y 11 ml de 2-propanol. La solución resultante al 6,3% se desaireó por centrifugación y se introdujo en el baño de coagulación con el uso del cargador NEXUS 6000 a la velocidad de extrusión de 200 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$. El baño de coagulación contenía una solución acuosa al 20% de ácido láctico a temperatura ambiente. La fibra pasó por el baño de la longitud de 0,4 m a la velocidad de 1,2 $\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$ y fue conificada y enrollada, con el uso de un conjunto de rodillos de bobinado, en un rodillo parcialmente sumergido en 100% de 2-propanol, donde se lavó, durante aproximadamente 1 hora.

Ejemplo 13

La carga de 1,32 g de palmitoil hialuronano con grado de sustitución de 46% y Pm de 250 kDa se disolvió en una mezcla de 11 ml de agua desmineralizada y 11 ml de 2-propanol. La solución resultante al 6,3% se desaireó por centrifugación y se introdujo en el baño de coagulación con el uso del cargador NEXUS 6000 a la velocidad de extrusión de 200 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$. El baño de coagulación contenía una solución acuosa al 20% de ácido láctico a temperatura ambiente. La fibra pasó por el baño de la longitud de 0,4 m a la velocidad de 1,2 $\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$ y fue conificada y enrollada, con el uso de un conjunto de rodillos de bobinado, en un rodillo parcialmente sumergido en 100% de 2-propanol, donde se lavó, durante aproximadamente 1 hora. El último rodillo se aceleró hasta 1,4 $\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$ en comparación con el que estaba al lado del último, por lo que las fibras fueron estiradas a aproximadamente un 20%.

Ejemplo 14

La carga de 1,32 g de palmitoil hialuronano con grado de sustitución de 46% y Pm de 250 kDa se disolvió en una mezcla de 11 ml de agua desmineralizada y 11 ml de 2-propanol. La solución resultante al 6,3% se desaireó por centrifugación y se introdujo en el baño de coagulación con el uso del cargador NEXUS 6000 a la velocidad de extrusión de 200 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$. El baño de coagulación contenía una solución acuosa al 50% de ácido oxálico a

temperatura ambiente. La fibra pasó por el baño de la longitud de 0,4 m a la velocidad de 1,2 m•min⁻¹ y fue conificada y enrollada, con el uso de un conjunto de rodillos de bobinado, en un rodillo parcialmente sumergido en 100% de 2-propanol, donde se lavó, durante aproximadamente 1 hora.

Ejemplo 15

- 5 La carga de 1,3 g de palmitoil hialuronano con grado de sustitución de 15% y Pm de 250 kDa se disolvió en una mezcla de 10 ml de agua desmineralizada y 10 ml de 2-propanol. La solución resultante al 6,8% se desaireó por centrifugación y se introdujo en el baño de coagulación con el uso del cargador NEXUS 6000 a la velocidad de extrusión de 200 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$. El baño de coagulación contenía una solución de ácido láctico compuesta de: 80% en peso de 2-propanol, 18% en peso de ácido láctico, 2% en peso de agua a temperatura ambiente. La fibra pasó por el
- 10 baño de la longitud de 0,4 m a la velocidad de 1,2 m•min⁻¹ y fue conificada y enrollada, con el uso de un conjunto de rodillos de bobinado, en un rodillo parcialmente sumergido en 100% de 2-propanol, donde se lavó, durante aproximadamente 1 hora.

Ejemplo 16

- 15 La carga de 0,95 g de estearoil hialuronano con grado de sustitución de 35% y Pm de 130 kDa se disolvió en una mezcla de 10 ml de agua desmineralizada y 10 ml de 2-propanol. La solución resultante al 5% se desaireó por centrifugación y se introdujo en el baño de coagulación con el uso del cargador NEXUS 6000 a la velocidad de extrusión de 200 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$. El baño de coagulación contenía una solución de ácido láctico compuesto de: 80% en peso de 2-propanol, 18% en peso de ácido láctico, 2% en peso de agua a temperatura ambiente. La fibra pasó por el
- 20 baño de la longitud de 0,4 m a la velocidad de 1,2 m•min⁻¹ y fue conificada y enrollada, con el uso de un conjunto de rodillos de bobinado, en un rodillo parcialmente sumergido en 100% de 2-propanol, donde se lavó, durante aproximadamente 1 hora.

Ejemplo 17

- 25 La carga de 0,5 g de undecanoil hialuronano con grado de sustitución de 37% y Pm de 250 kDa se disolvió en una mezcla de 10 ml de agua desmineralizada y 10 ml de 2-propanol. La solución resultante al 2,7% se desaireó por centrifugación y se introdujo en el baño de coagulación con el uso del cargador NEXUS 6000 a la velocidad de extrusión de 200 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$. El baño de coagulación contenía una solución de ácido láctico compuesta de: 80% en peso de 2-propanol, 18% en peso de ácido láctico, 2% en peso de agua a temperatura ambiente. La fibra pasó por el
- 30 baño de la longitud de 0,4 m a la velocidad de 1,2 m•min⁻¹ y fue conificada y enrollada, con el uso de un conjunto de rodillos de bobinado, en un rodillo parcialmente sumergido en 100% de 2-propanol, donde se lavó, durante aproximadamente 1 hora.

Ejemplo 18 (ejemplo comparativo)

- 35 La carga de 1,3 g de palmitoil hialuronano con grado de sustitución de 15% y Pm de 250 kDa se disolvió en una mezcla de 10 ml de agua desmineralizada y 10 ml de 2-propanol. La solución resultante al 6,8% se desaireó por centrifugación y se introdujo en el baño de coagulación con el uso del cargador NEXUS 6000 a la velocidad de extrusión de 200 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$. El baño de coagulación contenía una solución compuesta de 33% en peso de ácido benzoico y 67% en peso de 2-propanol a temperatura ambiente. La fibra pasó a través del baño de la longitud de 0,4 m a la velocidad de 1,2 m•min⁻¹ y fue conificada y enrollada, con el uso de un conjunto rodillos de bobinado, en un rodillo parcialmente sumergido en 100% de 2-propanol, donde se lavó, durante aproximadamente 1 hora

Sales de ácidos orgánicos.

40 Ejemplo 19

- 45 La carga de 1 g de palmitoil hialuronano con grado de sustitución del 36% y Pm de 250 kDa se disolvió en una mezcla de 10 ml de agua desmineralizada y 10 ml de 2-propanol. La solución resultante al 5,3% se desaireó por centrifugación y se introdujo en el baño de coagulación con el uso del cargador NEXUS 6000 a la velocidad de extrusión de 200 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$. El baño de coagulación contenía una solución acuosa saturada de citrato de (tri)sodio a temperatura ambiente. La fibra pasó a través del baño de una longitud de 0,4 m a una velocidad de 1,2 m•min⁻¹ y fue conificada y enrollada, con el uso de un conjunto de rodillos de bobinado, en un rodillo parcialmente sumergido en 100% de 2-propanol, donde se lavó, durante aproximadamente 1 hora.

