(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **3 026 557**

(51) Int. Cl.:

C08J 3/24 (2006.01)
A61K 9/51 (2006.01)
A61K 47/36 (2006.01)
C07H 15/12 (2006.01)
C08L 5/08 (2006.01)
C08B 37/08 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.02.2021 PCT/EP2021/053204**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **19.08.2021 WO21160667**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.02.2021 E 21705897 (3)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.02.2025 EP 4103640**

(54) Título: **Nuevo método de síntesis de derivados del quitosano y usos de los mismos**

(30) Prioridad:

11.02.2020 RU 2020106398
11.02.2020 EP 20156732

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.06.2025

(73) Titular/es:

NOVOCHIZOL SA (100.00%)
Route de l'Ile-au-Bois 1a
1870 Monthey, CH

(72) Inventor/es:

KARGAPOLOV, YURIY y
FOMENKO, VLADISLAV

(74) Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

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

Nuevo método de síntesis de derivados del quitosano y usos de los mismos

Campo de la invención

La presente invención se refiere a la preparación de quitosano, en particular nanopartículas de quitosano, a preparaciones, a composiciones y a usos de las mismas, en particular, en los campos de la química, la biología, la medicina y las ciencias de los materiales.

Antecedentes de la invención

Los biopolímeros son materiales prometedores como portadores de diversos fármacos y otras sustancias activas debido a su biocompatibilidad, biodegradación y no toxicidad cuando se administran. Con una modificación química adecuada, estos polímeros pueden proporcionar mejores materiales para los sistemas de suministro de fármacos, donde las sustancias activas ser tanto compuestos de bajo peso molecular (moléculas pequeñas) como compuestos de alto peso molecular (marcomoléculas). Los portadores de fármacos nanoestructurados permiten el suministro de compuestos de alto peso molecular tales como ácidos nucleicos y proteínas (Advances in Polymer Science. Chitosan for Biomaterials I. Volume Editores: R. Jayakumar, M. Prabaharan, R.A.A. Muzzarelli. Springer Heidelberg Dordrecht Londres Nueva York 2011 DOI 10.1007/978-3-642-23114-8).

El quitosano es uno de los candidatos a biopolímero más prometedores para la creación de nanopartículas. Por un lado, tiene propiedades nativas atractivas tales como mucoadhesividad, biocompatibilidad y baja toxicidad, capacidad de biodegradación y formación de complejos y por otro lado, la alta regularidad de la estructura y la presencia de grupos hidroxilo y amino en ella presentan buenas perspectivas para la modificación selectiva del polímero.

Por lo tanto, esas propiedades del quitosano han atraído la atención para el desarrollo de soluciones de suministro de fármacos (Bhattarai *et al.*, 2010, Advanced Drug Delivery Reviews, 62 83-99. doi: 10.1016/j.addr.2009.07.019).

Aunque el quitosano presenta varias características favorables como un portador excelente, el uso de quitosano no modificado es limitado debido a su baja solubilidad en condiciones fisiológicas. Para superar esta limitación, se han desarrollado muchas modificaciones químicas diferentes del quitosano, (Kritchenkov *et al.*, 2017, Russ. Chem. Rev., 86, 231-239. http://dx.doi.org/10.1070/RCR4636; Chuan*et al.*, 2019, Adv. Colloid Interface Sci., 268, 25-38.; Jiang, H.-L.; Xing *et al.*, 2018, Curr. Org. Chem., 22, 668-689. DOI: 10.2174113852728216661709261635 44; Layek, B.; Singh, J. 8-Chitosan for DNA and gene therapy. En Chitosan Based Biomaterials Volumen 2; Jennings, J.A., Bumgardner, J.D., Eds.; Woodhead Publishing: Cambridge, RU, 2017; págs. 209-244).

La estructura del quitosano ofrece la posibilidad de modificarse de diversas maneras. Para aumentar la hidrofobicidad, las amidas de quitosano pueden fabricarse fácilmente con ácidos grasos, derivados de esteroles, ácido urocánico, derivados del ácido carboxílico que contienen un fragmento de imidazol, etc. Como alternativa, las aminas secundarias de quitosano pueden formarse usando sustituyentes de alquilo de diversas estructuras, derivados de piridina, espermidina y otros por alquilación o aminación reductora a través de bases de Schiff apropiadas. Para aumentar la hidrofilicidad, las amidas de quitosano pueden crearse con aminoácidos, incluyendo aminoácidos que contienen azufre, ácido lactobiónico, ácido tioglicólico, etc. Adicionalmente, las aminas secundarias del quitosano pueden obtenerse usando diversos azúcares, polietilenimina y sus derivados. La síntesis de derivados de polietilenglicol por pegilación es especialmente popular. Los derivados de quitosano producidos de acuerdo con estos métodos mejoran su capacidad para formar nanopartículas, en particular con polielectrolitos tales como ácidos nucleicos y pueden tener propiedades farmacológicas alteradas. (Mao *et al.*, 2010, Advanced Drug Delivery Reviews, 62, 12-27 doi:10.1016/j.addr.2009.08.004).

Las nanopartículas de quitosano pueden formarse de una manera esencialmente irreversible a través de la reticulación química que implica la formación de enlaces covalentes con el uso de diferentes reactivos para catalizar dicha reticulación (*Bhattarai et al., 2010,* anteriormente citado). Históricamente, el glutaraldehído y el formaldehído fueron los primeros y más populares agentes usados para esta reticulación, pero hoy en día están perdiendo popularidad debido a la dificultad de eliminar todo rastro de estos compuestos tóxicos, así como la hidrólisis lenta de las nanopartículas que liberan estos aldehídos. La genepina ha recibido mucha atención recientemente, pero este reactivo es muy caro y propenso a la polimerización. El escuarato de dietilo (DES), el diglicidiléter de etilenglicol (EGDE) y los diisocianatos bloqueados reaccionan con bastante lentitud y las reacciones con ellos tienen lugar principalmente a temperaturas elevadas, lo que puede contribuir a reacciones secundarias. También existen reactivos de reticulación fotoactivados: azidas funcionales, acrilatos funcionales, así como agentes activados por enzimas: ácido florético y quinonas activadas. Por ejemplo, Baoqiand *et al.*, 2015 en Acta Biomaterialia, 22, 1742-7061 *o* Journal of Nanotechnology in engineering and medicine, 6, 041001-6 proporcionan un método para producir quitosano reticulado usando polimerización radical fotoiniciada de un quitosano en solución después de hacer reaccionar el quitosano con anhídrido metacrílico, dando lugar de esta manera a un compuesto de poliacrilamida en forma de gel o espuma. Los derivados de carboximetilo del quitosano se describen en El-sherbiny *et al.*, 2009, European Polymer Journal 45, 1, 199-210 en donde en una primera etapa se introduce un grupo carboxílico en el quitosano haciendo reaccionar el

grupo alcohólico primario en el quitosano con ácido monocloroacético en un medio alcalino y en una segunda etapa se añaden polímeros de acriloilglicina a través de polimerización inducida por luz dando lugar a un quitosano sin reticulación interna. El documento US 5.770.712 describe un método para fabricar un quitosano reticulado combinando material de quitosano que tiene grupos de amina primaria sin reaccionar con una cantidad en exceso de un compuesto epóxido polifuncional que tiene al menos dos grupos epóxido. La reacción de reticulación del quitosano con éter diglicidílico de 1,4-butanodiol da como resultado derivados reticulados de quitosano con aminoetanol que son poco solubles a pH fisiológico (7 y más alto).

También es posible usar para la reticulación quitosano predirivatizado mediante la formación de bases de Schiff con quitosano que contiene un grupo aldehído, la formación de puentes disulfuro con el quitosano previamente funcionalizado mediante reactivos con grupo sulfhidrilo terminal y la adición de Michael con el quitosano previamente tratado con acrilatos funcionales en presencia de una base débil.

Todos estos métodos implican la formación de nanopartículas cuando el quitosano está en solución. En algunos casos, todas las reacciones químicas se llevan a cabo hasta su finalización en la fase líquida, en otros, se completan en una fase posterior, por ejemplo, durante o después del secado por pulverización o la liofilización. De forma importante, en todos los casos, el proceso se inicia y sus fases clave tienen lugar con quitosano que se encuentra en estado disuelto (*Jayakumar et al., 2011,* citado anteriormente). La necesidad de que el quitosano se disuelva impone restricciones significativas a la síntesis de las nanopartículas. Esto se debe al hecho de que el quitosano solo es soluble en agua en forma de sales en presencia de ácidos. En esta forma, hay un aumento anómalo en la viscosidad con concentraciones crecientes para cualquier solución por encima del 2 % de quitosano, un número que impone restricciones significativas a la posible implementación de la síntesis, así como de la posibilidad de un alto rendimiento del aparato de reacción. En particular, los efectos de pared al mezclar una solución viscosa pueden crear una heterogeneidad significativa de las concentraciones de reactivos en el recipiente de reacción y, como consecuencia, heterogeneidad en las propiedades de las nanopartículas. Otra complicación es que los grupos amino altamente nucleofílicos se usan con mayor frecuencia para la reticulación, pero en solución deben ionizarse para mantener el quitosano en estado disuelto.

Por lo tanto, existe la necesidad de desarrollar nuevas rutas de síntesis para la formación de nanopartículas de quitosano de manera eficiente y rentable.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere al descubrimiento inesperado de un nuevo método para producir nanopartículas a partir de quitosano que presenta la ventaja de evitar la necesidad de disolver el material de partida de quitosano y por lo tanto recurrir a la formación de sales o al uso de soluciones acuosas ácidas diluidas o la necesidad de dispersar el quitosano en solución y, por lo tanto, recurrir a emulsificación, molienda u otros procedimientos que podrían tener un impacto mecánico en la integridad del polímero. En particular, la invención se refiere a un nuevo método de reticulación del quitosano, en particular cuando, a través de dos etapas químicas se forman nuevos enlaces intraquímicos entre diferentes partes de la molécula de quitosano. De acuerdo con un aspecto particular, la ausencia de disolución del quitosano conduce a una tasa de recambio de síntesis más eficiente (por ejemplo, aproximadamente 2 órdenes de magnitud sobre los métodos de reticulación que usan quitosano disuelto).

El producto resultante forma espontáneamente nanopartículas al final de la segunda etapa del método de preparación, siendo estas nanopartículas adecuadas para una amplia gama de aplicaciones. Más ventajosamente, el producto de quitosano reticulado resultante tiene actividades biológicas similares a las de los quitosanos lineales o ramificados convencionales pero inesperadamente exhibe algunas ventajas particulares en términos de estabilidad en un amplio abanico de condiciones microbianas o de pH biológicamente relevantes y propiedades fisicoquímicas que permiten un manejo más fácil.

Un aspecto de la invención proporciona un método para la preparación de un quitosano reticulado de acuerdo con la invención.

Otro aspecto, la invención se refiere a un nuevo quitosano reticulado, en particular, un nuevo quitosano reticulado que forma espontáneamente nanopartículas.

Otro aspecto de la invención se refiere a una composición que comprende al menos un quitosano reticulado de acuerdo con la invención y al menos un portador.

Otro aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende al menos un quitosano reticulado de acuerdo con la invención y al menos un portador farmacéuticamente aceptable.

Otro aspecto de la invención se refiere a nanopartículas que comprenden un quitosano reticulado de acuerdo con la invención.

Otro aspecto de la invención se refiere a una composición cosmética que comprende al menos un quitosano reticulado

de acuerdo con la invención.

Otro aspecto de la invención se refiere a un relleno de tejidos blandos que comprende al menos un quitosano reticulado de acuerdo con la invención o una composición del mismo de acuerdo con la invención.

Otro aspecto de la invención se refiere a un apósito para heridas que comprende al menos un quitosano reticulado de acuerdo con la invención.

De acuerdo con otra realización particular, se proporciona un tejido de reconstrucción que comprende al menos un quitosano reticulado o una composición del mismo de acuerdo con la invención.

Otro aspecto de la invención se refiere a una composición agrícola que comprende al menos un quitosano reticulado de acuerdo con la invención.

Otro aspecto de la invención se refiere a un método de preparación de una composición (por ejemplo, tal como un relleno de tejido blando, un apósito para heridas o un tejido de reconstrucción) que comprende al menos un quitosano reticulado o nanopartículas del mismo de acuerdo con la invención.

Otro aspecto de la invención se refiere al quitosano reticulado de acuerdo con la invención para su uso en suministro de fármacos *in vivo*, cultivo celular o de tejidos biológicos *in vitro* y aplicaciones de ingeniería de tejidos.

De acuerdo con otra realización particular, se proporciona un medio de cultivo de células o tejidos biológicos que comprende al menos un quitosano reticulado o una composición del mismo de acuerdo con la invención.

Otro aspecto de la invención se refiere a un quitosano reticulado de acuerdo con la invención para su uso en la prevención y/o el tratamiento de un trastorno médico y en particular de afecciones cardiovasculares, tales como arritmias cardíacas, en particular fibrilación auricular e hipertensión, patologías articulares y enfermedades articulares, tales como artritis reumatoide, artrosis, espondiloartritis y eventos traumáticos que provocan daño al cartílago, hueso, daño del ligamento o de la cápsula sinovial, patologías y lesiones oculares, tales como síndrome del ojo seco, uveítis, glaucoma, lesiones corneales, trastornos del tejido conectivo, tales como lupus y polimiositis, trastornos o lesiones de la piel/membrana mucosa, tales como heridas, cicatrices, psoriasis, acné, eccema, rosácea, quemaduras de naturaleza física o química, en particular, heridas quirúrgicas y quemaduras solares, úlceras, hemorroides, enfermedades periodontales y dentales, daño dural tal como el que se produce después de una lesión accidental o una cirugía del cerebro y del sistema nervioso central, neoplasias malignas y benignas, en particular carcinomas, sarcomas, linfomas y melanomas, complicaciones postoperatorias tales como fístulas e infecciones, tumores o malformaciones vasculares.

Otro aspecto de la invención se refiere a un uso de un quitosano reticulado de acuerdo con la invención para la preparación de una formulación farmacéutica para la prevención y/o el tratamiento de un trastorno médico y en particular de afecciones cardiovasculares, tales como arritmias cardíacas, en particular fibrilación auricular e hipertensión, patologías articulares y enfermedades articulares, tales como artritis reumatoide, artrosis, espondiloartritis y eventos traumáticos que provocan daño al cartílago, hueso, daño del ligamento o de la cápsula sinovial, patologías y lesiones oculares, tales como síndrome del ojo seco, uveítis, glaucoma, lesiones corneales, trastornos del tejido conectivo, tales como lupus y polimiositis, trastornos o lesiones de la piel/membrana mucosa, tales como heridas, cicatrices, psoriasis, acné, eccema, rosácea, quemaduras de naturaleza física o química, en particular, heridas quirúrgicas y quemaduras solares, úlceras, hemorroides, enfermedades periodontales y dentales, daño dural tal como el que se produce después de una lesión accidental o una cirugía del cerebro y del sistema nervioso central, neoplasias malignas y benignas, en particular carcinomas, sarcomas, linfomas y melanomas, complicaciones postoperatorias tales como fístulas e infecciones, tumores o malformaciones vasculares.

Otro aspecto de la invención se refiere a un uso de quitosano reticulado de acuerdo con la invención para la preparación de un medio de cultivo celular o biológico o de un tejido de reconstrucción.

Otro aspecto de la invención se refiere a un método para la preparación de un sistema de suministro de fármacos para un agente bioactivo.

De acuerdo con otra realización particular, se proporciona un método para identificar un quitosano reticulado obtenible a partir de un método de acuerdo con la invención.

Descripción de las figuras

La **Figura 1** muestra la caracterización de nanopartículas de quitosano reticuladas de la invención (Ejemplo 2i). A: por micrografía del quitosano teñido (quitosano reticulado al 3,2 % de 501 kDa) como se describe en el Ejemplo 3; **B:** Microscopía de fuerza atómica de películas secas de quitosano lineal comparativo (B1) y nanopartículas de quitosano reticuladas correspondientes de la invención (B2), nanopartículas de quitosano reticuladas de la invención a alto aumento (B3) y bajo aumento (B4).

La **Figura 2** muestra la internalización de nanopartículas de quitosano reticuladas de la invención (Ejemplo 2i) en leucocitos murinos medida mediante microscopía de fluorescencia como se describe en el Ejemplo 4. **A:** Límite leucocitario; **B:** ADN nuclear (Hoechst 33258, fluorescencia azul intensa); **C:** Quitosano reticulado marcado con FITC endocitado (fluorescencia verde); **D:** Fluorescencia mixta azul/verde (azul: ADN de fondo no específico y/o no nuclear en el citoplasma; verde: quitosano reticulado marcado con FITC endocitado).

La **Figura 3** muestra la internalización de nanopartículas de quitosano reticuladas de la invención (Ejemplo 2i) **(B)** en córnea murina en comparación con quitosano convencional **(A)** que permanece en la superficie de la córnea mediante fluorescencia FITC-FAM como se describe en el Ejemplo 4. A: Córnea; B: Quitosano (fluorescencia verde brillante).

La **Figura 4** representa el análisis de espectrometría de masas de un quitosano convencional comparativo no reticulado (A1: corriente iónica total para iones positivos) y (A2: región de iones de interés (menor relación m/z)); de un quitosano reticulado de la invención (B1: corriente iónica total para iones positivos y B2 (región de iones de interés (relación m/z más baja)) como se describe en el Ejemplo 3.

La **Figura 5** representa los espectros resultantes de estudios de colisión del compuesto m/z = 180 a una energía de impacto de 5 V (A) y 15 V (B) y para el compuesto m/z = 252 a una energía de impacto de 5 V (C) y 15 V (D) y resultantes de la hidrólisis de lisozima de huevo (E) como se describe en el Ejemplo 3.

La **Figura 6** representa los efectos de un tratamiento con un quitosano reticulado de la invención (al 0,1 % p/p o al 0,05 % p/p en agua) sobre el proceso de germinación de semillas de trigo de primavera en una cámara de germinación **(A)** (La emergencia de la radícula se midió después de 1 día, la energía de germinación se midió después de 3 días; y capacidad de germinación después de 7 días) y sobre el aumento del crecimiento (% de aumento sobre el control) de las partes aéreas de plántulas de trigo de primavera en sustrato de suelo **(B)** (las semillas se trataron 7 días antes de la siembra) como se describe en el Ejemplo 6 en comparación con el control.

Descripción detallada

La expresión "grado de reticulación" como se usa en el presente documento significa la cantidad de grupos funcionales convertidos en enlaces de reticulación o de injerto en relación con la cantidad total de grupos funcionales inicialmente presentes en el quitosano, expresados como un porcentaje.