Ejemplo 20 (ejemplo comparativo)

- 50 La carga de 1 g de palmitoil hialuronano con grado de sustitución del 36% y Pm de 250 kDa se disolvió en una mezcla de 10 ml de agua desmineralizada y 10 ml de 2-propanol. La solución al 5,3% resultante se desaireó por centrifugación y se introdujo en el baño de coagulación con el uso del cargador NEXUS 6000 a la velocidad de extrusión de 200 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$. El baño de coagulación contenía una solución saturada acuosa de acetato de magnesio a temperatura ambiente. La fibra pasó a través del baño de la longitud de 0,4 m a la velocidad de 1,2 m•min⁻¹ y fue conificada y enrollada, con el uso de un conjunto de rodillos de bobinado, en un rodillo parcialmente sumergido en
- 55 100% de 2-propanol, donde se lavó, durante aproximadamente 1 hora.

Ejemplo 21 (ejemplo comparativo)

5 La carga de 1 g de palmitoil hialuronano con grado de sustitución del 36% y Pm de 250 kDa se disolvió en una mezcla de 10 ml de agua desmineralizada y 10 ml de 2-propanol. La solución al 5,3% resultante se desaireó por centrifugación y se introdujo en el baño de coagulación con el uso del cargador NEXUS 6000 a la velocidad de extrusión de 200 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$. El baño de coagulación contenía una solución saturada acuosa de acetato de sodio a temperatura ambiente. La fibra pasó a través del baño de la longitud de 0,4 m a la velocidad de 1,2 $\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$ y fue conificada y enrollada, con el uso de un conjunto de rodillos de bobinado, en un rodillo parcialmente sumergido en 100% de 2-propanol, donde se lavó, durante aproximadamente 1 hora.

Ejemplos comparativos 22-24

10 Ejemplo 22

Comparación con el baño utilizado en los documentos de patente internacional WO 93/11803, WO 98/08876, documentos de patente de los Estados Unidos US 5658582, US 006632802 B2, US 2004/0192643 A1.

15 La carga de 1 g de palmitoil hialuronano con grado de sustitución del 36% y Pm de 250 kDa se disolvió en una mezcla de 10 ml de agua desmineralizada y 10 ml de 2-propanol. La solución al 5,3% resultante se desaireó por centrifugación y se introdujo en el baño de coagulación con el uso del cargador NEXUS 6000 a la velocidad de extrusión de 200 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$. El baño de coagulación contenía solución de etanol absoluto. La fibra resultante no pudo ser conificada por el conjunto de rodillos de bobinado, ya que la fibra se rompía. Se obtuvieron piezas de longitud máxima de 100 mm y fueron sacadas con el uso de un fórceps.

Ejemplo 23

20 Comparación con el baño utilizado en el documento de patente internacional WO2009/050389, documento PV 2010-1001.

25 La carga de 1,32 g de palmitoil hialuronano con grado de sustitución de 46% y Pm de 250 kDa se disolvió en una mezcla de 11 ml de agua desmineralizada y 11 ml de 2-propanol. La solución resultante al 6,3% se desaireó por centrifugación y se introdujo en el baño de coagulación con el uso del cargador NEXUS 6000 a la velocidad de extrusión de 200 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$. El baño de coagulación contenía una solución de alcohol compuesta de 98% de ácido acético y 100% de 2-propanol (proporción 4:1 en volumen) a temperatura ambiente. La fibra pasó a través del baño de la longitud de 0,4 m a la velocidad de 1,2 $\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$ y fue conificada y enrollada, con el uso de un conjunto de rodillos de bobinado, en un rodillo parcialmente sumergido en 100% de 2-propanol, donde se lavó, durante aproximadamente 1 hora.

30 Ejemplo 24

Comparación con el baño utilizado en el documento PV2010-1001.

35 La carga de 1,32 g de palmitoil hialuronano con grado de sustitución de 46% y Pm de 250 kDa se disolvió en una mezcla de 11 ml de agua desmineralizada y 1 ml de 2-propanol. La solución resultante al 6,3% se desaireó por centrifugación y se introdujo en el baño de coagulación con el uso del cargador NEXUS 6000 a la velocidad de extrusión de 200 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$. El baño de coagulación estaba formado por una solución de alcohol compuesta de 98% de ácido fórmico y 100% de 2-propanol (proporción 4:1 en volumen) a temperatura ambiente. La fibra pasó a través del baño de la longitud de 0,4 m a la velocidad de 1,2 $\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$ y fue conificada con el uso de un conjunto de rodillos de bobinado. La fibra se rompió durante el conificado muy a menudo (falta de resistencia); se obtuvieron piezas de una longitud de 300 mm.

40 Ejemplo 25

45 La carga de 1,32 g de palmitoil hialuronano con grado de sustitución de 46% y Pm de 250 kDa se disolvió en una mezcla de 11 ml de agua desmineralizada y 11 ml de 2-propanol. La solución al 6,3% resultante se desaireó por centrifugación y se introdujo en el baño de coagulación con el uso del cargador NEXUS 6000 a la velocidad de extrusión de 200 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$. El baño de coagulación contenía una solución acuosa al 80% de ácido propiónico a temperatura ambiente. La fibra pasó a través del baño de la longitud de 0,4 m a la velocidad de 1,2 $\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$ y fue conificada y enrollada, con el uso de un conjunto de rodillos de bobinado, en un rodillo parcialmente sumergido en 100% de 2-propanol, donde se lavó, durante aproximadamente 1 hora.

Ejemplo 26

50 La carga de 1,32 g de palmitoil hialuronano con grado de sustitución de 46% y Pm de 250 kDa se disolvió en una mezcla de 11 ml de agua desmineralizada y 11 ml de 2-propanol. La solución resultante al 6,3% se desaireó por centrifugación y se introdujo en el baño de coagulación con el uso del cargador NEXUS 6000 a la velocidad de extrusión de 200 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$. El baño de coagulación contenía una solución acuosa al 80% de ácido acético a temperatura ambiente. La fibra pasó por el baño de la longitud de 0,4 m a la velocidad de 1,2 $\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$ y fue conificada y enrollada, con el uso de un conjunto de rodillos de bobinado, en un rodillo parcialmente sumergido en

100% de 2-propanol, donde se lavó, durante aproximadamente 1 hora.