El término "alquilo" cuando se usa solo o en combinación con otros términos, comprende una cadena lineal o ramificada de alquilo C_1-C_{50} que se refiere a grupos alquilo monovalentes que tienen de 1 a 50 átomos de carbono. Esta expresión se ejemplifica mediante grupos tales como metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, n-butilo, s-butilo, i-butilo, t-butilo, n-pentilo, 1-etilpropilo, 2-metilbutilo, 3-metilbutilo, 2,2-dimetilpropilo, n-hexilo, 2-metilpentilo, 3-metilpentilo, 4-metilpentilo, n-heptilo, 2-metilhexilo, 3-metilhexilo, 4-metilhexilo, 5-metilhexilo, n-heptilo, n-octilo, n-nonilo, n-decilo, tetrahidrogeranilo, n-dodecilo, n-tridecilo, n-tetradecilo, n-pentadecilo, n-hexadecilo, n-octadecilo, n-nonadecilo y n-eicosanilo y similares. Preferentemente, estos incluyen alquilo C_1-C_9, más preferentemente alquilo C_1-C_6, en especial preferentemente alquilo C_1-C_4, que, por analogía, se refieren respectivamente a grupos alquilo monovalentes que tienen de 1 a 9 átomos de carbono, grupos alquilo monovalentes que tienen de 1 a 6 átomos de carbono y grupos alquilo monovalentes que tienen de 1 a 4 átomos de carbono. Particularmente, esos incluyen alquilo C_1-C_6.

El término "alquenilo" cuando se usa solo o en combinación con otros términos, comprende una cadena lineal o ramificada de alquenilo C_2-C_{50}. Puede tener cualquier número disponible de dobles enlaces en cualquier posición disponible, y la configuración del doble enlace puede ser la configuración (E) o (Z). Esta expresión se ejemplifica mediante grupos tales como vinilo, alilo, isopropenilo, 1-propenilo, 2-metil-1-propenilo, 1-butenilo, 2-butenilo, 3-butenilo, 2-etil-1-butenilo, 3-metil-2-butenilo, 1-pentenilo, 2-pentenilo, 3-pentenilo, 4-pentenilo, 4-metil-3-pentenilo, 1-hexenilo, 2-hexenilo, 3-hexenilo, 4-hexenilo, 5-hexenilo, 1-heptenilo, 1-octenilo, geranilo, 1-decenilo, 1-tetradecenilo, 1-octadecenilo, 9-octadecenilo, 1-eicosenilo y 3,7,11,15-tetrametil-1-hexadecenilo y similares. Preferentemente, estos incluyen alquenilo C_2-C_8, más preferentemente alquenilo C_2-C_6. Entre otros, son especialmente preferidos vinilo o etenilo (-CH=CH_2), n-2-propenilo (alilo, -CH_2CH=CH_2), isopropenilo, 1-propenilo, 2-metil-1-propenilo, 1-butenilo, 2-butenilo y 3-metil-2-butenilo y similares.

El término "alquinilo" cuando se usa solo o en combinación con otros términos, comprende una cadena lineal o ramificada de alquinilo C_2-C_{50}. Puede tener cualquier número disponible de enlaces triples en cualquier posición disponible. Este término se ejemplifica con grupos como los grupos alquinilo que pueden tener un número de carbonos de 2-50 y, opcionalmente, un doble enlace, tales como etinilo (-C≡CH), 1-propinilo, 2-propinilo (propargilo: -CH_2C≡CH), 2-butinilo, 2-penteno-4-inilo y similares. Particularmente, estos incluyen alquinilo C_2-C_8, más preferentemente alquinilo C_2-C_6 y similares. Preferentemente aquellos incluyen alquinilo C_2-C_6 que se refiere a grupos que tienen de 2 a 6 átomos de carbono y que tienen al menos 1 o 2 sitios de insaturación de alquinilo.

El término "arilo" se refiere a un grupo carbocíclico aromático insaturado de 6 a 14 átomos de carbono que tiene un solo anillo (por ejemplo, fenilo) o múltiples anillos condensados (por ejemplo, indenilo, naftilo). Arilo incluye fenilo, naftilo, antrilo, fenantrenilo y similares.

La expresión "alquil arilo C_1-C_6" se refiere a grupos arilo que tienen un sustituyente alquilo C_1-C_6, incluyendo metil fenilo, etil fenilo y similares.

La expresión "aril alquilo C_1-C_6" se refiere a grupos alquilo C_1-C_6 que tienen un sustituyente arilo, incluyendo 3-fenilpropanilo, bencilo y similares.

El término "heteroarilo" se refiere a un grupo heteroaromático monocíclico o un grupo heteroaromático de anillo condensado bicíclico o tricíclico. Los ejemplos particulares de grupos heteroaromáticos incluyen piridilo opcionalmente sustituido, pirrolilo, pirimidinilo, furilo, tienilo, imidazolilo, oxazolilo, isoxazolilo, tiazolilo, isotiazolilo, pirazolilo, 1,2,3-triazolilo, 1,2,4-triazolilo, 1,2,3-oxadiazolilo, 1,2,4-oxadiazolilo, 1,2,5-oxadiazolilo, 1,3,4-oxadiazolilo, 1,3,4-triazinilo, 1,2,3-triazinilo, benzofurilo, [2,3-dihidro]-benzofurilo, isobenzofurilo, benzotienilo, benzotriazolilo, isobenzotienilo, indolilo, isoindolilo, 3H-indolilo, bencimidazolilo, imidazo[1,2-a]piridilo, benzotiazolilo, benzoxazolilo, quinolizinilo, quinazolinilo, ftalazinilo, quinoxalinilo, cinolinilo, naftiridinilo, pirido[3,4-b]piridilo, pirido[3,2-b]piridilo, pirido[4,3-b]piridilo, quinolilo, isoquinolilo, tetrazolilo, 5,6,7,8-tetrahidroquinolilo, 5,6,7,8-tetrahidroisoquinolilo, purinilo, pteridinilo, carbazolilo, xantenilo o benzoquinolilo.

La expresión "cicloalquilo C_3-C_8" se refiere a un grupo carbocíclico saturado de 3 a 8 átomos de carbono que tiene un solo anillo (por ejemplo, ciclohexilo) o múltiples anillos condensados (por ejemplo, norbornilo). Cicloalquilo C_3-C_8 incluye ciclopentilo, ciclohexilo, norbornilo y similares. El término "heterocicloalquilo" se refiere a un grupo cicloalquilo C_3-C_8 de acuerdo con la definición anterior, en el cual hasta 3 átomos de carbono se sustituyen por heteroátomos elegidos del grupo que consiste en O, S, NR, definiéndose R como hidrógeno o metilo. Heterocicloalquilo incluye azetidinilo, pirrolidinilo, piperidinilo, piperazinilo, morfolinilo, tetrahidrofuranilo y similares.

A menos que se restrinja de otro modo por la definición del sustituyente individual, el término "sustituido" se refiere a grupos sustituidos con 1 a 5 sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en "alquilo C_1-C_6", "alquenilo C_2-C_6", "alquinilo C_2-C_6", "cicloalquilo C_3-C_8", "heterocicloalquilo", "alquil arilo C_1-C_6", "alquil heteroarilo C_1-C_6", "aril alquilo C_1-C_6", "heteriaril alquilo C_1-C_6", "alquil cicloalquilo C_1-C_6", "alquil heterocicloalquilo C_1-C_6", "amino", "aminosulfonilo", "amonio", "acil amino", "amino carbonilo", "arilo", "heteroarilo", "sulfinilo", "sulfonilo", "alcoxi", "alcoxicarbonilo", "carbamato", "sulfanilo", "halógeno", trihalometilo, ciano, hidroxi, mercapto, nitro y similares.

La expresión "farmacéuticamente aceptable" se refiere a un portador compuesto por un material que no es biológicamente ni de otro modo indeseable y no es especialmente tóxico.

El término "portador" se refiere a cualquier componente presente en una formulación farmacéutica distinto del principio activo y, por lo tanto, incluye diluyentes, aglutinantes, lubricantes, disgregantes, materiales de relleno, agentes colorantes, agentes humectantes o emulsionantes, agentes tamponantes del pH, conservantes y similares.

La expresión "agente bioactivo" se usa para describir cualquier agente con actividad biológica que se incorporará a una composición de polímero de injerto de la invención. Puede ser natural, sintético, semisintético o un derivado del mismo y puede incluir compuestos hidrófobos, hidrófilos, solubles e insolubles. Más específicamente, puede ser cualquier agente bioactivo útil para el tratamiento y/o la prevención y/o el diagnóstico de afecciones en cualquier área terapéutica conocida en mamíferos, tales como animales y seres humanos, en particular, seres humanos, que incluyen, pero no se limitan a arritmias cardíacas tales como fibrilación auricular, hipertensión, afecciones, trastornos o enfermedades inflamatorias, en particular enfermedades inflamatorias autoinmunitarias y no autoinmunitarias, incluyendo patologías de las articulaciones y enfermedades articulares (tales como artritis reumatoide, osteoartritis y espondiloartritis), patologías oculares (tales como síndrome del ojo seco, uveítis, glaucoma, lesiones corneales), trastornos del tejido conectivo (tales como lupus o polimiositis), trastornos o lesiones de la piel (tales como heridas, cicatrices, psoriasis, acné, eccema, rosácea, quemaduras de naturaleza física o química, quemaduras solares), enfermedades periodontales y dentales, hemorroides, úlceras, enfermedades susceptibles de terapia génica, enfermedades susceptibles de terapia celular, duraplastia y reparación dural después de cirugía del cerebro y del sistema nervioso central, neuroplastia, dolor, fístula e infección postoperatoria, enfermedades traumatológicas, neoplasias benignas y malignas e infecciones. Los agentes bioactivos pueden seleccionarse de un compuesto macromolecular o un compuesto de molécula pequeña, tales como péptidos, proteínas, oligo- y polinucleótidos, antiinfecciosos, antibióticos, antimicrobianos, fármacos antivíricos, antibacterianos, fármacos antifúngicos, factores de crecimiento, enzimas, antígenos, fármacos antitumorales, fármacos antiinflamatorios, anestésicos, fármacos antineoplásicos, analgésicos, anticoagulantes, fármacos hemostáticos, células y anticuerpos.

La expresión "trastorno o enfermedad inflamatoria" se refiere a todas las enfermedades que incluyen inflamación y liberación de citocinas proinflamatorias como mecanismo principal o significativo de la enfermedad, tales como enfermedad inflamatoria intestinal, alergia, asma, enfermedades autoinmunitarias, hepatitis, otras inflamaciones de órganos y enfermedades relacionadas. La expresión "trastornos de la piel" o "enfermedades de la piel" incluye daños en la piel donde la superficie de la piel presenta una depresión dolorosa sin necesariamente un corte en su superficie tal como daños en los tejidos relacionados con la edad (por ejemplo, arrugas), heridas y cicatrices tales como, por ejemplo, cicatrices de acné o rubeola. Estos trastornos incluyen además heridas, cicatrices, psoriasis, acné, eccema y rosácea. El término "heridas", incluye cualquier tejido dañado, por ejemplo, después de un traumatismo o una cirugía. Las heridas en los mamíferos incluyen, por ejemplo, abrasiones, laceraciones, contusiones, conmociones cerebrales, heridas por arma blanca, cortes en la piel, heridas quirúrgicas, heridas de bala, heridas térmicas, heridas químicas, quemadura solar, mordeduras y picaduras y heridas eléctricas. Incluye además trastornos crónicos de la piel tales como úlceras y otras afecciones inflamatorias de la piel.

La expresión "patologías o trastornos oculares" son trastornos o lesiones que afectan al ojo y en particular a la córnea. Estos trastornos incluyen abrasión corneal, rasguños en la córnea, quemaduras corneales por álcali, degeneración macular asociada a la edad, ojos saltones, cataratas, retinitis por citomegalovirus, daltonismo, estrabismo, edema macular diabético, moscas volantes y destellos oculares, glaucoma, queratocono, ojo vago, visión baja, hipertensión ocular, desprendimiento de retina, espasmo del párpado, uveítis, queratoconjuntivitis seca (KCS) y síndrome del ojo seco.

La expresión "patologías articulares o de las articulaciones" incluye osteoartritis, dolor artrítico, artritis reumatoide, dolor por infección e inflamación, eventos traumáticos de rodilla que provocan daño al cartílago, eventos traumáticos de la articulación de la cadera, hueso, daño del ligamento o de la cápsula sinovial.

La expresión "tejido de reconstrucción" se refiere a un tejido biológico (endógeno o exógeno) o a un material sintético o semisintético útil para reparar tejidos dañados del cuerpo tales como tejidos epidérmicos, neurológicos, de cartílago o de hueso, así como para la construcción de organoides para pruebas biológicas como se describe en Takebe *et al.*, 2019, Science, 364, 6444, 956-959, DOI: 10.1126/science.aaw756.

Como se usa en el presente documento, "tratamiento" y "tratar" y similares generalmente significan obtener un efecto farmacológico y/o físico y/o fisiológico deseado. El efecto puede ser profiláctico en términos de prevención o prevención parcial de una enfermedad, un síntoma o una afección del mismo y/o puede ser terapéutico en términos de una cura parcial o completa de una enfermedad, una afección, un síntoma o un efecto adverso atribuido a la enfermedad. El término "tratamiento" como se usa en el presente documento cubre cualquier tratamiento de una enfermedad en un mamífero, particularmente un ser humano, e incluye: (a) prevenir que se produzca la enfermedad en un sujeto que pueda tener predisposición a la enfermedad, pero al que aún no se le haya diagnosticado; (b) inhibir la enfermedad, es decir, detener su desarrollo; o aliviar la enfermedad, es decir, provocar la regresión de la enfermedad y/o de sus síntomas o afecciones tales como mejoría o remediación del daño.

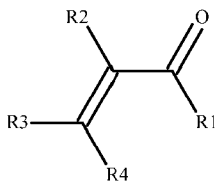
El término "sujeto" como se usa en el presente documento se refiere a mamíferos. Como ejemplos, los mamíferos contemplados por la presente invención incluyen seres humanos, primates y animales domésticos tales como ganado, ovejas, cerdos, caballos y particularmente caballos de carrera, roedores de laboratorio y similares.

El término "eficacia" de un tratamiento de acuerdo con la invención puede medirse basándose en cambios en el transcurso de la enfermedad en respuesta a un uso de acuerdo con la invención. Por ejemplo, la eficacia de un tratamiento de acuerdo con la invención puede medirse por la desaparición o reducción de signos o síntomas clínicos o mediciones más favorables de biomarcadores de la enfermedad, tales como citocinas, factores de crecimiento u otras moléculas de señalización y sus receptores, marcadores de superficie celular, recuentos celulares y perfiles de expresión genética.

Procedimiento de preparación de un quitosano de acuerdo con la invención y caracterización del mismo

De acuerdo con un aspecto particular, se proporciona un método para la preparación de un quitosano reticulado que comprende las siguientes etapas:

a) proporcionar un quitosano y dejar que dicho quitosano se hinche en un disolvente;
b) acilar los grupos amino de dicho quitosano con un compuesto acrílico de Fórmula (I):



(I)

en donde R_1 es un halógeno o cualquier otro grupo saliente que tras su eliminación, asegura la acilación de un grupo amino tal como éster de 3-hidroxibenzotriazol, anhídrido (incluyendo anhídridos mixtos), N-hidroxisuccinimida, pentaclorofenol, ésteres de 2-nitro-4-sulfofenol y otros grupos salientes similares; R_2, R_3 y R_4 se seleccionan independientemente de H; alquilo opcionalmente sustituido (por ejemplo, alquilo C_1-C_6), alquenilo opcionalmente sustituido (por ejemplo, alquenilo C_2-C_6), alquinilo opcionalmente sustituido (por ejemplo, alquinilo C_3-C_6), cicloalquilo opcionalmente sustituido (por ejemplo, cicloalquilo C_3-C_8), cicloalquenilo opcionalmente sustituido (por ejemplo, cicloalquenilo C_4-C_8), cicloalquinilo opcionalmente sustituido (por ejemplo, cicloalquinilo C_5-C_8), heterocicloalquilo opcionalmente sustituido; arilo opcionalmente sustituido (por ejemplo, fenilo opcionalmente sustituido), heteroarilo opcionalmente sustituido y aril alquilo C_1-C_6 opcionalmente sustituido, en

particular bencilo; en donde el término "sustituido" se refiere a grupos sustituidos con 1 a 5 sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en halógeno, -COOR', -NR'R'', =O, -OR', -COR', -CONR'R'', -SR', -SO_3R', -SO_2NR'R'', -SOR', -SO_2R', -NO_2 o -CN; o R_1 y R_2 o R_1 y R_3, o R_1 y R_4 juntos forman un arilo, heteroarilo, cicloalquilo o heterocicloalquilo de 4-24 miembros opcionalmente sustituidos (por ejemplo, un arilo, heteroarilo, cicloalquilo o heterocicloalquilo de 6-24 miembros tales como un arilo, heteroarilo, cicloalquilo o heterocicloalquilo de 8-24 miembros opcionalmente sustituidos);
c) hacer reaccionar el producto de acilación de la **etapa b)** en presencia de una base (reacción de Aza-Michael);
d) purificar el quitosano reticulado obtenido **de la etapa c)** (por ejemplo, de impurezas salinas y/o disolventes apróticos).

De acuerdo con una realización particular, el disolvente usado en la **etapa a)** y/o **b)** es un disolvente prótico (tales como alcoholes o agua).

De acuerdo con una realización particular, los ácidos acrílicos libres que se forman si un disolvente prótico (tales como alcoholes o agua) se usa en la **etapa a)** y/o **b)** para llevar a cabo el proceso se lavan de la mezcla de reacción antes de llevar a cabo la **etapa c).**

De acuerdo con otra realización particular, el disolvente es un disolvente aprótico, en particular en la **etapa a)** y/o **b)** y/o **c).**

De acuerdo con una realización particular, si un disolvente aprótico se usa en la **etapa c)** si no se lleva a cabo una **etapa f)** adicional de acilación posterior.

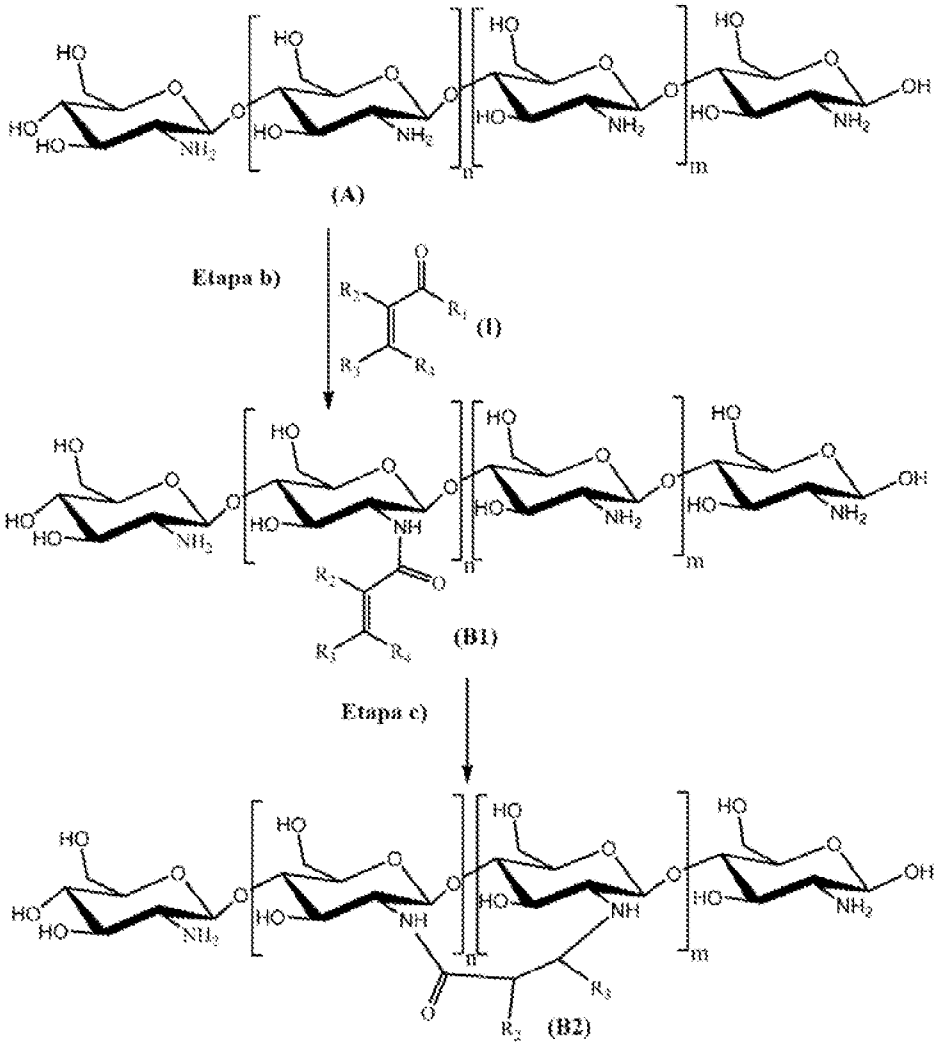
De acuerdo con una realización particular, **la etapa a)** se realiza a temperatura ambiente.

De acuerdo con una realización particular, los grupos R3 o R4 pero también R2 del producto acilado de la **etapa b)** reaccionarán con los grupos amino primarios de la cadena principal de glucosamina para formar una reticulación entre glucosaminas. Los grupos que reaccionan dependerán del compuesto acrílico específico. Por ejemplo, para ácidos acrílicos y metacrílicos, los grupos que reaccionan con los grupos amino primarios de la cadena principal de glucosamina son los grupos R3 o R4. Sin embargo, cuando los grupos R3 y R4 son reemplazados por átomos de halógeno, a continuación los grupos R2 reaccionarán con los grupos amino primarios de la cadena principal de glucosamina.

De acuerdo con una realización particular adicional, esta reticulación conduce a la formación de nanopartículas.

De acuerdo con un aspecto particular, el método de la invención puede esquematizarse en el Esquema 1 como sigue:

Esquema 1



en donde un quitosano **(A)** en donde m es un número entero comprendido entre 1 y 12.500 y n es un número entero comprendido entre 1 y 12.500, se proporciona primero en un estado hinchado en un disolvente aprótico a temperatura ambiente y a continuación los grupos amino de dicho quitosano se acilan con un compuesto acrílico **(I)** y el producto de acilación resultante **(B1)** se hace reaccionar a continuación en presencia de una base para dar lugar a un quitosano reticulado **(B2)** que puede aislarse a continuación mediante purificación para dar lugar a un quitosano reticulado purificado de acuerdo con la invención.

De acuerdo con una realización particular, el quitosano puede suministrarse en estado hinchado, incluso en estado disuelto, en un disolvente prótico pero en este caso, pueden producirse reacciones secundarias de hidrólisis del agente acilante y esto debe tenerse en cuenta al calcular las cargas de reacción. Adicionalmente, en este caso, será necesario lavar el quitosano acilado obtenido en la **etapa b)** para eliminar los productos de hidrólisis del agente acilante antes de la fase de una reacción de aza-Michael en la **etapa c)**.

De acuerdo con una realización particular, el quitosano se proporciona en ausencia de agua y la etapa de acilación se lleva a cabo en ausencia de agua. La ausencia de agua conduce ventajosamente a mayores rendimientos y evita la formación de productos secundarios.

De acuerdo con un aspecto particularmente ventajoso, la etapa de acilación se realiza en ausencia de agua. En este caso, puede usarse un disolvente aprótico como medio de reacción o un fluido supercrítico. De acuerdo con una realización particular, el disolvente aprótico es un disolvente aprótico polar tal como, por ejemplo, seleccionado de DMF y DMSO. En una realización particular, un fluido supercrítico puede ser un disolvente supercrítico tal como dióxido de carbono, óxido nítrico (I), freones (cloro(bromo)(fluoro)hidrocarburos) que se usan para proporcionar el agente acilante al medio de reacción y a continuación se lleva a cabo la reacción de acilación después de la eliminación del disolvente supercrítico del medio de reacción, por ejemplo, reduciendo la presión por debajo del valor crítico.

De acuerdo un aspecto adicional particularmente ventajoso, la etapa de acilación se realiza en un medio aprótico anhidro.

De acuerdo con un aspecto particular, se selecciona un disolvente aprótico polar de dimetilformamida (DMF), dimetilacetamida, acetonitrilo (MeCN), N-metilpirrolidona, dimetil sulfóxido (DMSO) o una combinación de los mismos.

De acuerdo con otro aspecto particular, diclorometano, dicloroetano, cloroformo y otros cloro(fluoro)hidrocarburos también pueden usarse como un disolvente aprótico polar, pero al realizar la reacción aza-Michael **etapa c),** estos disolventes deben eliminarse por destilación justo antes de proporcionar la base. Es deseable realizar dicha destilación a temperaturas que no superen los 60 °C, lo cual es factible a presión atmosférica para la mayoría de los disolventes mencionados. Si se usó un disolvente de alto punto de ebullición, la destilación debe realizarse a presión reducida.

De acuerdo con otro aspecto particular, éteres y ésteres, cetonas también pueden usarse como disolventes para las etapas de reacción a) a c) en condiciones anhidras, pero las reacciones en dichos disolventes avanzarán más lentamente. Por ejemplo, pueden usarse éter dietílico, éter diisopropílico, éter metil *terc*-butílico, acetato de metilo, acetato de etilo, acetato de propilo, acetato de butilo, acetona, metiletilcetona y dietilcetona.

De acuerdo con un aspecto particular de la invención, la acilación **etapa b)** puede llevarse a cabo mediante cualquier método descrito en el contexto de la acilación de glucosamina con cloruro de acriloílo *(*Zhang *et al.*, 2017, Biomacromolecules, 1, 3, 778 - 786*;* Bu *et al.*, 2017, Advances, 7, 76, 48166 - 48175*)* o métodos descritos como útiles para la acilación de un grupo amino tales como métodos que usan i) una carbodiimida; ii) una azida; iii) anhídridos mixtos; iv) un éster activado y v) otros métodos descritos a continuación.

Los métodos de acilación conocidos que usan carbodiimida con la formación de ésteres enólicos intermedios pueden usarse en la etapa b) (documento WO 2019/60740; Hao-Bin *et al.*, 2018, Carbohydrate Polymers, 196, 359 - 367*).* Si puede usarse N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC) como agente condensante, se preferirían clorhidrato de 1-etil-(3-(3-dimetilamino)propil)-carbodiimida y p-toluenosulfonato de metilo de N-ciclohexil-N'-(2-morfolinoetil)carbodiimida (Número de registro CAS: 2491-17-0).

Los métodos de acilación conocidos que usan azidas pueden usarse en la etapa b) (Honzl *et al.*, 1961, Coll. Czech. Chem. Commun., 26, N. 9, 2333-2344).

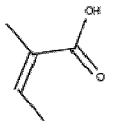
Pueden usarse métodos de acilación conocidos que usan anhídridos mixtos en la etapa b) (Wieland *et al.*, 1951, Ann. Chem., 572, N3, 190-194*;* Belleau *et al.*, 1968, J. Amer. Chem. Soc., 90, N 6, 1651-1652*;* Gorecka *et al.*, 1978, Synthesis, N 6, 474-476*;* Diago-Meseguer *et al.*, 1980, Synthesis, N 7, 547-551*;* Leplawy et al., 1960, Tetrahedron, 11, N 1, 39-51*).* También es posible el uso de anhídridos internos para la acilación, por ejemplo, anhídrido maleico *(*Liwschitz *et al.* 1957, Journal of the Chemical Society, 4399*;* Kang, *et al.*, 2014, Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, 2, 10, 2364-2367*;* documento *US 2016/200730;* Sanchez *et al.*, 2010, Anna European Journal of Organic Chemistry, 13, 2600 - 2606*).*

Pueden usarse métodos de acilación conocidos que usan ésteres activados a través de la formación de amidas activadas en la etapa b) tales como el método de carbonildiimidazol (Paul *et al.*, 1960, J. Amer. Chem. Soc., 82, N 17., 4596-4600*),* un método de éster cianometílico (Schwyzer *et al.*, 1955, Helv. Chim. Acta, 38, N 1, 80-83*),* un método de éster de tiofenilo (*Wieland et al., 1951, supra),* un método de éster fenilo sustituido (Gross *et al.*, 1983, Mayenhofer, editores. Moscú: Mir., P. 421*),* un método de éster con compuestos heteroaromáticos junto con el método de carbodiimida (Jakubke *et al.*, 1966, A. Chem. Ber., 99, N8, 2419-2429*;* Taschner *et al.*, 1965, Ann. Chem., 690, 177-181*),* un método de ésteres con derivados de hidroxilamina junto con el método de carbodiimida (Losse *et al.*, 1964, Ann. Chem., 678, 185-190*;* Nefkens *et al.*, 1961, Amer. Chem. Soc., 83, N 5, 1263*;* Anderson *et al.*, 1963, Ibid, 85, N 19, 3039*;* König *et al.*, 1970, Chem. Ber., 103, N 3, 788-798*),* métodos de interesterificación (variante del método del éster) (Sakakibara, 1965, Bull. Chem. Soc. Jap., 38, N 1, 1979-1984*;* Fujino *et al.*, 1968, Ch. Chem. Pharm. Bull., 16, N 5, 929-932*; Gudkov et al., 1978, 48, 9, 2146;* Devadas *et al.*, 1979, Ind. J. Chem., B16, N 11, 1026-1027*).*

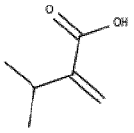
Otros métodos de acilación conocidos pueden usarse en la etapa b) tales como el método de ketenimina (Stevens *et al.*, 1958, J. Amer. Soc., 80, N 15, 4069-4071); Método de derivados de acetileno (Arens, 1955, Rec. Trav. Chim., 74, N 6, 759-770*;* Gais 1978, Aktivierungsmittel für Peptidsynthesen J. Angew. Chem. Int. Ed,90(8), 625-626 https://doi.org/10.1002/ange.19780900808); método que usa derivados de cianamida *(*Losse *et al.*, 1960, Ann. Chem., 636, 144-149*);* Síntesis usando sales de ilsoxazolio *(*Woodwart *et al.*, 1961, J. Amer. Chem. Soc., 83, N 4, 1010-1012*);* Síntesis usando haluros de imidoilo (Bergmann *et al.*, 1936, J. Biol. Chem., 115, N 3, 93-611).

De acuerdo con una realización particular, el compuesto acrílico de Fórmula (I) puede ser un ácido, un haluro ácido, un éster activo (por ejemplo, éster de 3-hidroxibenzotriazol, N-hidroxisuccinimida, pentaclorofenol, ésteres de 2-nitro-4-sulfofenol y ésteres que tienen otros grupos salientes similares), un anhídrido o mezclas de los mismos.

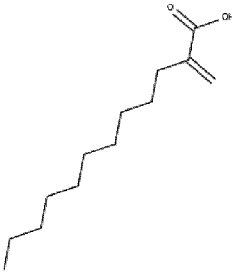
De acuerdo con una realización particular, el compuesto acrílico de Fórmula (I) se selecciona del siguiente grupo:



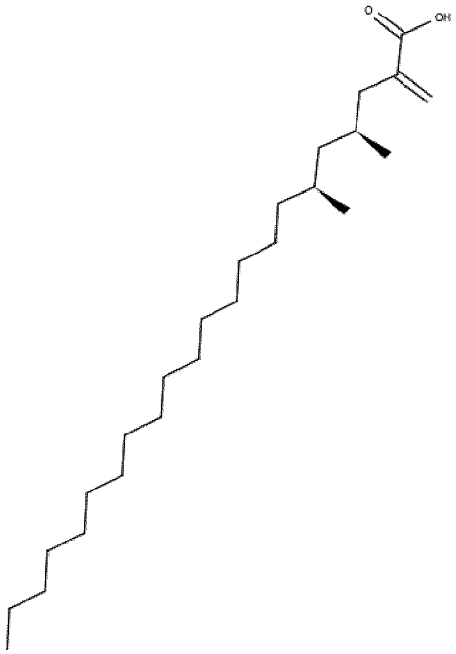
(ácido angélico, Número de registro CAS: 565-63-9);



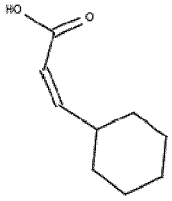
(ácido 2-iso-propil acrílico Número de registro CAS: 4465-04-7);



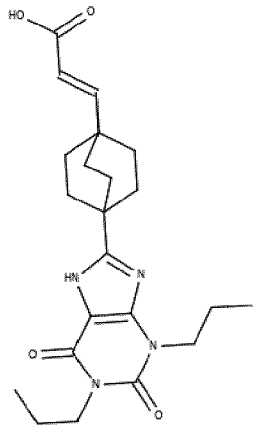
(ácido 2-metilendodecanoico, Número de registro CAS: 52756-21-5);



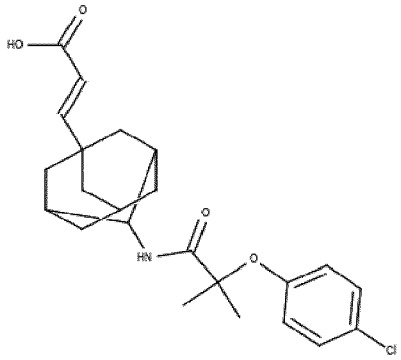
ácido (4S,6S)-4,6-dimetil-2-metilendocosanoico;



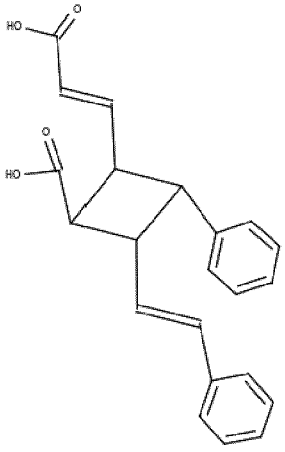
(ácido (Z)-3-ciclohexilpropenoico, Número de registro CAS: 673456-32-1);



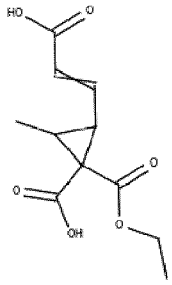
(ácido (E)-3-[4-(2,6-dioxo-1,3-dipropil-2,3,6,7-tetrahidro-1H-purin-8-il)-biciclo[2.2.2]oct-1-il]-acrílico, Número de registro CAS: 340021-16-1);



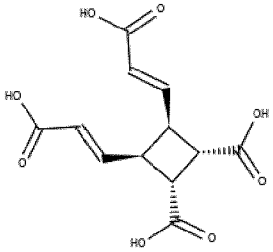
(Ácido (2E)-3-((E)-4-{[2-(4-clorofenoxi)-2-metilpropanoil]amino}-1-adamantil)acrílico;



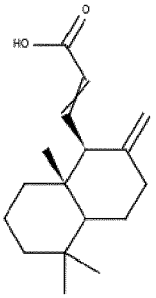
ácido (3-(2-carboxi-4-fenil-3-estiril-ciclobutil)-acrílico, Número de registro CAS: 34271-87-9);



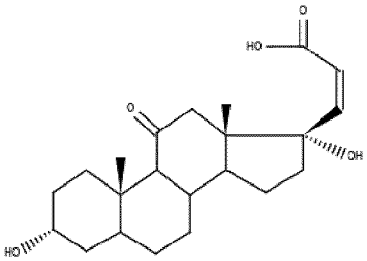
(3-Metil-2-acriloil-(1)-ciclopropan-carbonato-(1)-carbonato-(1)-etiléster, Número de registro CAS: 91971-88-9);



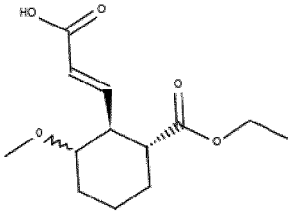
(Ácido 3t,4t-Dicarboxi-ciclobutan-1,2c-di-(trans-acrílico), Número de registro CAS: 55011-62-6);



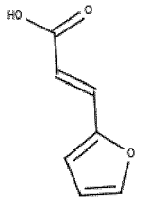
coronadieno;



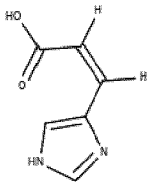
(Número de registro CAS: 1247-53-6)



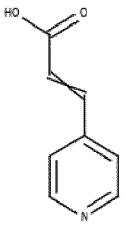
Ácido ((E)-3-(2t-etoxicarbonil-6ξ-metoxi-ciclohexan-1r-il)-acrílico, Número de registro CAS: 2960-11-4); ácido cinámico; ácido 4-metilcinámico; ácido p-nitrocinámico; ácido cafeico;



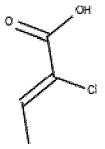
ácido (3-(fur-2-il)crotónico; ácido 3-(2-furil)acrílico, Número de registro CAS: 539-47-9);



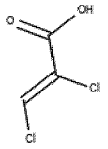
(ácido (Z)-urocánico Número de registro CAS: 7699-35-6);



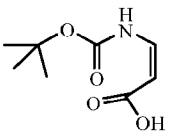
ácido (3-(4-piridinil)-2-propenoico; ácido 3-(piridina-4-il)acrílico, Número de registro CAS: 5337-79-1); argutinósidos A-I;



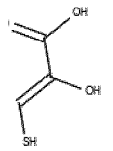
(ácido (Z)-2-cloro-but-2-enoico, Número de registro CAS: 53993-41-2);