Ejemplo 27

5 La carga de 1,32 g de palmitoil hialuronano con grado de sustitución de 46% y Pm de 250 kDa se disolvió en una mezcla de 11 ml de agua desmineralizada y 11 ml de 2-propanol. La solución resultante al 6,3% se desaireó por centrifugación y se introdujo en el baño de coagulación con el uso del cargador NEXUS 6000 a la velocidad de extrusión de $200 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$. El baño de coagulación contenía una solución acuosa al 80% de ácido fórmico a temperatura ambiente. La fibra pasó por el baño de la longitud de 0,4 m a la velocidad de $1,2 \text{ m}\cdot\text{min}^{-1}$ y fue conificada con el uso de un conjunto de rodillos de bobinado. La fibra se rompía durante el conificado muy a menudo (falta de resistencia); se obtuvieron piezas de 300 mm de longitud.

10 Ejemplo 28

La biodegradabilidad de las fibras se probó en el medio enzimático de hialuronidasa (hialuronidasa testicular bovina, Sigma Aldrich) y esterasa (enzima hepática de conejo, Sigma Aldrich).

15 El método utilizado para estudiar la degradación de las fibras en presencia de enzimas es la determinación de la porción soluble (oligosacáridos de hialuronano) con el uso del agente Somogyi-Nelson [9]. La determinación de la degradación enzimática de las fibras se realizó de la siguiente manera: Las fibras preparadas de manera similar a las del Ejemplo 12 se midieron a la longitud constante de 400 mm, con un peso constante de 10 mg, se enrollaron en una correa de Jacquard, se colocaron en un microtubo de Eppendorf de 500 μl y se incrustaron mediante PBS estéril durante 24 horas para lavar las fibras. Después de succionar el PBS de lavado, se añadió un nuevo tampón (500 μl) al tubo. Se prepararon 3 muestras de cada fibra:

20 A) la fibra en PBS solamente (control);

B) la fibra en PBS con hialuronidasa testicular bovina (200 U);

C) la fibra en PBS con hialuronidasa (BTH; 200 U) con esterasa hepática de conejo.

25 Como las enzimas también pueden actuar como fuente de terminación reductiva, se preparó el control de fondo, es decir solamente PBS, PBS+BTH y PBS+BTH+CHE, para todas las fibras. Durante la medición, la absorbancia de fondo se restaba de la absorbancia de las muestras con las fibras.

30 Después de agregar las enzimas a las fibras y agitar, las muestras se tomaron a 0, 2, 4 y 6 horas. Las muestras tomadas (60 μl) se colocaron en microtubos de 200 μl a -20°C . Antes de su análisis, las muestras se degradaron térmicamente (60 minutos, 100°C) para minimizar la influencia de los varios Pm de los fragmentos escindidos. Los extremos reductores libres fueron determinados por la reacción con el agente Somogyi y Nelson [9] con la siguiente modificación: 50 μl de la muestra se mezcló con el mismo volumen del agente Somogyi recién preparado. Después de agitar durante 15 minutos la mezcla se incubó en un termobloque a 100°C . Después del enfriamiento, se añadió 100 μl del agente Nelson, las muestras se agitaron, se centrifugaron durante un período corto, 125 μl del producto teñido se transfirió a una placa de microtitulación de 96 pocillos y se midió la absorbancia a 540 nm. Después de restar el fondo, los valores equivalentes de glucosa (= número de extremos reductores) se determinaron a partir de una curva de calibración.

Resultados de las degradaciones - la relación de la velocidad de reacción enzimática y el grado de sustitución de un derivado

Derivado	Grado de sustitución	Baño de precipitado	Concentración de extremos libres reductores (mM)			
			0 h	2 h	4 h	6 h
Palmitoil HA	15%	20% solución acuosa de ácido láctico	0,0026	0,8271	0,9501	1,2202
Palmitoil HA	36%	20% solución acuosa de ácido láctico	0	0,1826	0,3464	0,3826
Palmitoil HA	52%	20% solución acuosa de ácido láctico	0,0026	0,2014	0,2764	0,2943
Estearoil HA	37%	20% solución acuosa de ácido láctico	0,86	0,182	0,23	0,302
Undecanoil HA	37%	20% solución acuosa de ácido láctico	0,129	0,469	0,578	0,585

La conclusión es que las fibras preparadas son biodegradables. La velocidad de la degradación depende del derivado utilizado y de su grado de sustitución.

Ejemplo 29

5 Se estudió la citotoxicidad de los derivados y las fibras con el uso de la prueba MTT en el cultivo de fibroblastos dérmicos de ratón 3T3 durante 72 horas. Tanto el derivado como las fibras se pesaron y se sumergieron en isopropanol en una caja laminar hasta que el isopropanol se evaporó. Los derivados/fibras secas se transportaron a un medio de crecimiento (3600 µg/ml de fibras y 1000 µg/ml de un derivado) y se mantuvieron durante la noche para que se hincharan. Las fibras fueron desintegradas con el uso de un ultrathurax para obtener una suspensión homogénea. Los extractos de las fibras o el filtrado de la mezcla, filtrados con el uso de un filtro de 100 µm, fueron también probados pero estas modificaciones no influyeron en la viabilidad, por lo que las próximas fibras se probaron solo en forma de suspensión desintegrada.

Los resultados de las pruebas de viabilidad muestran que ni el derivado ni las fibras preparadas influyen significativamente en la viabilidad celular.

Ejemplo 30

15 Las fibras se degradaron con el uso de enzimas hialuronidasa y enzimas esterases. Se agregaron 20 U de esterasa y 200 U de hialuronidasa a 20 mg de mechas de fibra en 750 µl de PBS. Las fibras con las enzimas se mantuvieron a la temperatura de 37° C durante 72 horas. Luego, esta mezcla se usó para afectar las células. Las concentraciones probadas fueron de 1000, 500 y 100 µg/ml, según la concentración de fibra a partir de la cual se preparó el sobrenadante. La línea celular y el procedimiento de prueba de viabilidad son los mismos que en el Ejemplo 25. El procedimiento se realizó 3 veces de forma independiente y los datos se evaluaron estadísticamente con el uso de la prueba t de Student.

Los resultados de las pruebas de viabilidad muestran que los productos de degradación de las fibras tampoco influyen significativamente en la viabilidad celular.