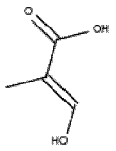
(ácido (2Z)-2,3-dicloroprop-2-enoico, Número de registro CAS: 3533-68-4),



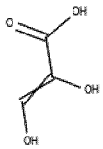
cis N-*terc*-butiloxicarbonil deshidro β-alanina, Número de registro CAS: 151292-68-1);



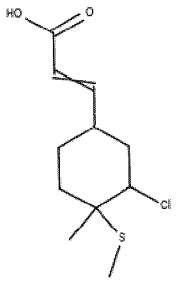
(ácido 2-hidroxi-3-mercapto-acrílico, Número de registro CAS: 6228-60-0;



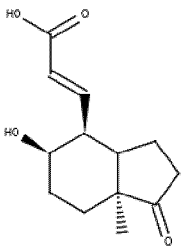
ácido hidroxi(met)acrílico;



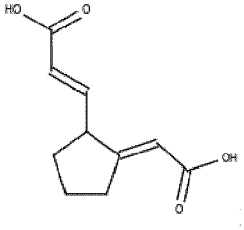
(ácido dihidroxi-acrílico, Número de registro CAS: 2701-94-5);



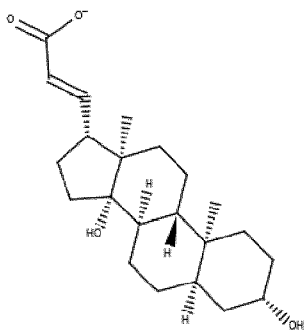
(ID de Reaxys 2721331);



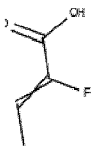
(Número de registro CAS: 64361 -31-5);



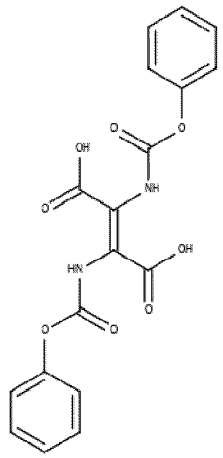
ácido 3-(2-carboximetileno-ciclopentil)-acrílico;



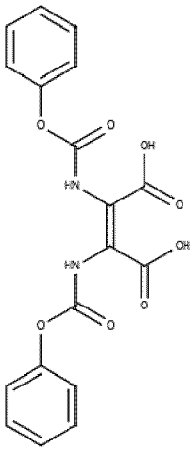
(Número de registro CAS: 78727-62-5);



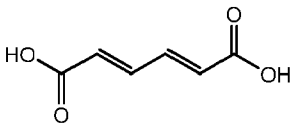
(ácido fluorobutenoico, Número de registro CAS: 2365-87-9);



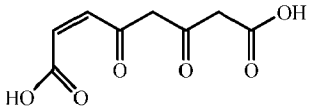
(ácido (E)-2,3-bis(fenoxicarbonilamino)but-2-enedioico);



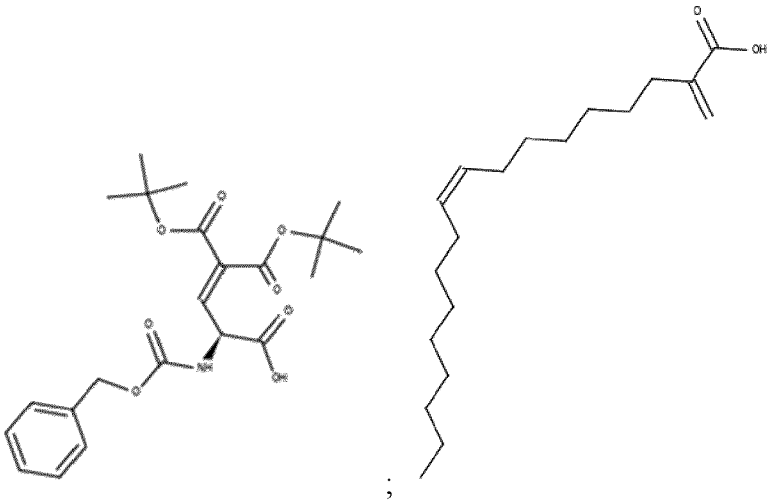
(ácido (Z)-2,3-bis(fenoxicarbonilamino)but-2-enedioico);



ácido (2E,4E)-2,4-hexadienedioico (ácido mucónico), ácido maleico; ácido fumárico;

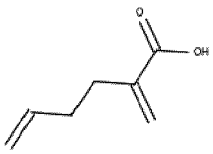


(ácido maleilacetoacético, Número de registro CAS: 5698-52-2); ácido (E)-4-(metilamino)-4-oxobut-2-enoico, derivado acrílico del ácido glutámico

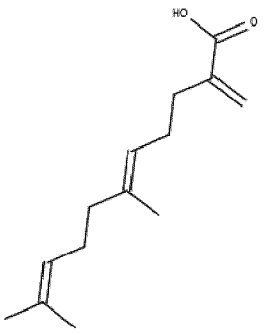


;

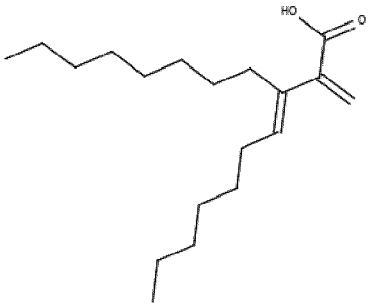
(ácido 2-metilen-9(Z)-octadecenoico, Número de registro CAS: 33780-98-2);



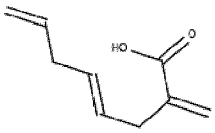
(ácido 2-metilen-5-hexenoico (ácido 2-metilenhex-5-enoico), Número de registro CAS: 73505-05-2);



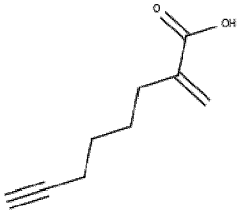
(ácido (E)-6,9-dimetil-2-metilideneundeca-5,9-dienoico, Número de registro CAS: 1580541-76-9);



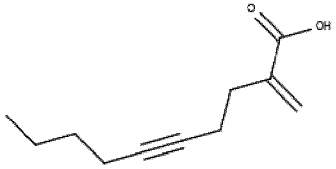
(ácido 2-(cis-7,8-hexadecenil)-acrílico);



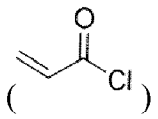
(ácido (E)-2-metilenocta-4,7-dienoico);



(ácido 2-metilen-7-octinoico, Número de registro CAS: 127559-93-7); y

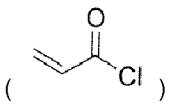


(ácido 2-metilen-5-decinoico, Número de registro CAS: 150254-20-9); y un haluro de acilo (R1= Halógeno), en particular cloruro de acriloílo;



o cloruro de metacriloílo.

De acuerdo con una realización particular adicional, el compuesto acrílico es un haluro de acilo (R_1= Halógeno), en particular cloruro de acriloílo



o cloruro de metacriloílo.

De acuerdo con un aspecto particular, cuando el compuesto acrílico se usa en la **etapa b** de acilación es un haluro ácido, es importante evitar la presencia de agua en el sistema de reacción, ya que se producirá un proceso secundario

indeseable de hidrólisis del haluro de ácido, conduciendo al ácido acrílico y esto puede conducir a la funcionalización de las nanopartículas por grupos carboxilo durante la reacción de adición de Michael del ácido acrílico libre a los grupos amino del quitosano.

De acuerdo con un aspecto particular, el compuesto acrílico usado en la **etapa b)** de acilación es un cloruro ácido (por ejemplo, cloruro de acilo). De acuerdo con un aspecto, el uso de un cloruro ácido da como resultado ventajosamente la formación de cloruro de hidrógeno que no interfiere con el siguiente paso de reacción en presencia de exceso de base y se elimina fácilmente en forma de sales durante la diálisis.

Es importante señalar que la acilación de aminas con haluros de ácido carboxílico conduce a la producción de un ácido equivalente, que formará una sal con la amina sin reaccionar y disminuirá el rendimiento de un método de la invención. Por lo tanto, cuando se usa haluro de ácido en la **etapa b)** de acilación, la adición de una cantidad equivalente de una base, preferentemente una base no nucleófila (por ejemplo, se usa trietilamina en la **etapa b)** para neutralizar este ácido.

De acuerdo con un aspecto particular, cuando el compuesto acrílico se usa en la **etapa b** de acilación es un anhídrido, el método de la invención comprende además una etapa de lavar el medio de reacción y eliminar el ácido formado para evitar la presencia de agua en el sistema de reacción antes de llevar a cabo la **etapa c).** En particular, el ácido formado puede eliminarse del producto de acilación con un disolvente a través de un filtro, o mediante diálisis contra un disolvente o suspendiendo el producto de acilación en un disolvente y centrifugando descartando el sobrenadante.

De acuerdo con otro aspecto particular, cuando se usan agentes condensantes (por ejemplo, DCC) para la acilación con ácido libre, es necesario controlar cuidadosamente la integridad de la reacción y es preferible, no obstante, incluir una etapa de lavado como medida de precaución. Por ejemplo, cuando se usa un agente condensador tal como DCC, a medida que se forman los subproductos, tales como diciclohexilurea, durante la reacción de acilación que necesita eliminarse de la masa de reacción antes de llevar a cabo la siguiente etapa para que no participe en la reticulación formada que conduce a las nanopartículas de la invención.

De acuerdo con otra realización particular, en la **etapa c)** la base se usa en un exceso molar suficiente para formar un medio alcalino que neutraliza el haluro de hidrógeno formado en la **etapa b).** Normalmente, el exceso molar de la base es al menos un exceso molar del 10 % (por ejemplo, exceso molar de aproximadamente el 20 al 40 %) que correspondería a un exceso molar de al menos 1-3 con respecto a los grupos amino del producto de acilación resultante de la **etapa b).**

De acuerdo con otra realización particular, el quitosano reticulado obtenido en la **etapa c)** puede purificarse en la **etapa d)** mediante técnicas convencionales para eliminar impurezas de sales y/o el disolvente aprótico restante tal como por diálisis o etapas de lavado con un disolvente tal como agua o cloruro de metileno, metanol, etanol, acetona y similares, seguido de centrifugación o usando disolventes supercríticos tales como dióxido de carbono en que las nanopartículas formadas del quitosano reticulado son insolubles o eliminando el disolvente aprótico por evaporación y a continuación lavando los subproductos del producto de quitosano reticulado con un disolvente a través de un filtro, por ejemplo, un filtro que tenga poros de no más de 40 µm. De acuerdo con una realización más preferida, los elementos filtrantes hidrófobos de porosidad fina, tales como polipropileno o PTFE pueden usarse ventajosamente, ya que su hidrofobicidad crea obstáculos adicionales para la penetración de nanopartículas de quitosano hidrófilas a través de ellas.

De acuerdo con otra realización particular, el quitosano reticulado purificado obtenido en la **etapa d)** puede secarse, por ejemplo, bajo una **etapa e)** de secado adicional opcional.

De acuerdo con un aspecto particular, la base usada en la **etapa c)** para la adición de Michael es una base no nucleófila esencialmente pura, en particular esencialmente libre de la presencia de aminas secundarias.

De acuerdo con un aspecto particular, la **etapa c)** de adición de Michael se lleva a cabo en un disolvente prótico tal como agua. En este caso, es necesario controlar el grado de saponificación, por ejemplo, midiendo tanto la cantidad de grupos carboxilo formados como los grupos amino formados en la fase de acilación. El método preciso para grupos carboxilo, dado que su concentración es habitualmente de uno a dos órdenes de magnitud menor, y la diferencia en el número de grupos amino puede estar dentro del error experimental sería RMN, espectroscopia IR o valoraciones ácido-base, tal como se describe en Glazunov *et al.*, 1999, 25(3), 216-219; Brugnerotto *et al.*, 2001, Polymer, 42, 3569-3580 o Kubota, *et al.*, 2000, Carbohydrate Research, 324, 268-274. Sin embargo, un disolvente prótico en esta etapa puede ser ventajoso cuando la obtención de partículas de quitosano reticulado saponificado se desean al final de la **etapa c)** o si está planeado repetir la etapa de acilación como se describe a continuación para saturar las nanopartículas con funciones carboxi y a continuación lograr reticulación en exceso. De hecho, cuando las nanopartículas están saturadas con funciones carboxi, se lleva a cabo la etapa de saponificación. A continuación, se repiten las etapas de acilación y aza-Michael, seguido de saponificación. Si se produce una saponificación espontánea durante la etapa aza-Michael en un disolvente prótico esto no es desventajoso ya que la saponificación se lleva a cabo de todos modos en lo sucesivo y el hecho de que se produzca parcialmente durante la reacción aza-Michael no sería un problema.

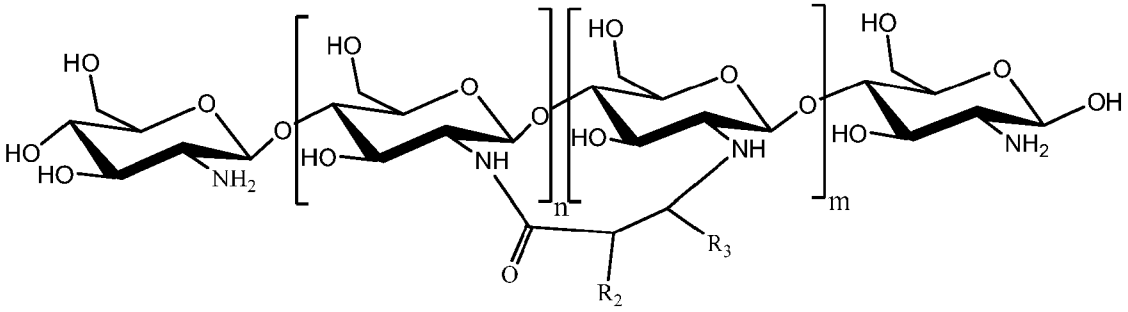
De acuerdo con otro aspecto particular, la **etapa c)** de adición de Michael se lleva a cabo en ausencia de agua, lo que puede lograrse mediante el uso de un disolvente aprótico como medio de reacción o usando una base como un disolvente.

De acuerdo con otra realización particular, la etapa de reacción de adición de Michael se lleva a cabo en medio alcalino de tal manera que para cada enlace amida formado durante la etapa de acilación, se forma un equivalente de amina secundaria después de la reacción de adición de Michael, lo que lleva a que incluso en el caso de una reticulación de todos los grupos amino, al menos la mitad de los grupos amino permanecen disponibles para la formación de sal. Esto puede comprobarse mediante valoración ácido-base, espectrometría IR y RMN tal como se describe en Glazunov *et al.*, 1999, 25(3), 216-219*;* Brugnerotto *et al.*, 2001, Polymer, 42, 3569-3580 o Kubota, *et al.*, 2000, Carbohydrate Research, 324, 268-274. De acuerdo con un aspecto particular, la reacción de adición intramolecular dentro de la macromolécula de quitosano es significativamente preferible a las reacciones intermoleculares, debido a factores estadísticos y estéricos, conduciendo por lo tanto a un alto rendimiento en la reticulación.

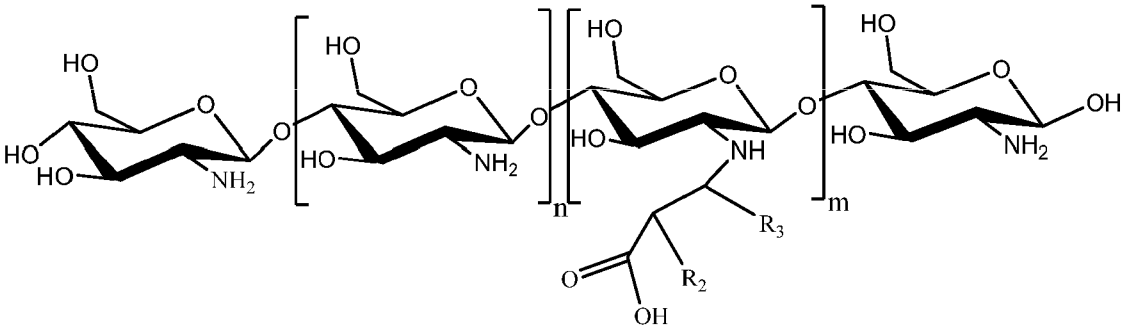
Las nanopartículas resultantes después de la **etapa c)** de reacción de adición de Michael puede someterse a una reducción (por ejemplo, reaccionando con hidruros metálicos complejos, diborano, cianoborohidruro y otros derivados del borohidruro) con el fin de transformar los grupos amida en aminas secundarias y aumentar el posible grado de ionización de las nanopartículas. El posible grado de ionización de las nanopartículas depende del número de grupos amino. Cuantos más grupos amino estén presentes, mayor será la oportunidad de formación de sales y, respectivamente, que se produzca ionización. El grado de ionización puede evaluarse mediante valoración ácido-base, espectrometría IR y RMN.

De acuerdo con un aspecto adicional, el producto de quitosano reticulado obtenido en la **etapa c)** o la **etapa d)** o el producto seco correspondiente obtenido en la etapa e) puede someterse a una **etapa f)** de saponificación en condiciones alcalinas (por ejemplo, en presencia de una base acuosa en exceso) en un disolvente prótico para aumentar la solubilidad de las nanopartículas de quitosano reticuladas en un intervalo de pH más amplio, por ejemplo, en condiciones fisiológicas débilmente alcalinas (por ejemplo, un pH de 7,2-7,3). Si el disolvente usado en las **etapas c) o d)** no permite la saponificación (por ejemplo, como DMF), la saponificación necesita llevarse a cabo después de la **etapa d)** de purificación en un disolvente que permita la saponificación o por resuspensión del quitosano reticulado seco en un disolvente que permita la saponificación después de la **etapa e)** tal como en éteres como disolventes. Por ejemplo, en esta **etapa f)** adicional se añade una base acuosa al producto obtenido en las **etapas c) o d)** en un exceso molar en comparación con la cantidad del agente acilante usado en la **etapa b),** tal como, por ejemplo, aproximadamente 10 veces o 100 veces la cantidad molar de dichos agentes acilantes. Como se esquematiza en el **Esquema 2** a continuación, los grupos amida del quitosano reticulado **(B2)** se hidrolizan en grupos carboxilo correspondientes en un producto **(B3)** disponible para la formación de las sales correspondientes.

Esquema 2



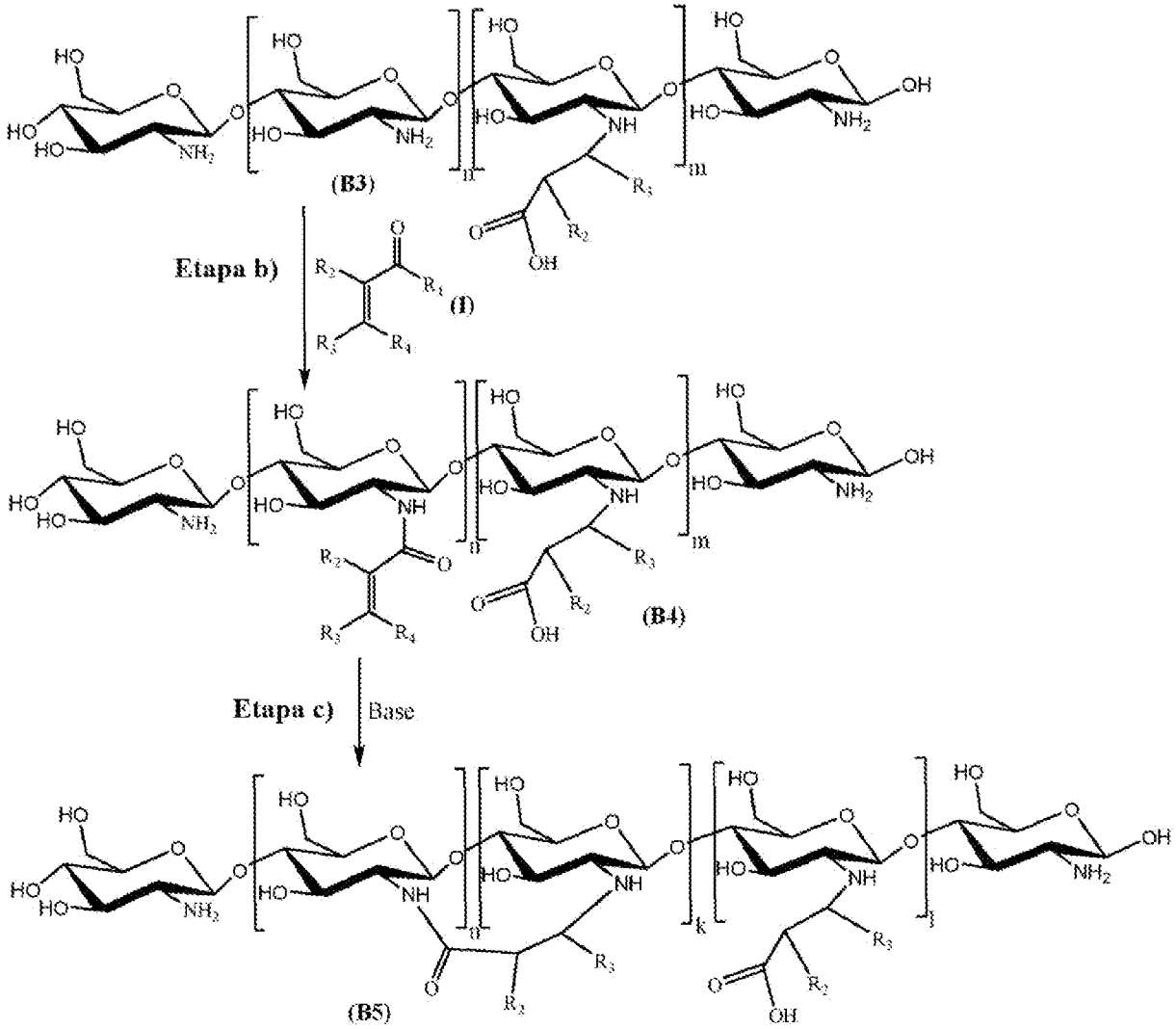
(B2)



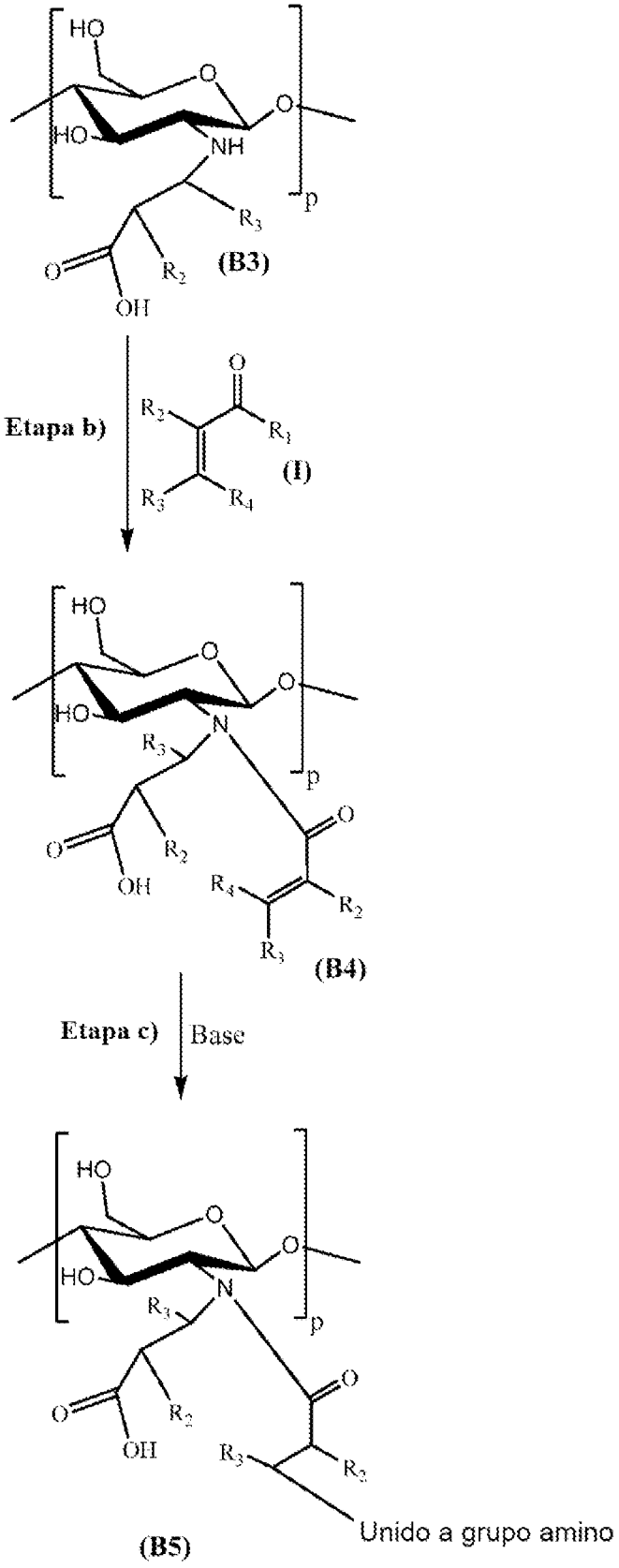
(B3)

Esto permite regenerar la mitad de los grupos amino en el quitosano reticulado como amina primaria, convirtiéndose la segunda mitad en aminas secundarias, que ahora están alquiladas con ácido propiónico (o ácido propiónico sustituido). Por ejemplo, la saponificación de un quitosano reticulado puede realizarse mediante la adición de una solución acuosa 1 molar de hidróxido sódico a 50 grados Celsius durante una hora. El producto obtenido **(B3)** puede someterse a continuación nuevamente a una **etapa b)** de acilación como se esquematiza en el **Esquema 3a** y el **Esquema 3b** a continuación en donde en este caso la acilación se produce en las mismas condiciones en las cuales puede producirse la acilación de grupos amino tanto primarios (**Esquema 3a)** como secundarios (acilación *de novo* de los grupos amino obtenidos en las fases b, c o f del **Esquema 3b)**). El producto obtenido **(B4)** se somete a continuación de nuevo a la reacción de adición de Michael en la **etapa c)** para lograr una reticulación de todos los grupos amino y para obtener un quitosano esencialmente reticulado completamente **(B5).**

Esquema 3a


(B3)
Etapa b)
(I)
(B4)
Etapa c)
Base
(B5)

Esquema 3b



En este caso, en el producto obtenido, las sales internas se forman con los grupos carboxilo, que será la mitad del

contenido inicial de grupos amino presentes al final de la primera de síntesis **etapa c).** De acuerdo con un aspecto particular, un producto de este tipo contendrá esencialmente el mismo número de grupos carboxilo, grupos amino secundarios y terciarios totales, funciones amida (excluyendo los fragmentos iniciales de acetilaminoglucósido), es decir, esto es, un producto tal comprenderá una sal interna completa, estando equilibrados todos los grupos carboxilo por grupos amino.

Sin desear quedar ligados a teoría alguna, puede considerarse que si los grupos amino están presentes en el quitosano inicial proporcionado en la **etapa a),** a continuación, proporcionar su derivación exhaustiva se logra en la **etapa b),** X grupos amino se acilan con el agente acilante y, por lo tanto, X grupos amino se someterán a la reacción aza-Michael con fragmentos de acilo injertados en el quitosano en la **etapa c).** Después de la saponificación de los grupos amida formados en la **etapa b)** presentes en el producto de la **etapa c)** sometidos a la **etapa f)** de saponificación, X grupos amino primarios se regeneran, X grupos carboxilo están disponibles del ácido acrílico usado en la acilación y X grupos amino secundarios que resultan de la **etapa c)** todavía permanecen. Por lo tanto, con la derivación exhaustiva repetida por acilación, X grupos amino primarios regenerados pueden acilarse adicionalmente (los grupos amino secundarios que se obtuvieron en la **etapa c)** probablemente pueden acilarse, pero este es un proceso menos probable). A continuación, cuando se repite la **etapa c),** los grupos amino secundarios obtenidos antes en la **etapa c)** entran en la reacción de aza-Michael para formar X grupos amino terciarios.

Además, al realizar una segunda saponificación se regeneran de nuevo X grupos amino primarios y quedan X grupos amino terciarios que no están sujetos a saponificación y se forman X grupos carboxilo. Por lo tanto, el número total de grupos carboxilo será 2X, X grupos amino primario, X grupos amino terciarios y el polímero se volverá eléctricamente neutro y formará sales internas.

Si se realiza una derivación exhaustiva por tercera vez, a continuación, solo se necesita X/2 agente acilante, ya que solo X grupos amino siguen siendo capaces de entrar en estas reacciones y todos estos grupos amino son primarios. Por lo tanto, después de la tercera secuencia de derivación (etapas b) a c)) y saponificación (etapa f), solo se obtienen 2,5X grupos carboxilo, 1,5X grupos amino terciarios, 0,5X grupos amino primarios y el polímero se volverá aniónico con un exceso de 0,5X de grupos carboxilo. Por lo tanto, la repetición de esta secuencia de reacción dará cada vez un aumento en el número de grupos carboxilo en aumentos de 0,25, 0,125, 0,0625, 0,03175 etc. La presencia de grupos carboxilo puede confirmarse fácilmente mediante infrarrojos o valoración ácido-base, y también mediante espectrometría de masas.

De acuerdo con una realización particular, la cantidad de álcali usado en la **etapa f)** de saponificación opcional está en cantidades equimolares con los grupos amida obtenidos en la primera reacción **etapa c)/d) o e)** a saponificar y hasta 10 veces el exceso molar.

De acuerdo con una realización particular, al menos una secuencia de las **etapas b) a c) (o d)/e))** se lleva a cabo con una **etapa f)** de saponificación como el fin de la adición de Michael antes de volver a someter a nueva secuencia de acilación **etapas b) a c) (o d)/e)).**

De acuerdo con una realización particular adicional, se llevan aproximadamente 2 a 6 secuencias de reacción de **etapas a) a f)**.

De acuerdo con otra realización particular, la secuencia de reacción de las **etapas a) a f)** se repite una vez o dos veces.

De acuerdo con una realización particular, después de cada secuencia de **etapas a) a f),** la solubilidad del quitosano reticulado se obtiene en un intervalo más amplio de pH y las propiedades del quitosano nativo pueden modificarse, por ejemplo, en términos de mucotropía y penetración en las células. Por lo tanto, estas propiedades pueden ajustarse ventajosamente, dependiendo del número de secuencia de reacción realizada y de las nanopartículas de quitosano reticuladas obtenidas pueden ser útiles para la administración de compuestos de interés.

De acuerdo con una realización particular, las sustancias catiónicas (por ejemplo, péptidos catiónicos tales como secuencias enriquecidas en arginina, ornitina o lisina) o neutras en términos de carga eléctrica pueden suministrarse mediante un quitosano reticulado de acuerdo con la invención.

De acuerdo con otra realización particular, el quitosano reticulado de acuerdo con la invención se puede usar para formular dichos compuestos para protegerlos de la degradación (por ejemplo, por proteólisis) o de la unión de sustancias no deseables (por ejemplo, anticuerpos u otras macromoléculas) o para asegurar una liberación lenta de la forma soluble de dichos compuestos.

De acuerdo con otra realización particular, puede integrarse material biológicamente activo dentro de las nanopartículas formadas, ya sea después de la primera **etapa b)** de acilación o la primera **etapa c)** de adición de Michael. De acuerdo con una realización particular adicional, un material biológicamente activo puede unirse covalentemente, o adsorberse o fijarse en forma de sales o encapsularse dentro de las nanopartículas de quitosano reticuladas de la invención.

En el caso en que se lleve a cabo una etapa de saponificación, la reticulación covalente de un agente biológicamente activo se destruiría, pero pueden formarse enlaces iónicos con el agente biológicamente activo dentro de las sales del quitosano reticulado formado.

Como alternativa, las nanopartículas pueden impregnarse con sustancias biológicamente activas resistentes a los reactivos usados en las **etapas a) a f)** cuando una secuencia de estas etapas se aplica tal como grupos de elementos pesados para crear nanopartículas radioopacas.

Además, como alternativa, las sustancias biológicamente activas multifuncionales lábiles se introducen preferentemente por difusión en nanopartículas de quitosano reticuladas de la invención después de su síntesis, o usando química clic, métodos de inmovilización de enzimas, proteínas, ácidos nucleicos y anticuerpos.

De acuerdo con un aspecto particular, la integración de un material biológicamente activo dentro de las nanopartículas de quitosano de la invención puede lograrse mediante la impregnación del producto resultante de la **etapa b)** o **c)** con el material biológicamente activo deseado. Por ejemplo, una solución de un material biológicamente activo en un disolvente aprótico puede añadirse al producto resultante **de la etapa b)** antes de llevar a cabo la **etapa c)** de adición de Michael. Como alternativa, el producto de quitosano acetilado resultante de la **etapa b)** puede disolverse en un disolvente adecuado para las condiciones sintéticas adicionales.

La impregnación puede realizarse sin disolver el quitosano reticulado de la invención.

En vista de la impregnación del quitosano reticulado de la invención con un agente biológicamente activo, el agente/la sustancia biológicamente activa puede disolverse en un disolvente aprótico polar o en cualquier otro. Si se usa un disolvente prótico, a continuación, antes de la reacción de aza-Michael, es conveniente retirarlo y secar el producto impregnado. Para la impregnación, los fluidos supercríticos pueden usarse como se describe en Weidner 2018, The Journal of Supercritical Fluids, 134, 220-227 https://doi.org/10.1016/j.supflu.2017.12.024; Duarte *et al.*, 2007, The Journal of Supercritical Fluids, 42 (3), 373-377 https://doi.org/10.1016/j.supflu.2007.01.007 que proporciona una impregnación de grado extremadamente alto y de alta calidad. También es posible usar métodos de electroforesis como se describe en Boccaccini *et al.*, 2010, J. R. Soc. Interface, 7, S581-S613 https://doi.org/10.1098/rsif.2010.0156.focus; Pishbin *et al.*, 2013, Acta Biomaterialia, 9(7), 7469-7479 o método de "pistola genética" como se describe en Zhao *et al.*, 2012, PLoS One, 7(10): e46765. doi: 10.1371/journalpone.0046765, si la impregnación del agente puede acelerarse por los métodos de Coulomb. Por ejemplo, una solución acuosa de un material biológicamente activo tal como un antibiótico puede mezclarse con una solución acuosa de quitosano acilado después de la **etapa b)** y someterse a evaporación con destilación azeotrópica de agua, secado por pulverización, liofilización y otros métodos de secado para obtener el quitosano acilado impregnado con el material biológicamente activo en estado seco. A continuación, el material seco se somete a un exceso de una base no nucleófila para desionizar los grupos amino del quitosano y a continuación la mezcla resultante se somete a la reacción de la **etapa c)** de adición de Michael.

De acuerdo con un aspecto adicional, el quitosano proporcionado en la etapa a) tiene un peso molecular promedio que varía de aproximadamente 5 a aproximadamente 2.000 kDalton, en particular de aproximadamente 150 a 2.000 kDalton.

De acuerdo con otro aspecto adicional, el quitosano proporcionado en la etapa a) tiene un grado de desacetilación de aproximadamente el 100 % (como en la glucosamina) a aproximadamente dos fragmentos desacetilados por macromolécula, que, por ejemplo, para el quitosano (quitina) con una masa molecular de 300 kDa es aproximadamente el 0,14 %. De acuerdo con otro aspecto se proporciona un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10. El quitosano adecuado que puede usarse como material de partida en el método de la invención puede ser de diversos orígenes, incluyendo naturales (animales o fúngicos), en particular de caparazones de cangrejos y gambas, exoesqueleto de insectos, hongos superiores, cultivos de hongos unicelulares. También puede usarse quitosano sintetizado química o enzimáticamente.

De acuerdo con un aspecto adicional, el quitosano proporcionado en la **etapa a)** se deja hinchar durante aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 1 día, preferentemente en un disolvente aprótico.

De acuerdo con otro aspecto adicional, la etapa b) de desacetilación se lleva a cabo a una temperatura de aproximadamente -70 °C (inicio de la reacción) a aproximadamente +150 °C (finalización de la reacción), preferentemente de aproximadamente +2 °C (inicio de la reacción) a aproximadamente +55 °C (finalización de la reacción). El tiempo de reacción es de aproximadamente 0,5 horas a 10 días, preferentemente de aproximadamente 2,5 horas a una temperatura de aproximadamente +20 a aproximadamente +30 °C, preferentemente bajo acción ultrasónica como medio de mezcla.

De acuerdo con otro aspecto adicional, la **etapa c)** de adición de Michael se lleva a cabo a una temperatura de aproximadamente -70 °C (inicio de la reacción) a aproximadamente +150 °C (finalización de la reacción), preferentemente de aproximadamente +20 °C (inicio de la reacción) a +55 °C (finalización de la reacción). El tiempo

de reacción es de aproximadamente 0,5 horas a 10 días, con preferencia aproximadamente 15-18 horas a aproximadamente +20 °C y aproximadamente 6 horas a aproximadamente +55 °C, preferentemente bajo acción ultrasónica como medio de mezcla.