Los resultados de las pruebas de viabilidad de los productos de degradación fueron:

Denominación	Una fibra según el Ejemplo N°	Baño
a	3	solución acuosa de ácido cítrico
b	8	solución acuosa de ácido tartárico
c	12	solución acuosa de ácido láctico
k	control	una fibra de hialouronano nativo

25

Ejemplo 31

30 La tensión de rotura se probó mecánicamente con el uso de un probador de resistencia a la tensión de rotura de una columna Instron 3343; la cabeza usada fue de 100 N. Durante la prueba, primero se preajusta la fibra a la velocidad de 1 mm•min⁻¹ hasta la tensión de 0,05 N. Después del ajuste, ambos la tensión y la deformación se restablecen automáticamente y luego la prueba se realiza a la velocidad de 10 mm•min⁻¹ hasta que la fibra se rompa. Las pruebas de resistencia a la tensión de rotura se realizaron a temperatura ambiente y humedad relativa ambiente.

35 La resistencia y la deformación en la rotura se calcularon como una mediana de al menos 5 mediciones válidas. Las fibras alcanzan la resistencia de 3 a 10 cN•tex⁻¹, dependiendo de la concentración del derivado y del grado de sustitución y también de la velocidad de estiramiento. La deformación alcanza los valores de 5 a 40% dependiendo de los parámetros anteriormente mencionados. Las tablas muestran los valores de la resistencia y la tensibilidad, estos números son la media.

	Preparadas según	Pm HA [kDa]	p Ka	Resistencia [cN/dtex]	Tensibilidad [%]
Derivado hidrofobizado HA	Ejemplo 1	253	-	-	
Ácido fórmico	Ejemplo 27	88	3,75	No es posible medirlo	
Ácido acético	Ejemplo 26	167	4,76	0,56	16,13
Ácido propiónico	Ejemplo 25	193	4,88	0,30	11,00
Ácido ascórbico	Ejemplo 10	120	4,1	0,94	21,07
Ácido láctico	Ejemplo 12	137	3,86	0,58	21,90
Ácido málico	Ejemplo 11	130	3,46	0,75	25,83
Ácido cítrico	Ejemplo 5	106	3,15	0,78	20,53
Ácido tartárico	Ejemplo 8	95	3,01	0,49	16,49

La tabla con los valores de la resistencia y deformación de las fibras preparadas a partir de hialuronano en una forma similar a los Ejemplos 12 y 13.

Baño	Según el número de ejemplo	Concentración n [%]	Grado de sustitución [%]	Transparencia [tex]	Resistencia cN/dtex	Tensibilidad [%]
20% solución acuosa de ácido láctico	13	5,7	52	12,2	0,93	39
20% solución acuosa de ácido láctico	12	7	15	16,3	0,56	13
20% solución acuosa de ácido láctico	12	6	41	15	0,55	37
20% solución acuosa de ácido láctico	12	6	36	17	0,47	29
20% solución acuosa de ácido láctico	13	6,3	48	11,2	0,86	20
20% solución acuosa de ácido láctico	13	6,3	48	11	0,86	17

5

Se obtiene de la medición de las propiedades mecánicas de las fibras y de los experimentos que las fibras pueden ser procesadas por procesamiento textil.

Ejemplo 32

10 Las fibras hechas de palmitoil hialuronano (fibras preparadas de manera similar a la del Ejemplo 12) fueron retorcidas en un aparato de torsión con una velocidad de huso de 1400 rpm y velocidad de alimentación del monofilamento de 4 m•min⁻¹. Los hilos de palmitoil hialuronano se muestra en la Figura 9.

Ejemplo 33

15 Las fibras preparadas de una manera similar a la del Ejemplo 12 se procesaron como textiles en la máquina de tejer trama plana Shima-Seiku con selección automática de aguja en forma de tejido de punto de trama de una cara (Figura 10) y en forma de doble tejido de punto de trama (Figura 11).

Las fibras preparadas de forma similar a las del Ejemplo 12 fueron procesadas como textiles en la máquina de tejer trama tubular operativa Harry Lucas en forma de tejido tubular (Figura 12).

REIVINDICACIONES

1. Un método de preparación de fibras basado en un derivado de hialuronano C₁₁-C₁₈ acilado en los grupos hidroxilo del ácido hialurónico caracterizado por que se prepara una solución de hilatura que comprende un derivado acilado de hialuronano de la concentración en el intervalo de 0,01% en peso a 15% en peso en una mezcla de agua y 2-propanol, donde el contenido de agua está en un intervalo de 30% en volumen a 90% en volumen, el contenido de 2-propanol de 10% en volumen a 70 % en volumen, después la solución de hilatura se introduce en el baño de coagulación que comprende una solución acuosa de un ácido orgánico o sus sales de metales alcalinos o metales alcalinotérreos, en donde el ácido se selecciona del grupo que comprende el ácido láctico, tartárico, cítrico, málico, ascórbico, oxálico o una combinación de los mismos, para forman fibras que luego se lavan con alcohol y se secan.
2. El método de preparación según la reivindicación 1, caracterizado por que el derivado de hialuronano se acila preferiblemente en el alcohol primario de N-acetil-glucosamina.
3. El método de preparación según la reivindicación 1 o 2, caracterizado por que el derivado de hialuronano se selecciona del grupo que comprende derivados C₁₁-C₁₂ acilados con un grado de sustitución del 30% y más, derivados C₁₃-C₁₅ acilados con un grado de sustitución del 20% y más, y derivados C₁₆-C₁₈ acilados con un grado de sustitución de 5% y más.
4. El método de preparación según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que el derivado de hialuronano es el palmitoil hialuronano.
5. El método de preparación según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que la concentración de la solución acuosa de ácido orgánico en el baño de coagulación es del 0,5% al 30% en peso para el ácido láctico, del 0,5% al 42% en peso para el ácido cítrico, 0,5% a 50% en peso para el ácido málico, 0,5% a 25% en peso para el ácido ascórbico, y 0,5% a 60% en peso para el ácido oxálico.
6. El método de preparación según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que el baño de coagulación está formado por una solución acuosa saturada de un ácido orgánico
7. El método de preparación según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que el baño de coagulación contiene una solución acuosa saturada de ácido láctico.
8. El método de preparación según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que la solución de hilatura se desairea antes de su introducción en el baño de coagulación.
9. El método de preparación según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que la temperatura del baño de coagulación está en el intervalo de 15 a 45° C y el tiempo de mantenimiento de las fibras en el baño de coagulación está en el intervalo de 10 segundos a 24 horas.
10. El método de preparación según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que las fibras se lavan con un alcohol seleccionado de grupo que comprende el etanol, 1-propanol y 2-propanol, y opcionalmente se estiran después del lavado con el alcohol.
11. La fibra basada en el derivado de hialuronano C₁₁-C₁₈ acilado en los grupos hidroxilo del ácido hialurónico caracterizada por que su diámetro es de 50 a 300 µm y su resistencia a la tracción está en el intervalo de 0,3 a 1 cN/dtex, y su alargamiento está en el intervalo de 10 a 40%.
12. El uso de la fibra definida en la reivindicación 11, para la producción de tejido de punto, textiles tejidos o textiles no tejidos.
13. El textil sobre la base de las fibras definidas en la reivindicación 11.
14. El uso de los textiles sobre la base de las fibras definidas en la reivindicación 11, para la producción de materiales quirúrgicos implantables en la medicina humana y veterinaria.