De acuerdo con otro aspecto adicional, la etapa de secado del quitosano reticulado se lleva a cabo por secado por congelación en la **etapa e).**

De acuerdo con otro aspecto adicional, la **etapa f)** de saponificación adicional opcional se lleva a cabo a una temperatura de aproximadamente 0 °C (inicio de la reacción) a aproximadamente +140 °C (finalización de la reacción), preferentemente de aproximadamente +20 °C (inicio de la reacción) a aproximadamente +55 °C (finalización de la reacción). El tiempo de reacción es de aproximadamente 0,5 horas a 10 días, con preferencia aproximadamente 2-6 horas a +55 °C, preferentemente con acción ultrasónica como medio de mezcla.

En una realización particular, las nanopartículas de la invención se forman espontáneamente mediante el material obtenido en las **etapas b) y c)** de un método de la invención. Esas partículas son muy estables en el tiempo. Por ejemplo, una solución al 2 % a temperatura ambiente es estable durante al menos un año y durante al menos varios años en estado seco.

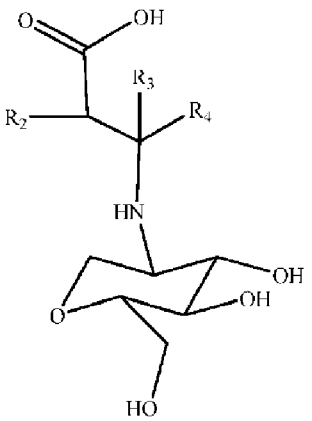
De acuerdo con un aspecto de la invención se proporciona un método para la preparación de un sistema de suministro de fármaco para un agente bioactivo que comprende la etapa de llevar a cabo un método de la invención en donde un agente bioactivo se añade en la **etapa b), c), d) o e).**

De acuerdo con un aspecto de la invención se proporciona un método para la preparación de un sistema de suministro de fármacos para un agente bioactivo que comprende la etapa de:

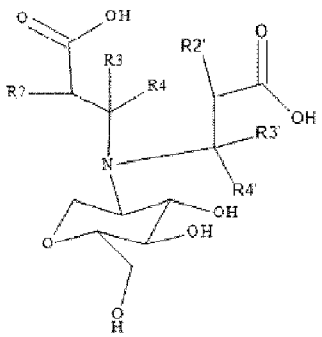
- Proporcionar un quitosano reticulado de la invención en estado húmedo o seco;
- Proporcionar un agente bioactivo a suministrar;
- Disolver el agente bioactivo en un disolvente o un fluido supercrítico;
- Cargar las nanopartículas de dicho quitosano reticulado de la invención bien impregnando el quitosano reticulado con la solución de un agente bioactivo o bien mediante introducción directa en las nanopartículas mediante electroforesis o aceleración por un campo eléctrico;
- Recoger la composición o nanopartículas obtenidas de esta manera cargadas con agente bioactivo (por ejemplo fármaco).

De acuerdo con otra realización particular, se proporciona un método para identificar un quitosano reticulado obtenible a partir de un método de acuerdo con la invención, comprendiendo dicho método las etapas de:

- proporcionar un quitosano para caracterizarse en un disolvente (por ejemplo, cloruro de metileno o cloroformo);
- acilar dicho quitosano como se describe en el presente documento (por ejemplo, como cloruro de acetilo o anhídrido acético) en agitación vigorosa, por ejemplo a una temperatura de aproximadamente 0 °C a aproximadamente 20 °C, tal como aproximadamente 30 minutos;
- neutralizar el medio de reacción con una base (por ejemplo, diisopropiletilamina como base no nucleófila);
- evaporar los disolventes y lavar el producto neutralizado obtenido;
- someter el producto a una hidrólisis ácida de reflujo (por ejemplo, preferentemente con ácido clorhídrico al 28 % durante aproximadamente 1 a 3 horas, tal como aproximadamente 2 horas);
- evaporar la mezcla de reacción y resuspender los productos hidrolizados en un ácido débil tal como ácido acético;
- determinar la presencia o la ausencia de un producto seleccionado de un producto de acuerdo con la Fórmula **(IIIa)** o de acuerdo con la Fórmula **(IIIb)**



(IIIa);

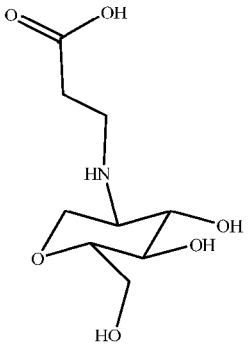


(IIIb);

en donde R_2 a R_4 son como se definen en el presente documento, $R_{2'}$ a $R_{4'}$ se definen respectivamente como R_2 a R_4 en el presente documento y
en donde la presencia de un producto de Fórmula (IIIa) y/o (IIIb) es indicativa de quitosano reticulado obtenido mediante un método de acuerdo con la invención.

De acuerdo con otra realización particular, en un método para identificar un quitosano reticulado de acuerdo con la invención, la presencia o ausencia de un producto de acuerdo con la Fórmula (IIIa) puede determinarse, por ejemplo, mediante análisis por electropulverización con espectrometría de masas, en donde, por ejemplo, un máximo con m/z = 252,077 es indicativo de la presencia de un compuesto de acuerdo con la Fórmula (IIIa), en particular de la Fórmula (II).

De acuerdo con otro aspecto se proporciona un método para identificar un quitosano reticulado obtenible mediante un método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 o un quitosano reticulado de acuerdo con la reivindicación 10, estando dicho método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 21 a 23.



(II).

El método para identificar un quitosano reticulado obtenido a partir de un método de acuerdo con la invención es muy útil ya que permite distinguir el quitosano reticulado obtenido mediante un método de acuerdo con la invención del quitosano reticulado mediante otros métodos tales como por ejemplo mediante un método descrito en *Baoqiand et al., 2015,* citado anteriormente o *El-sherbiny et al., 2009,* citado anteriormente.

Quitosano y nanopartículas del mismo de acuerdo con la invención

El quitosano reticulado de acuerdo con la invención puede prepararse a partir de materiales de partida fácilmente disponibles de acuerdo con un método de la invención. Se apreciará que cuando se dan las condiciones experimentales típicas o preferidas (es decir, temperaturas de reacción, tiempo, moles de reactivos, disolventes, etc.), también pueden usarse otras condiciones experimentales a menos que se indique de otro modo. Las condiciones de reacción óptimas pueden variar con los reactivos o disolventes particulares usados, pero dichas condiciones pueden determinarse por el experto en la materia, usando procedimientos de optimización rutinarios.

De acuerdo con una realización particular, se proporciona un quitosano reticulado y nanopartículas del mismo obtenidos mediante un método de la invención.

De acuerdo con otra realización particular, se proporciona un quitosano reticulado caracterizado por una viscosidad menor que el quitosano de partida. Por ejemplo, para un grado de desacetilación del 90 %, 3,2 % de reticulación y una concentración del 0,25 % de quitosano, una solución de nanopartículas de acuerdo con la invención es 3 veces menos viscosa que el quitosano de partida, por ejemplo, 2,4 cSt a 25°C y 1,82 cSt a 37 °C para las nanopartículas de quitosano de la invención frente a 7,5 cSt a 25 °C y 5,4 cSt a 37 °C para el quitosano de partida correspondiente.

De acuerdo con una realización particular, las sales farmacéuticamente aceptables del quitosano reticulado de la invención comprenden tales como acetato, lactato, succinato, citrato, malonato, fumarato, maleato, una sal de ácido málico, así como otros ácidos carboxílicos, hidroxicarboxílicos, además de este clorhidrato, fosfato, sulfato y otros ácidos inorgánicos.

Se entiende que el peso molecular del quitosano reticulado de la invención puede adaptarse mediante la selección del material de partida y su elección dependerá de la función prevista de las nanopartículas de la invención y la formulación de las mismas. Por ejemplo, la tasa de degradación de la composición de nanopartículas deseada, la tasa de liberación deseada de un agente bioactivo incorporado opcionalmente en el mismo, la afección terapéutica a tratar influirá en la elección del peso molecular del quitosano como material de partida.

En una realización, el peso molecular del quitosano reticulado de la invención está comprendido entre

aproximadamente 2 kDa y 2 MDa.

En una realización adicional, el peso molecular del quitosano reticulado de la invención para su uso en una composición lubricante/de relleno puede elegirse entre aproximadamente 2 kDa y 2, preferentemente de aproximadamente 30 kDa a 1.000 kDa.

En otra realización, el peso molecular del quitosano reticulado de la invención para su uso en o como sistema de suministro de fármacos puede elegirse entre aproximadamente 2 kDa y 2 MDa, preferentemente de aproximadamente 30 kDa a 1.000 kDa.

Composiciones

La invención proporciona agentes farmacéuticos o terapéuticos como composiciones, o dispositivos médicos que comprenden los mismos y métodos para tratar a un sujeto, preferentemente un paciente mamífero y más preferentemente un paciente humano que padece un trastorno médico y en particular afecciones cardiovasculares, tales como arritmias cardíacas, en particular fibrilación auricular e hipertensión, patologías articulares y enfermedades articulares, tales como artritis reumatoide, artrosis, espondiloartritis y eventos traumáticos que provocan daño al cartílago, hueso, daño del ligamento o de la cápsula sinovial, patologías y lesiones oculares, tales como síndrome del ojo seco, uveítis, glaucoma, lesiones corneales, trastornos del tejido conectivo, tales como lupus y polimiositis, trastornos o lesiones de la piel/membrana mucosa, tales como heridas, cicatrices, psoriasis, acné, eccema, rosácea, quemaduras de naturaleza física o química, en particular, heridas quirúrgicas y quemaduras solares, úlceras, hemorroides, enfermedades periodontales y dentales, daño dural tal como el que se produce después de una lesión accidental o una cirugía del cerebro y del sistema nervioso central, neoplasias malignas y benignas, carcinomas, sarcomas, linfomas y melanomas, complicaciones postoperatorias tales como fístulas e infecciones, tumores o malformaciones vasculares, complicaciones postoperatorias como fístulas e infecciones y tumores o malformación vascular.

La invención proporciona composiciones de al menos un quitosano reticulado de la invención o composición del mismo útiles para uso humano, veterinario o agrícola.

En una realización particular, una composición agrícola de acuerdo con la invención es útil como inductor del crecimiento de plantas.

De acuerdo con una realización particular, el quitosano reticulado de la invención puede usarse para la preparación de estructuras autoensambladas, máquinas moleculares, mecanismos de suministro, componentes electrónicos, materiales compuestos y lubricantes.

En una realización particular, la invención proporciona una formulación farmacéutica que comprende al menos un quitosano reticulado de la invención o una composición del mismo para su uso como un medicamento.

En otra realización particular, las composiciones de la invención son formulaciones parenterales.

En una realización particular, las composiciones de la invención son formulaciones inyectables, tales como formulaciones intraarticulares, intraarteriales, intravenosas, intrasinoviales, intradérmicas, subdérmicas, submucosas, intersticiales, intracraneales, intraoculares, intratumorales, intragástricas, intestinales, anales, intraperitoneales e intramusculares.

En otra realización particular, las composiciones de la invención son formulaciones orales. En otra realización particular, las composiciones de la invención son formulaciones tópicas. En otra realización particular, las composiciones de la invención son formulaciones oftálmicas.

Como alternativa la invención proporciona composiciones que pueden usarse en otro mamífero, por lo tanto, en seres humanos, para los mismos usos que se describieron anteriormente.

La invención proporciona además composiciones o dispositivos médicos útiles para cosmética, cirugía reconstructiva (por ejemplo, reconstrucción de tejidos), cultivo de células o tejidos biológicos (por ejemplo, cultivo de células madre), ciencia de los materiales (por ejemplo, recubrimiento de superficies tal como recubrimiento de implantes, composiciones lubricantes, composiciones floculantes), aplicaciones de diagnóstico (por ejemplo, composiciones de formación de imágenes). Estas composiciones comprenden además, respectivamente, vehículos cosméticamente aceptables o nutrientes para cultivos de células o tejidos biológicos.

Las composiciones de acuerdo con la invención comprenden composiciones de relleno de tejidos blandos, por ejemplo, rellenos dérmicos y subdérmicos, que comprende al menos un quitosano reticulado de la invención o nanopartículas del mismo. La preparación de composiciones de relleno de tejidos blandos a base de quitosano puede llevarse a cabo, por ejemplo, como se describe en Grant *et al.*, 2018, Tissue Eng Part A., 24(13-14):1091-1098. doi: 10.1089/ten.TEA.2017.0385. Epub 20 de mar de 2018.

En una realización particular se proporcionan nanopartículas de un quitosano reticulado de la invención que tienen un tamaño medio que varía de aproximadamente 5 a 100 nm.

Otro aspecto de la invención se refiere a un apósito para heridas que comprende al menos un quitosano reticulado de acuerdo con la invención.

De acuerdo con un aspecto particular adicional, la invención se refiere a un apósito para heridas que comprende una matriz permeable que comprende un hidrocoloide, un hidrogel, un alginato, colágeno, celulosa, una espuma o una tela.

Las composiciones de esta invención pueden comprender además uno o más ingrediente o ingredientes adicionales farmacéuticamente aceptables tales como alumbre, estabilizantes, agentes antimicrobianos, tampones, agentes colorantes, agentes aromatizantes, adyuvantes y similares.

Las composiciones de acuerdo con la invención, junto con un adyuvante, portador, diluyente o excipiente empleado convencionalmente puede colocarse en forma de composiciones farmacéuticas y puede emplearse como sólidos, tales como comprimidos o cápsulas cargadas o líquidos tales como soluciones, suspensiones, pomadas, emulsiones, elixires o cápsulas rellenas con los mismos, películas o geles, todos para uso oral. Las composiciones también pueden formularse como un producto seco para reconstitución con agua u otro vehículo adecuado antes de su uso.

Las composiciones de esta invención como formulaciones líquidas incluyen, pero no limitado a, suspensiones acuosas u oleosas, soluciones, emulsiones, jarabes y elixires.

Tales preparaciones líquidas pueden contener aditivos incluyendo, pero no limitado a, agentes de suspensión, agentes emulsionantes, vehículos no acuosos y conservantes. Los agentes de suspensión incluyen, pero no se limitan a, jarabe de sorbitol, metilcelulosa, jarabe de glucosa/azúcar, gelatina, hidroxietilcelulosa, carboximetilcelulosa, gel de estearato de aluminio y grasas comestibles hidrogenadas. Los agentes emulsionantes incluyen, pero no se limitan a, lecitina, monooleato de sorbitán y goma arábiga. Los conservantes incluyen, pero no se limitan a, p-hidroxibenzoato de metilo o propilo y ácido sórbico. Los agentes dispersantes o humectantes incluyen pero no se limitan a poli(etilenglicol), glicerol, seroalbúmina bovina, Tween®, Span®.

Se describen materiales adicionales así como técnicas de procesamiento de formulación y similares, en The Science and Practice of Pharmacy (Remington: The Science & Practice of Pharmacy), 22ª edición, 2012, Lloyd, Ed. Allen, Pharmaceutical Press.

Las composiciones sólidas de esta invención pueden estar en forma de comprimidos o pastillas formuladas de manera convencional. Por ejemplo, los comprimidos y las cápsulas para administración oral pueden contener excipientes convencionales que incluyen, pero no limitado a, agentes aglutinantes, materiales de relleno, lubricantes, disgregantes y agentes humectantes. Los agentes aglutinantes incluyen, pero no se limitan a, jarabe, goma arábiga, gelatina, sorbitol, tragacanto, mucílago de almidón y polivinilpirrolidona. Las cargas incluyen, pero no se limitan a, lactosa, azúcar, celulosa microcristalina, almidón de maíz, fosfato cálcico y sorbitol. Los lubricantes incluyen, pero no se limitan a, estearato de magnesio, ácido esteárico, talco, polietilenglicol y sílice. Los disgregantes incluyen, pero no se limitan a, almidón de patata y glicolato sódico de almidón. Los agentes humectantes incluyen, pero no se limitan a, laurilsulfato sódico. Los comprimidos pueden recubrirse de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica.

Las composiciones agrícolas de acuerdo con la invención comprenden aceleradores del crecimiento de las plantas, potenciadores de la germinación de semillas, formulaciones de retención de humedad y nutrientes, potenciadores de plaguicidas, formas prolongadas y estabilizadores de feromonas, formas mucoadhesivas de insecticidas, aracnocidas y preparados antimoluscos.

De acuerdo con una realización particular, se proporciona una composición agrícola que comprende de aproximadamente el 0,001 a aproximadamente el 99 % p/p de quitosano reticulado de la invención, por ejemplo, de aproximadamente el 0,05 a aproximadamente el 0,1 % (p/p).

En otra realización particular, las composiciones o nanopartículas de la invención comprenden además un agente bioactivo, que está disperso o unido covalentemente a la composición de quitosano reticulado.

En otra realización particular, las composiciones o nanopartículas de la invención están en forma de un sistema de administración de agente bioactivo.

En una realización la al menos una sustancia bioactiva puede estar presente en una cantidad de entre aproximadamente el 0,001 y el 20 % en peso, preferentemente de aproximadamente el 0,01 al 10 % en peso basado en la cantidad total de la composición o nanopartícula de quitosano reticulado de la invención.

De acuerdo con otro aspecto, las composiciones de acuerdo con la invención comprenden un medio de cultivo de

células o tejidos biológicos que comprende quitosano reticulado o una composición del mismo. Este medio de cultivo puede comprender además nutrientes celulares tales como glucosa, vitaminas, factores de crecimiento, iones metálicos y similares.

De acuerdo con otro aspecto, las composiciones de acuerdo con la invención comprenden un tejido biológico (endógeno o exógeno) o un material sintético o semisintético útil para reparar tejidos dañados del cuerpo tales como tejidos epidérmicos, neurológicos, de cartílago u óseos.

En otra realización particular, se proporciona un método de preparación de un medio de cultivo que comprende una etapa de mezclar quitosano reticulado de acuerdo con la invención con nutrientes de cultivo celular tales como glucosa, vitaminas, factores de crecimiento, iones metálicos y similares.

En otra realización particular, se proporciona un método de preparación de un tejido de reconstrucción que comprende una etapa de combinación de quitosano reticulado o una composición del mismo de acuerdo con la invención con materiales, tejidos o células útiles para reparar tejidos dañados del cuerpo tales como células madre o tejidos epidérmicos, neurológicos, de cartílago u óseos. De acuerdo con un aspecto particular, las composiciones o las nanopartículas de la invención pueden ser útiles, una vez cargadas con una sustancia o agente bioactivo, para administración y liberación *in situ* de dicha inyección de principio activo.

Modo de administración

Las composiciones de esta invención también pueden administrarse de cualquier manera mediante inyección tales como inyecciones subcutáneas, inyecciones intrasinoviales, intraarteriales, intravenosas, intraarticulares, intramusculares, subdérmicas, submucosas, intraoculares, intracraneales, intragástricas, intestinales, anales, intraperitoneales, intratumorales e intersticiales.