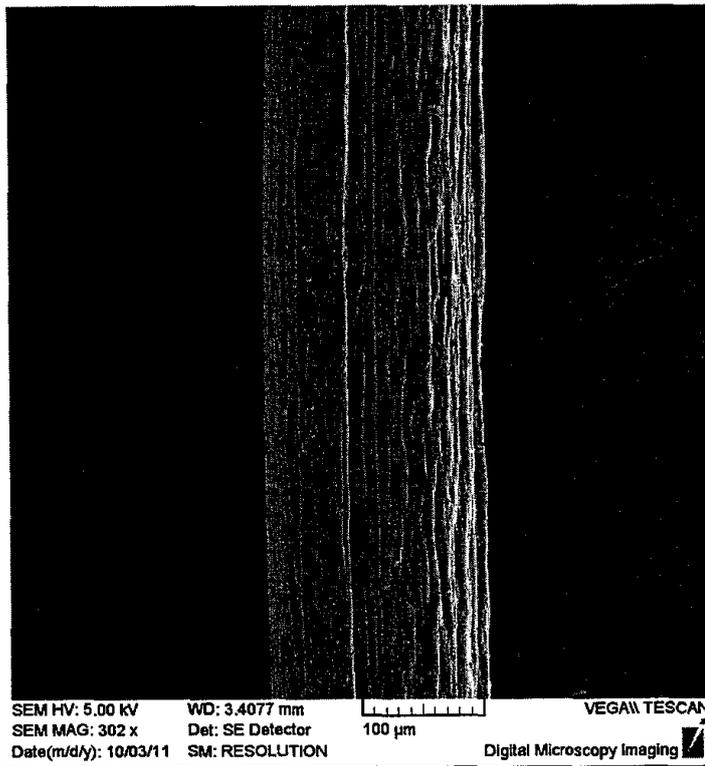


FIG. 1

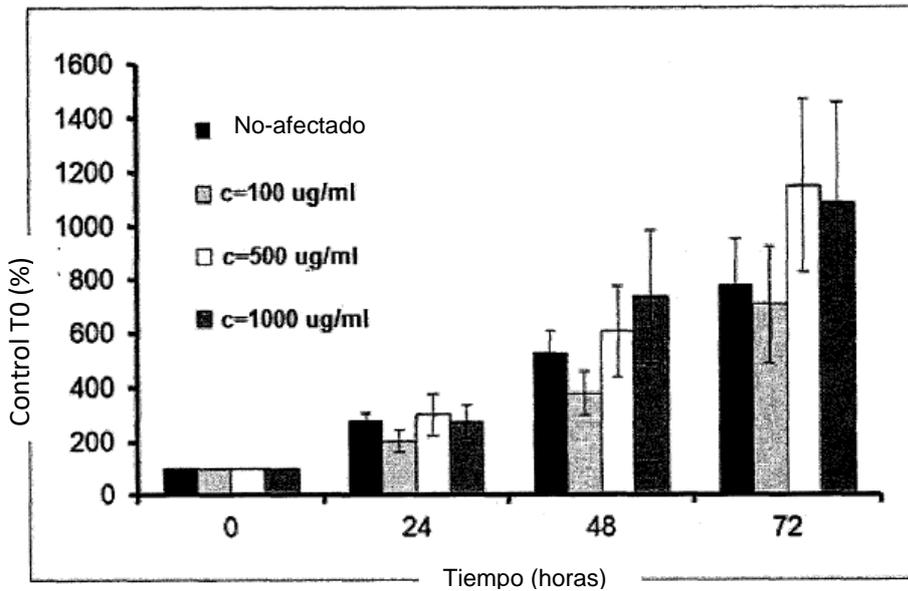


FIG. 2

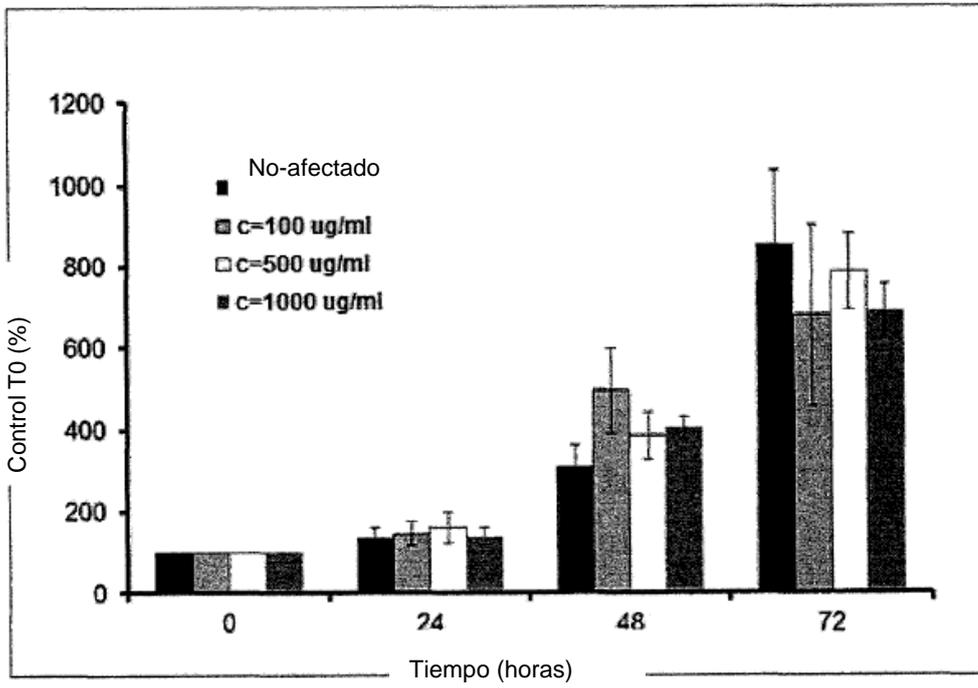


FIG. 3

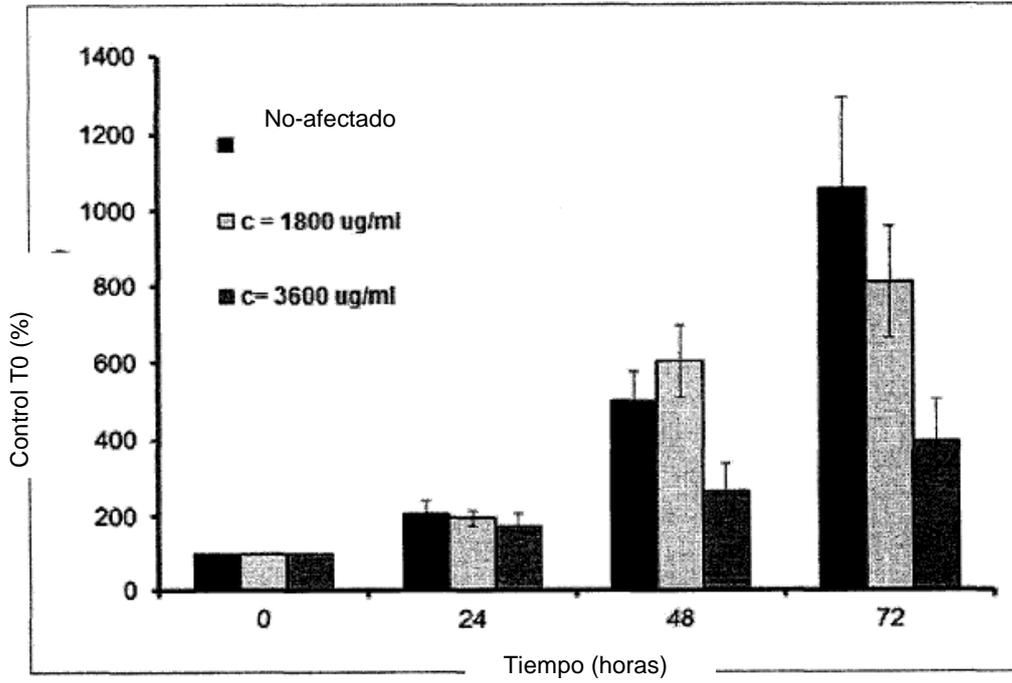


FIG. 2

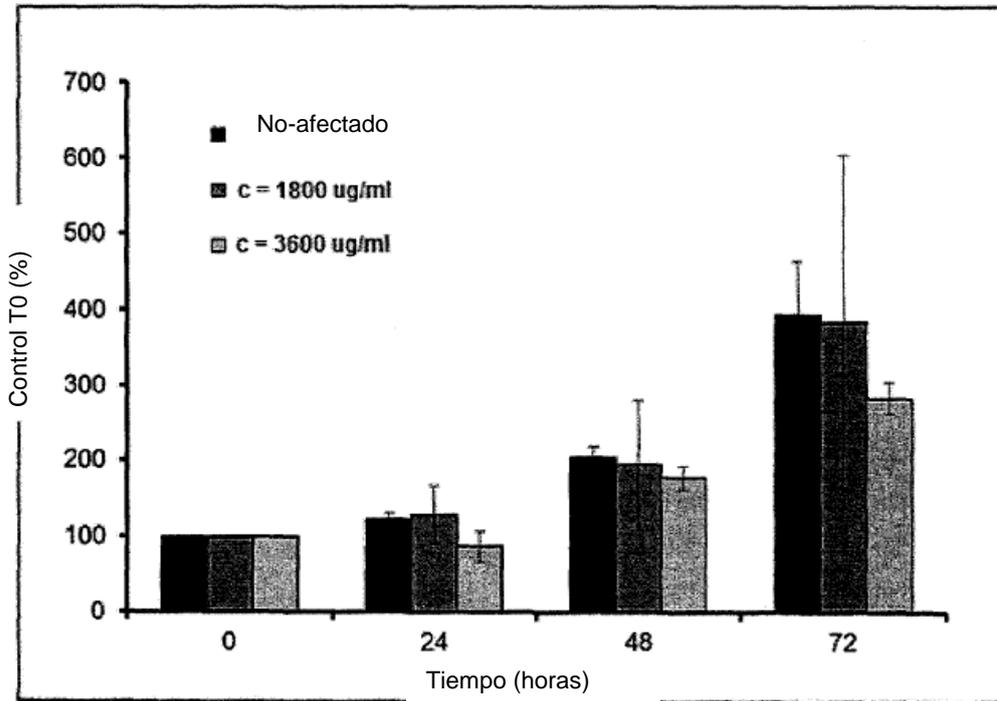


FIG. 5

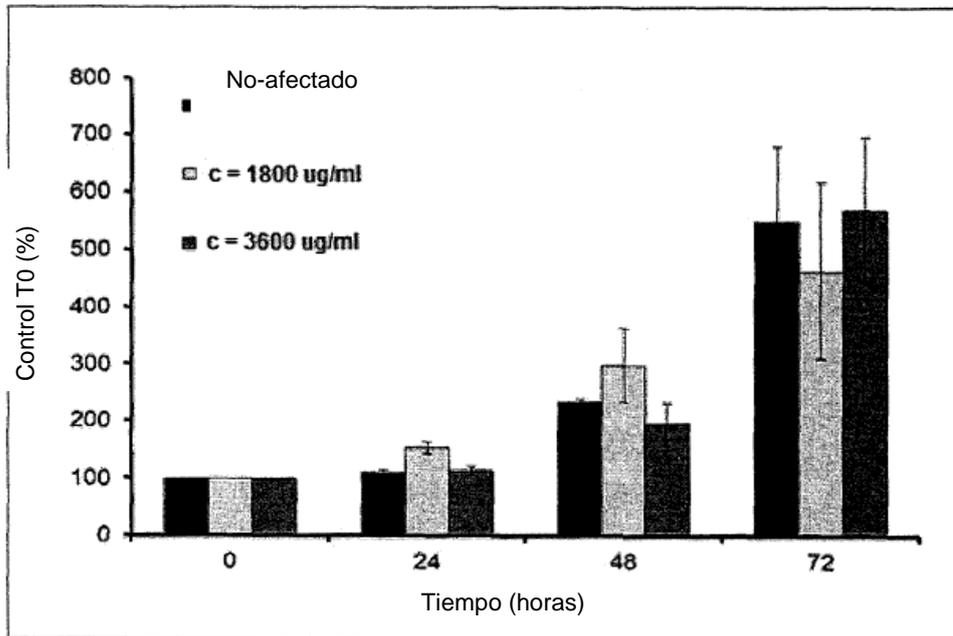