Las composiciones de esta invención pueden administrarse de cualquier manera por vía oral incluyendo a las superficies mucosas de la cavidad oral incluyendo la encía, el suelo de la cavidad bucal, las mejillas, los labios, la lengua, los dientes.

Las composiciones de esta invención también pueden administrarse por vía tópica sobre la piel, diversas mucosas o el ojo.

Combinación

De acuerdo con un aspecto, el quitosano reticulado o las nanopartículas del mismo de la invención o cualquier formulación farmacéuticamente aceptable del mismo adecuada pueden administrarse solos o en combinación con al menos un coagente.

De acuerdo con un aspecto particular, los coagentes de acuerdo con la invención incluyen antibióticos, ácidos nucleicos, incluyendo construcciones génicas, anticuerpos y fragmentos de anticuerpos, toxinas, citostáticos, agentes antifúngicos, componentes de fármacos quimioterapéuticos, agentes antihipertensores, sustancias antiarrítmicas, sustancias activadoras de la proliferación, hormonas, citocinas, donadores de óxido nítrico y donadores de sulfuro de hidrógeno.

La invención abarca la administración de quitosano reticulado o partículas del mismo de la invención y formulaciones farmacéuticas del mismo a un individuo de forma simultánea o secuencial con dicho al menos un coagente.

El quitosano reticulado o nanopartículas del mismo de acuerdo con la invención o una formulación farmacéutica del mismo que se administra simultáneamente con dicho coagente puede administrarse en la misma o diferentes composiciones y por la misma o diferentes vía o vías de administración.

La dosificación administrada, como dosis únicas o múltiples, a un individuo variará dependiendo de una diversidad de factores, incluyendo propiedades farmacocinéticas, condiciones y características del paciente (sexo, edad, peso corporal, salud y tamaño), extensión de los síntomas, tratamientos simultáneos, frecuencia del tratamiento y el efecto deseado.

Pacientes

En una realización, los pacientes de acuerdo con la invención son sujetos que padecen afecciones cardiovasculares, tales como arritmias cardíacas, en particular fibrilación auricular e hipertensión.

En otra realización, los pacientes de acuerdo con la invención son sujetos que padecen patologías articulares y enfermedades articulares, tales como artritis reumatoide, artrosis, espondiloartritis y eventos traumáticos que provocan daño al cartílago, hueso, daño del ligamento o de la cápsula sinovial.

En otra realización, los pacientes de acuerdo con la invención son sujetos que padecen patologías y lesiones oculares, tales como síndrome del ojo seco, uveítis, glaucoma, lesiones corneales.

En otra realización, los pacientes de acuerdo con la invención son sujetos que padecen trastornos del tejido conectivo, tales como lupus y polimiositis.

En otra realización, los pacientes de acuerdo con la invención son sujetos que padecen trastornos o lesiones de la piel/de las mucosas, tales como heridas, cicatrices, psoriasis, acné, eccema, rosácea, quemaduras de naturaleza física o química, en particular, heridas quirúrgicas y quemaduras solares, úlceras, hemorroides.

En otra realización, los pacientes de acuerdo con la invención son sujetos que padecen enfermedades periodontales y dentales.

En otra realización, los pacientes de acuerdo con la invención son sujetos que padecen daños durales tales como los que se producen después de una lesión accidental o de una cirugía del cerebro y del sistema nervioso central.

En otra realización, los pacientes de acuerdo con la invención son sujetos que padecen neoplasias malignas y benignas.

En otra realización, los pacientes de acuerdo con la invención son sujetos que padecen complicaciones postoperatorias como fístulas e infecciones.

En otra realización adicional, los pacientes de acuerdo con la invención son sujetos que desean o requieren mejoras de volumen de partes del cuerpo o remodelaciones anatómicas tales como cualquier mejora/modificación y/o aumento del volumen de una parte del cuerpo por razones estéticas o terapéuticas.

En otra realización adicional, los pacientes de acuerdo con la invención son sujetos que padecen un tumor, una malformación vascular o cualquier otra anomalía de reciente aparición de un tejido u órgano físico que produzca dolor.

Uso de acuerdo con la invención

De acuerdo con una realización particular, debido a su capacidad para formar nanopartículas espontáneamente, el quitosano reticulado de la invención es útil para diversas aplicaciones tales como cultivo de células o tejidos biológicos *in vitro*, como materiales de relleno de tejidos, para cosmética, aplicaciones de ingeniería de tejidos y organoides y ciencia de materiales.

En particular, de acuerdo con un aspecto, el quitosano reticulado de la invención puede usarse como portador de principios activos farmacéuticos (por ejemplo, como sistema de suministro de fármacos, como sistema de penetración celular (por ejemplo, en terapia génica o para agentes que no penetran en las células), como agente solubilizante, como agente de captura: encapsulación de ingredientes de interés dentro de nanopartículas para generar suspensiones para eliminación efectiva de soluciones, por ejemplo, cambiando de pH ácido a alcalino.

De acuerdo con otro aspecto, el quitosano reticulado de la invención puede usarse como implantes médicos (por ejemplo, recubrimiento de implantes para mejorar la biocompatibilidad, implantes médicos regenerativos que contienen células) o materiales (por ejemplo, materiales hemostáticos).

De acuerdo con otro aspecto, el quitosano reticulado de la invención puede usarse como sustratos para agentes de formación de imágenes (por ejemplo, usados en angiografía convencional (CT) y otras modalidades de formación de imágenes emergentes (por ejemplo, basadas en EPR, basadas en RMN y basadas en rayos X)).

De acuerdo con otro aspecto, el quitosano reticulado de la invención puede usarse como sustrato para el cultivo de células (por ejemplo, células madre), medio de cultivo celular, ingeniería de tejidos tal como la impresión 3D de organoides, para técnicas de separación/purificación, para transfección celular.

De acuerdo con otro aspecto, el quitosano reticulado de la invención puede usarse como lubricante de tamaño nanométrico (por ejemplo, después de la pirólisis), agente dispersante para preparaciones coloidales o como floculante.

De acuerdo con otra realización particular, se proporciona un uso de quitosano reticulado de la invención o una nanopartícula de acuerdo con la invención o formulaciones de las mismas para la preparación de un sistema de suministro, cultivo de células o tejidos biológicos *in vitro* o de materiales de ingeniería de tejidos, tales como tejidos de reconstrucción neuroquirúrgica, ósea, de cartílago, epidérmica.

De acuerdo con otra realización particular, los quitosanos reticulados o las nanopartículas de acuerdo con la invención o formulaciones de los mismos son útiles para su uso en la prevención o el tratamiento de un trastorno médico, y en particular de afecciones cardiovasculares, tales como arritmias cardíacas, en particular fibrilación auricular e

hipertensión, patologías articulares y enfermedades articulares, tales como artritis reumatoide, artrosis, espondiloartritis y eventos traumáticos que provocan daño al cartílago, hueso, daño del ligamento o de la cápsula sinovial, patologías y lesiones oculares, tales como síndrome del ojo seco, uveítis, glaucoma, lesiones corneales, trastornos del tejido conectivo, tales como lupus y polimiositis, trastornos o lesiones de la piel/membrana mucosa, tales como heridas, cicatrices, psoriasis, acné, eccema, rosácea, quemaduras de naturaleza física o química, en particular, heridas quirúrgicas y quemaduras solares, úlceras, hemorroides, enfermedades periodontales y dentales, daño dural tal como el que se produce después de una lesión accidental o una cirugía del cerebro y del sistema nervioso central, neoplasias malignas y benignas, en particular carcinomas, sarcomas, linfomas y melanomas, complicaciones postoperatorias tales como fístulas e infecciones, tumores o malformaciones vasculares o para la prevención y/o el tratamiento de degeneración tisular y trastornos relacionados.

De acuerdo con otro aspecto particular adicional, se proporcionan quitosanos reticulados o nanopartículas de acuerdo con la invención o formulaciones de los mismos para su uso cosmético o para cirugía estética y reconstructiva.

De acuerdo con otro aspecto particular adicional, se proporcionan quitosanos reticulados o nanopartículas de acuerdo con la invención o formulaciones de los mismos para su uso en suministro de fármacos *in vivo*.

De acuerdo con un aspecto particular, se proporciona el uso de una nanopartícula de acuerdo con la invención como sistema de administración de al menos un agente bioactivo.

De acuerdo con una realización particular, se proporciona una composición que comprende al menos un quitosano reticulado o nanopartículas de acuerdo con la invención que es útil en muchas aplicaciones médicas tales como sistema de administración para al menos un agente bioactivo o sistema de administración de células en ingeniería de tejidos, sistemas de cultivo de células o tejidos biológicos y similares.

A continuación se describirán ejemplos que ilustran la invención de forma más detallada y con referencia a las realizaciones representadas en las Figuras.

Ejemplos

Las siguientes abreviaturas se refieren respectivamente a las definiciones a continuación:
DMF (Dimetilformamida); **DMSO** (dimetil sulfóxido); **MWCO** (Corte de peso molecular).

Ejemplo 1: Síntesis de un quitosano de la invención

Las nanopartículas de un quitosano de la invención se sintetizaron como se describe en el Esquema 1 anterior, en donde los materiales de partida usados fueron los siguientes:

a) proporcionar un quitosano y someter dicho quitosano a una etapa de hinchamiento en ausencia de agua* (por ejemplo, *en un disolvente aprótico)

450 g de quitosano seco (el quitosano puede secarse al vacío sobre óxido de fósforo, al vacío con calor moderado, destilación azeotrópica con etanol, acetonitrilo, acetona o cualquier otro disolvente adecuado) se colocan en un reactor en una atmósfera inerte (por ejemplo, purgada con argón). Este reactor es preferentemente un matraz de dos litros de fondo redondo equipado con un agitador magnético, una boquilla de dos cuernos, en el cual se introduce una boquilla del matraz Drexel para purgar con un gas inerte (por ejemplo argón) y un embudo de goteo con contrapresión para añadir reactivos.

A continuación se vierten 1.400 ml de un disolvente aprótico (por ejemplo, DMF) en el reactor y se deja que el quitosano se hinche durante aproximadamente 1 hora a temperatura ambiente.

En caso de que se proporcione quitosano sin secar, se vierten 1.500 ml de un disolvente aprótico (por ejemplo, DMF) en el reactor y se deja que el quitosano se hinche durante 1 hora a temperatura ambiente, a continuación, 300 ml de disolvente aprótico (por ejemplo, DMF) se eliminan por destilación al vacío y a continuación se añaden 200 ml de DMF al quitosano seco en el reactor y se deja que el quitosano se hinche durante 1 hora a temperatura ambiente.

El medio de reacción con quitosano hinchado se enfría a continuación a aproximadamente 2-6 °C en un baño de hielo o con un baño conectado a un termostato a aproximadamente 2-6 °C. En el mismo baño, también se enfría un reactor de 250 ml (por ejemplo, un matraz de fondo redondo) con 100 ml de DMF seco. Después del enfriamiento, se añade el agente acilante al disolvente aprótico (100 ml de DMF), gota a gota, con agitación y evitando el sobrecalentamiento local, mientras agita el disolvente. La solución de reactivo acilante en DMF puede calentarse hasta aproximadamente temperatura ambiente.

b) acilar los grupos amino de dicho quitosano con un compuesto acrílico de Fórmula (I) en ausencia de agua:

La solución del compuesto de acriloílo preparado anteriormente se añade a una suspensión de quitosano obtenida

anteriormente en aproximadamente 15 minutos con agitación vigorosa, preferentemente agitando suavemente el reactor (por ejemplo, manualmente), mientras se detiene la adición del compuesto de acriloílo, ya que esto permite lavar los grumos de quitosano con aerosoles de disolvente de las paredes superiores del matraz. Una vez completada la adición de la solución de compuesto de acriloílo, el embudo de goteo se lava con una cantidad mínima de un disolvente aprótico (por ejemplo DMF) del orden de 10-15 ml y esta solución se añade al medio de reacción. Se retira el enfriamiento y se continúa agitando durante otras dos horas agitando ocasionalmente, dejando que el medio de reacción se caliente a temperatura ambiente. Después de la agitación, el matraz se coloca en un baño ultrasónico durante aproximadamente 15 minutos y la mezcla de reacción se somete a un tratamiento ultrasónico. Durante este tiempo de exposición ultrasónica, solo se produce un ligero calentamiento de la mezcla de reacción hasta no más de 30 °C.

c) ***someter el producto de acilación de la etapa b) a una reacción de adición nucleófila (adición Aza-Michael) en presencia de una base no nucleófila:***

Después de esto, se añade una base no nucleófila (por ejemplo, trietilamina, diisopropiletilamina) en exceso en comparación con la cantidad de compuesto de acriloílo usado en la etapa b) al medio de reacción (por ejemplo, a través de un embudo de goteo) en aproximadamente 15 minutos con agitación vigorosa y agitación periódica. La mezcla se deja reposar durante la noche o aproximadamente 15-18 horas a temperatura ambiente. A continuación, el reactor se coloca en un baño con una temperatura de aproximadamente 55 °C y la mezcla se agita durante aproximadamente 6 horas. El reactor se retira del baño y se coloca en un baño ultrasónico precalentado a aproximadamente 55 °C durante aproximadamente 15 minutos y la mezcla de reacción se somete a un tratamiento ultrasónico.

Después del tratamiento ultrasónico, el reactor se transfiere a un evaporador rotatorio y se elimina por destilación la base no nucleófila, si se usa una base orgánica volátil no nucleófila. Si se usa una base no volátil, a continuación, el reactor se enfría a temperatura ambiente o a una temperatura inferior y se añade una cantidad equivalente de ácido (por ejemplo, ácido clorhídrico) con agitación vigorosa. Se controla el pH del medio de reacción resultante para garantizar la obtención de un medio de reacción neutro.

d) ***Obtención de un quitosano reticulado de la invención***

El quitosano reticulado se obtiene en la etapa c) en suspensión en el disolvente aprótico (por ejemplo DMF) con impurezas de sales. Por lo tanto, el producto se somete a una etapa de purificación, por ejemplo, mediante diálisis contra agua desionizada. Por ejemplo, este propósito, la solución reaccionante obtenida en la etapa c) se transfiere a bolsas de diálisis, se cierran con abrazaderas y se colocan en recipientes con agua desionizada mezclada en un agitador magnético. La diálisis puede monitorizarse de diferentes maneras: por ejemplo, controlando el contenido de sal a través de la medición de la conductividad de los líquidos de lavado, o controlando el contenido de DMF mediante la absorción UV a una longitud de onda inferior a 260 nm. Si después de la incubación de agua desionizada con un producto dializado durante 20 minutos, no existen diferencias significativas ni en la conductividad eléctrica ni en la absorción UV, entonces el proceso de diálisis se considera completo.

e) ***Obtener opcionalmente un quitosano reticulado de la invención en estado seco***

Es posible usar un producto húmedo obtenido en la **etapa d)** sin secarlo. Sin embargo, también puede secarse, por ejemplo, para fines de formulación/almacenamiento o transporte.

A continuación se seca el producto purificado obtenido en la etapa d). Por ejemplo, el secado puede realizarse en un liofilizador con congelación previa del producto; primero en presencia de anhídrido fosfórico o cualquier desecante adecuado tales como tamices moleculares, hidróxido potásico y similares) a presión atmosférica para absorber la mayor parte del líquido, y a continuación al vacío en presencia de anhídrido fosfórico o cualquier desecante adecuado o con evaporación preliminar en un evaporador rotatorio y destilación azeotrópica repetida de agua con etanol y posterior secado al vacío sobre anhídrido fosfórico o cualquier desecante adecuado.

Generalmente el rendimiento del método de la invención es de aproximadamente el 90 %. Las pérdidas se asocian más probablemente con el arrastre de nanopartículas durante el secado, así como pérdidas durante la transferencia desde el recipiente de reacción, bolsas de diálisis, ya que la prioridad de la esterilidad y la ausencia de contaminación es mayor que la prioridad del rendimiento.

f) ***Un quitosano reticulado adicional de la invención en estado seco***

Opcionalmente, el quitosano reticulado purificado obtenido en la **etapa c), etapa d) o etapa e)** puede someterse a una saponificación. Con este fin, el quitosano reticulado obtenido en la etapa d) se coloca en un reactor en atmósfera inerte (por ejemplo, purgado con argón). Se vierten 1.200 ml de agua desionizada en el matraz y se añade una solución alcalina (por ejemplo, NaOH en agua) con un exceso molar del 20 % en relación con la cantidad de compuesto de acriloílo usado en aproximadamente 100 ml de agua desionizada con agitación vigorosa durante aproximadamente 15 minutos. Es aconsejable agitar suavemente el matraz manualmente mientras se detiene la adición de álcali, ya que

este procedimiento permite lavar los grumos de quitosano que llegaron con las pulverizaciones de disolvente a las paredes superiores del reactor. Después de la agitación, el reactor se coloca en un baño ultrasónico y la mezcla de reacción se somete a un tratamiento ultrasónico; después de alcanzar una masa de reacción de aproximadamente 55 °C, el tratamiento ultrasónico se continúa durante otras 2 horas a esta temperatura. Después de esto, el producto obtenido puede neutralizarse con una cantidad equivalente de ácido, dializarse o secarse sin neutralización y después de secarse someterse de nuevo a al menos un ciclo de **etapas b) a c) (o d)/e)).** El uso de más de un ciclo de una secuencia de **etapas b) a c) (o d)/e))** permite aumentar la saturación del quitosano reticulado con funciones carboxilo.

Ejemplo 2: Ejemplo de síntesis de quitosanos reticulados de la invención

Se han sintetizado diversos quitosanos reticulados de la invención (CHI) de acuerdo con el proceso descrito en dicho documento, variando la naturaleza y la proporción del agente reticulante. Los ejemplos se presentan en la Tabla 1 a continuación.

En cada caso, se usan 450 gramos de quitosano como material de partida. Los Ejemplos 2a-2r y C1, el compuesto de acriloílo es cloruro de acriloílo (número de registro CAS: 814-68-6). Los Ejemplos 2t-2al el compuesto de acriloílo es cloruro de metacriloílo (número de registro CAS: 920-46-7). La reacción se lleva a cabo como se describe en las etapas a) a c) del método de la invención. Los ejemplos 2am-2as del compuesto de acriloílo son diferentes cloruros de acriloílo.