FIG. 6

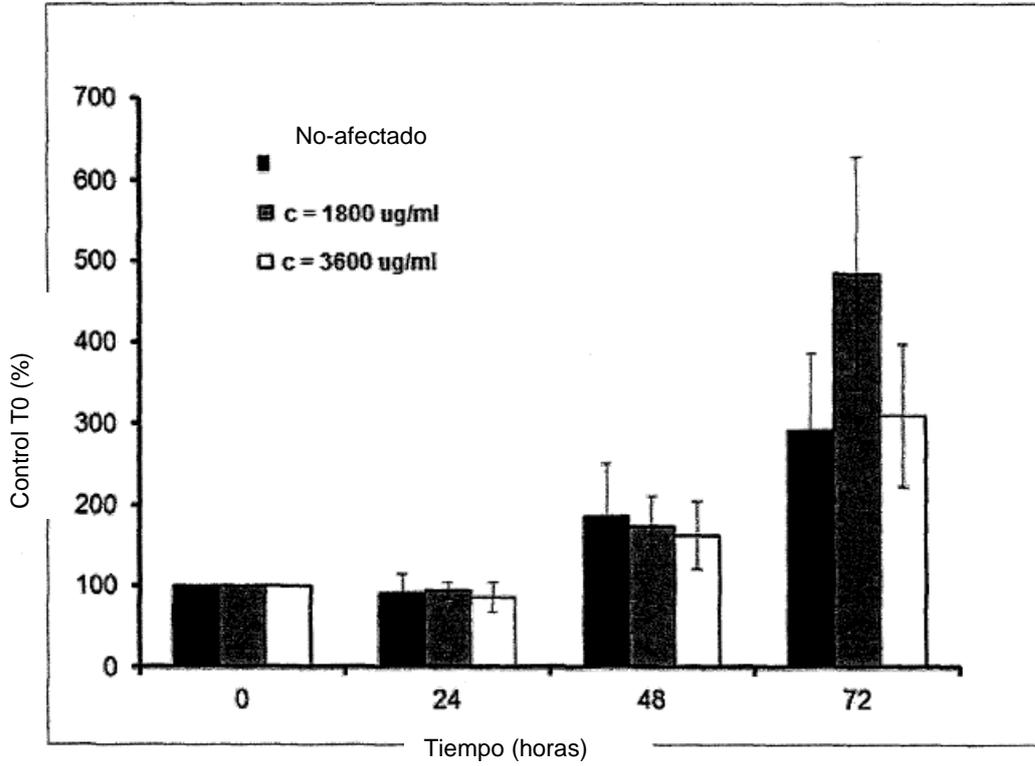


FIG. 7

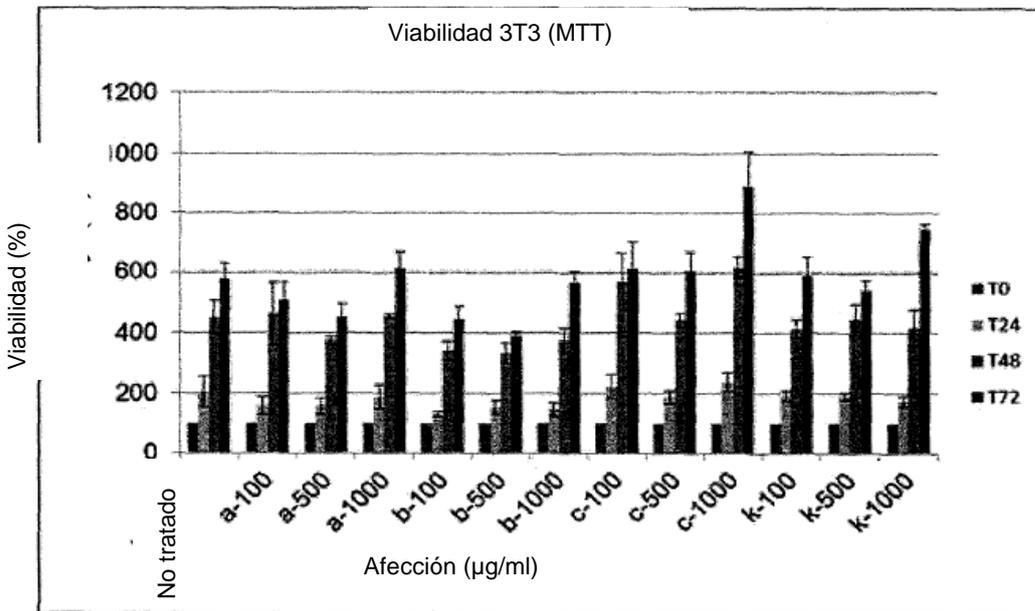


FIG. 8

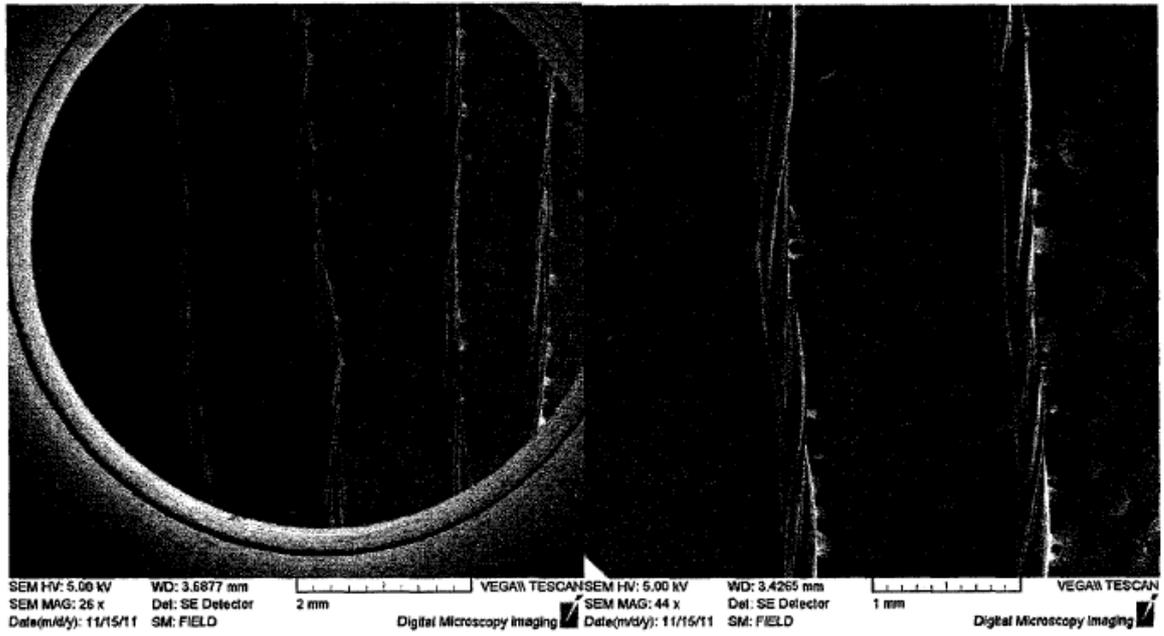


FIG. 9



FIG. 10

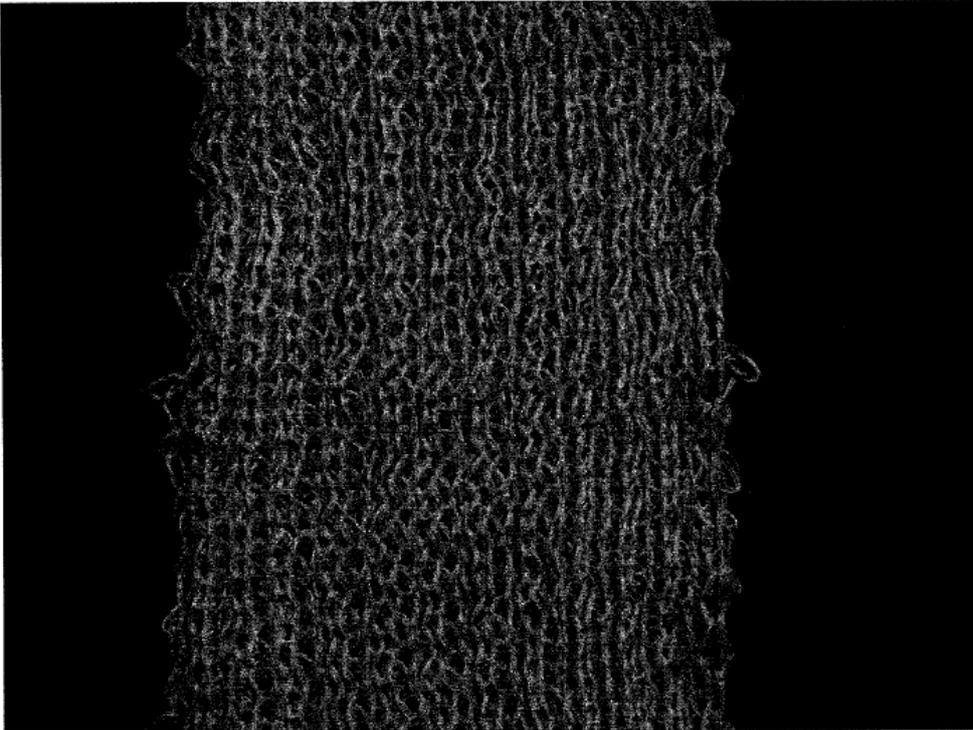


FIG. 11

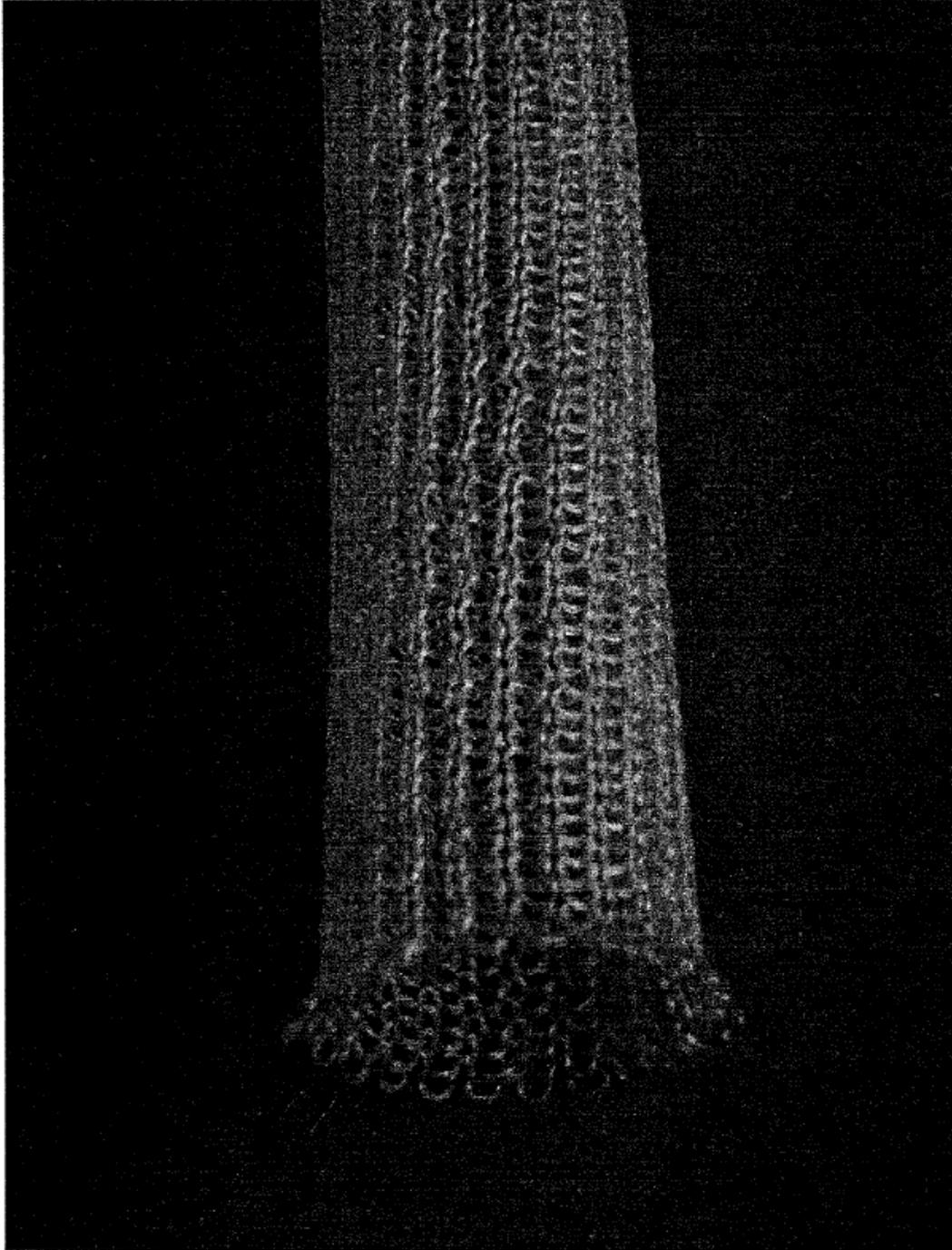


FIG. 12