Tabla 1

CHI	Quitosano	Compuesto de acriloílo	Reticulación/quitosano: Número teórico de enlaces o porcentaje de reticulación
2a	PM: 11,5 kDa DD: 62 %	4,250 g (20 % de exceso a quitosano)	1
2b	PM: 10,7 kDa DD: 91 %	4,570 g (20 % de exceso a quitosano)	1
2c	Igual que 2a	11,278 g	9,8 % de los grupos amida/amina inicialmente presentes en la macromolécula de quitosano (4,9 % generado en la etapa b) y 4,9 % generado en la etapa c)
2d	Igual que 2b	12,112 g	Igual que 2c
2e	Igual que 2a	71,35 g	totalidad de los grupos amina
2f	Igual que 2b	112,47 g	Igual que 2e
2 g	PM: 53,0 kDa DD: 70 %	0,922 g (20 % de exceso a quitosano)	1
2h	PM: 50,3 kDa DD: 91 %	0,972 g (20 % de exceso a quitosano)	1
2i	Igual que 2g	3,754 g	3,2 % de los grupos amida/amina inicialmente presentes en la macromolécula de quitosano (1,6 % generado en la etapa b) y 1,6 % generado en la etapa c).
2j	Igual que 2h	3,953 g	Igual que 2i
2k	Igual que 2g	82,12 g	Igual que 2e
2l	Igual que 2h	112,40 g	Igual que 2e
2m	PM: 543,4 kDa DD: 60 %	90 mg (20 % en exceso de quitosano)	1
2n	PM: 501 kDa DD: 93 %	98 mg (20 % en exceso de quitosano)	1
2o	Igual que 2m	4,60 g	4,0 % de los grupos amida/amina inicialmente presentes en la macromolécula de quitosano (2,0 % generado en la etapa b) y 2,0 % generado en la etapa c).
2p	Igual que 2n	5,00 g	Igual que 2o
2q	Igual que 2m	68,72 g	Igual que 2e
2r	Igual que 2n	115,53 g	Igual que 2e
C1	Glucosamina PM: 179,17 g/mol DD: 100 %	113,66 g	Igual que 2e
2t	Igual que 2a	4,908 g (20 % en exceso de quitosano)	1

(continuación)

CHI	Quitosano	Compuesto de acriloílo	Reticulación/quitosano: Número teórico de enlaces o porcentaje de reticulación
2u	Igual que 2b	5,275 g (20 % en exceso de quitosano)	1
2v	Igual que 2a	13,025 g	Igual que 2c
2w	Igual que 2b	13,988 g	Igual que 2c
2x	Igual que 2a	82,40 g	Igual que 2e
2y	Igual que 2b	129,89 g	Igual que 2e
2z	Igual que 2g	1,065 g (20 % en exceso de quitosano)	1
2aa	Igual que 2h	1,122 g (20 % en exceso de quitosano)	1
2ab	Igual que 2g	4,335 g	Igual que 2i
2ac	Igual que 2h	4,565 g	Igual que 2i
2ae	Igual que 2g	94,84 g	Igual que 2e
2af	Igual que 2h	129,81 g	Igual que 2e
2ag	Igual que 2m	104 mg (20 % en exceso de quitosano)	1
2ah	Igual que 2n	113 mg (20 % en exceso de quitosano)	1
2ai	Igual que 2m	4,233 g	Igual que 2i
2aj	Igual que 2n	4,591 g	Igual que 2i
2ak	Igual que 2m	79,37 g	Igual que 2e
2al	Igual que 2n	133,42 g	Igual que 2e
2am	Igual que 2n	cloruro de α,β-dimetilacriloílo (CAS [49651-33-4], P.M. 118,56 g/mol, 5,207 g	Igual que 2i
2an	Igual que 2n	cloruro de ácido 2-metilendodecanoico (CAS [52756-21-5], P.M. 230,77 g/mol, 10,135 g	Igual que 2i
2ao	Igual que 2n	cloruro de ácido (Z)-urocánico (CAS [91788-89-5], P.M. 138,13 g/mol, 6,066 g	Igual que 2i
2ap	Igual que 2n	cloruro de (Z)-2-cloro-2-butenoílo (CAS [56030-36-5], P.M. 138,98 g/mol, 6,104 g	Igual que 2i
2aq	Igual que 2n	Cloruro mucónico (CAS [58823-55-5], P.M. 179,00 g/mol, 3,931 g	Igual que 2i
2ar	Igual que 2n	cloruro de (Z)-2-metilhept-2-en-6-inoílo (CAS [313217-54-8], P.M. 156,61 g/mol, 6,878 g	Igual que 2i
2as	Igual que 2n	Anhídrido maleico (CAS [108-31-6], P.M. 98,06 g/mol, 4,307 g	Igual que 2i
2at	Igual que 2h	Igual que 2j	Las temperaturas de partida en la etapa b) y en la etapa c) son -70 °C y las reacciones se llevan a cabo a - 20 °C durante 10 días.
2au	Igual que 2h	1/1000 parte de lo mismo que 2j, 4 mg	La reacción se lleva a cabo como se describe en la etapa b) y en la etapa c) del Método general, pero en 1000 veces menos masa y en un reactor sellado de 5 ml. La temperatura de partida

			en la etapa b) y en la etapa c) son -70 °C y las reacciones se llevan a cabo a +150 °C durante 30 minutos.
2av	Obtenido en ***2f***		La reacción se lleva a cabo como se describe en la etapa f). En estas condiciones, la cantidad final de grupos amino modificados con ácido propiónico corresponde a la mitad de los grupos amino inicialmente presentes en la macromolécula de quitosano.
2ax	Obtenido en ***2k***		Igual que ***2av***
2ay	Obtenido en 2r		Igual que ***2av***
2az	Obtenido en ***2av***	56,24 g de cloruro de acriloílo	La reacción se lleva a cabo como se describe en la etapa b), en la etapa c), en la etapa f) En estas condiciones, el 75 % de los grupos amina inicialmente presentes en la macromolécula de quitosano se someten a modificación con ácido propiónico.
2ba	Obtenido en 2ax	41,05 g de cloruro de acriloílo	Igual que 2az
2bb	Obtenido en 2ay	57,77 g de cloruro de acriloílo	Igual que 2az
2bc	Obtenido en 2r		La reacción se lleva a cabo como se describe en la etapa f), pero la saponificación comienza a 0 °C y continúa 10 días a esta temperatura, la cantidad de base es equimolar con el cloruro de acriloílo usado. En estas condiciones, la cantidad final de grupos amino modificados con ácido propiónico corresponde a la mitad de los grupos amino inicialmente presentes en la macromolécula de quitosano.
2bd	Obtenido en 2r		La reacción se lleva a cabo como se describe en la etapa f), pero la saponificación comienza a 0 °C y continúa 30 minutos a 140 °C bajo presión, la cantidad de base es equimolar con el cloruro de acriloílo usado. En estas condiciones, la cantidad final de grupos amino modificados con ácido propiónico corresponde a la mitad de los grupos amino inicialmente presentes en la macromolécula de quitosano.
2be	Obtenido en 2r		La reacción se lleva a cabo como se describe en la etapa f), pero la saponificación comienza a 0 °C y continúa 10 días a 0 °C, la cantidad de base es 10 equivalentes con el cloruro de acriloílo usado. En estas condiciones, la cantidad final de grupos amino modificados con ácido propiónico corresponde a la mitad de los grupos amino inicialmente presentes en la macromolécula de quitosano.
2bf	Obtenido en 2r		La reacción se lleva a cabo como se describe en la etapa f), pero la saponificación comienza a 0 °C y continúa 30 minutos a 140 °C bajo presión, la cantidad de base es 10 equivalentes con el cloruro de acriloílo usado. En estas condiciones, la cantidad final de grupos amino modificados con ácido propiónico corresponde a la mitad de los grupos amino inicialmente presentes en la macromolécula de quitosano y se produce cierta saponificación de los grupos acetilo.
2bg	Igual que 2a	143 g de cloruro de acriloílo	La reacción se lleva a cabo como se describe en la etapa b). En estas condiciones, la totalidad de los grupos amina inicialmente presentes en la macromolécula de quitosano se someten a modificación con ácido acrílico formando amidas de acriloílo que contienen doble enlace.
2bh	2000 kDa, 10 % de DD	3,278 g de cloruro de acriloílo y solución al 10 % de LiCl en N,N-dimetilacetamida como un disolvente	La reacción se lleva a cabo como se describe en la etapa b) y en la etapa c). Igual que 2i.

Ejemplo 3: Caracterización de las nanopartículas de quitosano de la invención

Una muestra de quitosano reticulado de 501 kDa al 3,2 % **(Ejemplo 2i)** preparado como se describió anteriormente se adsorbió durante 30 segundos en una rejilla de cobre recubierta de formvar/carbono y se tiñó con acetato de uranilo

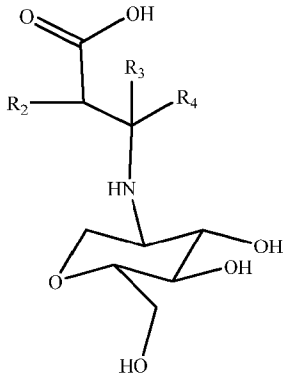
durante 5 segundos. A continuación se obtuvo una micrografía del material teñido usando un microscopio electrónico de transmisión Jem1400 (Jeol) y una cámara Veleta (SIS, Alemania) (Fig. 1A) que muestra que la mayor parte de la preparación consiste en partículas globulares con un diámetro aproximado de 15 nm, similares en tamaño a los virus de pequeños mamíferos. También pueden observarse algunas partículas más grandes, con diámetros en el intervalo de 60-80 nm, correspondiente al de partículas víricas de tamaño medio.

Además, películas secas de quitosano lineal convencional (PM: 501 kDa, 93 % de DD) (Bioavanta) y de un quitosano reticulado de acuerdo con la invención elaborado a partir del mismo quitosano **(Ejemplo 2i)** se obtuvieron vertiendo una solución de quitosano al 2 % en ácido succínico acuoso al 1 % en una placa de Petri, formando de esta manera una capa de 1 mm que se seca a continuación al vacío sobre anhídrido fosfórico a peso constante a temperatura ambiente y esas películas se analizaron a continuación con un microscopio de fuerza atómica "Solver Bio" (NT-MDT, Zelenograd, Rusia), en modo semicontacto. La representación tridimensional de una superficie de película de 100 µm x 100 µm de la muestra de quitosano convencional (PM: 501 kDa, 93 % de DD) muestra que la superficie es lisa, con los polímeros de quitosano lineales probablemente dispuestos colinealmente **(Fig.1B1)**, mientras que el área superficial de la muestra de quitosano reticulado correspondiente del **Ejemplo 2i** es rugosa, con "picos" y "valles", formada por aglomeraciones de estructuras globulares **(Fig.1B2)**. La **Figura 1B3** y **B4** visualizan mediante películas de microscopía de fuerza atómica, que comprende nanocelulosa bacteriana embebida con quitosano reticulado al 1 % p/p de solución de acuerdo con la invención en agua. Las mediciones de AFM se realizaron en modo de semicontacto en un microscopio de sonda de barrido Solver Next (NT-MDT, Rusia) en condiciones ambientales convencionales en aire (T = 26 °C, HR = 15 %). Se usaron sondas AFM ScanAsyst-AIR (Bruker, EE.UU.) con una rigidez de viga-voladizo de ~0,4 N/m con una frecuencia de resonancia de ~70 kHz y un radio de curvatura nominal (nitidez de la sonda AFM) de 2 nm para lograr una fuerza de presión óptima (SetPoint). Todas las mediciones se realizaron a una velocidad de barrido de 0,5 Hz y una resolución de 512×512 puntos. El procesamiento posterior se realizó en el programa ImageAnalysis 3.5 restando el plano inclinado y eliminando los defectos de medición ("sticking"). El análisis de las **Fig. 1 B3 y B4** obtenidas reveló estructuras globulares distribuidas uniformemente en la superficie de la muestra **(Fig. 1) B3 y B4),** con un diámetro promedio de glóbulos de 20 nm, que corresponde al tamaño de los virus pequeños, tales como *Caliciviridae, Picornaviridae, Parvoviridae.* La presencia de las estructuras observadas en AFM está confirmada por los datos de microscopía electrónica de transmisión anterior **(Fig. 1 A)**.

Las diferencias estructurales entre el quitosano convencional (control negativo) y un quitosano reticulado **(Ejemplo 2i)** de la invención y una glucosamina reticulada (Ejemplo Comparativo C1) (control positivo) se investigan adicionalmente en atmósfera inerte (por ejemplo, argón) mediante un método de hidrólisis ácida por reflujo que permite el análisis de sustancias de bajo peso molecular de una manera precisa para identificar una sustancia marcadora formada solo en el caso de una reticulación exitosa como sigue:

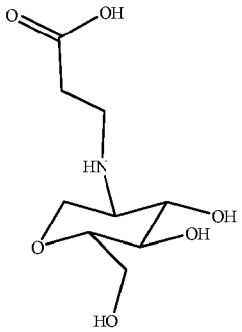
Las muestras (100 mg cada una) se añaden con agitación vigorosa a una solución de 1 ml de cloruro de acetilo en 5 ml de cloruro de metileno enfriada a -20 °C. A continuación la mezcla se calienta a 0 °C y se mantiene en agitación vigorosa durante 30 minutos. Se añade diisopropiletilamina (1 ml) y la mezcla se calienta a temperatura ambiente y se mantiene con agitación vigorosa durante otros 30 minutos. La neutralización del clorhidrato resultante, posteriormente permitirá lavar con agua todas las sustancias que interfieran en el análisis y también, la presencia de una base fuerte no nucleófila permite que la acetilación se lleve a cabo lo más completamente posible. Todos los disolventes se evaporan cuidadosamente al vacío y el residuo se lava tres veces con muestras de agua de 1 ml. Se descarta el agua de lavado y se añaden 10 ml de ácido clorhídrico al 28 % a los precipitados sólidos y se calientan a reflujo durante 2 horas. Las mezclas de reacción se evaporan cuidadosamente al vacío y los residuos (aproximadamente 100 mg) se resuspenden en 100 ml de ácido acético acuoso al 2 %. En ese momento las muestras están listas. En las condiciones actuales se ha producido entonces la hidrólisis completa del polímero a glucosamina y un derivado de glucosamina. Por lo tanto, ya que la **sustancia de Fórmula (II)** no se encuentra en la quitina y el quitosano naturales, solo puede obtenerse mediante la reacción de aza-Michael con el resto de ácido acrílico y, por lo tanto, la detección de dicha sustancia puede usarse para identificar un quitosano reticulado elaborado mediante un método de acuerdo con la invención.

Si cualquier cloruro de acriloílo (por ejemplo, el cloruro ácido de cualquier ácido acrílico usado para la etapa de reticulación de acuerdo con la invención) de Fórmula (I) se usa como un agente de reticulación (por ejemplo, para el **ejemplo 2i),** después de la preparación preliminar de la muestra (por ejemplo, acetilación, lavado), la hidrólisis ácida de reflujo de los polímeros obtenidos, que conduce no solo a la hidrólisis de los enlaces glucósido entre las unidades de glucosamina, sino también de los enlaces amida tanto de la acetilglucosamina como de los creados durante la acilación con un agente de reticulación (por ejemplo, derivados de ácido acrílico sustituidos o no sustituidos activados para la acilación) conducirán a la formación del siguiente derivado de glucosamina y ácido propiónico de Fórmula (IIIa):



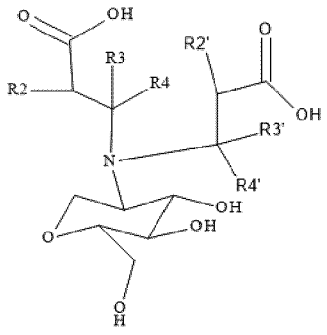
(IIIa)

en donde R_2 a R_4 son como se definen en la presente solicitud, en particular el siguiente derivado de glucosamina y ácido propiónico de Fórmula (II) si no está sustituido, ácido acrílico activado por acilación, se usa:



(II)

Esta sustancia es hidrolíticamente estable y debe estar presente en la mezcla si inicialmente se produjo reticulación. Se forman derivados (IIIa) similares si se usan otros reactivos de reticulación. En caso de llevar a cabo altos grado de reticulación, la detección de derivados de Fórmula (**IIIb**) puede usarse para identificar un quitosano reticulado elaborado mediante un método de acuerdo con la invención



(IIIb)

en donde R_2 a R_4 son como se definen en el presente documento, $R_{2'}$ a $R_{4'}$ se definen respectivamente como R_2 a R_4 en el presente documento, en donde $R_{2'}$ a $R_{4'}$ pueden ser idénticos respectivamente a cada R_2 a R_4 correspondiente o diferentes si los compuestos acrílicos de Fórmula (I) usados en la secuencia posterior de las etapas b) a c) en un método de la invención son diferentes de los usados en la primera secuencia.

Para sustentar la presencia de reticulación en un producto resultante de un método de la invención, las soluciones de muestra preparadas como se describe anteriormente se usan en el análisis espectrométrico de masas (Bruker Daltonics TOF 180 mkl/h, tune_low.m, barrido ES pos., N2-4 l/min, 190 C, Nb.=0,4, Espectros de tiempo 1s) directamente, sin cromatografía previa. En los espectros de masas en la región de iones de interés (menor relación

m/z) para ambos patrones comparativos de quitosano **(Fig. A2)** y el quitosano reticulado de la invención **(Fig. B2),** se observa un máximo específico de glucosamina (m/z = 180,073), que refleja la presencia de restos intactos de aminoglucosa. Sin embargo, para el quitosano reticulado de la invención, aparece un nuevo máximo con m/z = 252,077 **(Fig. B2),** correspondiente al producto de Fórmula (II) resultante de la alquilación de la aminoglucosa con ácido propiónico. En este ejemplo, la intensidad de máximo es baja, lo que refleja el bajo porcentaje de reticulación de la muestra (3,2 % de reticulación según lo determinado por las condiciones de reacción 2i). Este es un máximo característico que respalda una reticulación exitosa del quitosano según el método de la invención. Estuvo presente en todas las muestras resultantes del método de la invención llevado a cabo en diversas condiciones apropiadas como se describe en la Tabla 1 anterior (incluyendo el control positivo comparativo de glucosamina) y estuvo ausente en todos los quitosanos y quitinas analizados.

Para confirmar la atribución de los picos m/z = 180 y m/z = 252 a la glucosamina y al compuesto (II), se realizaron estudios de colisión a diferentes energías de impacto (AB SCIEX Triple Quad™ 3500) (5 V y 15 V). En este caso, los residuos secos pretratados (después de la hidrólisis, las mezclas de reacción se evaporan al vacío) se disolvieron en una solución acuosa que contiene metanol al 10 % y ácido fórmico al 0,1 %. Después de la fragmentación a una energía de impacto más alta (instrumento Sciex) del compuesto m/z = 180, se observa un espectro con pérdida de agua (-18 m/z, -2*18 m/z, -3*18 m/z) **(Fig. 5A y 5B).** Con un aumento en la energía de las colisiones, la intensidad de los máximos de pérdida de agua también aumenta. Este fenómeno es característico de los carbohidratos. Se observa una imagen similar para iones el compuesto m/z = 252 **(Fig. 5B y 5C).** Sin embargo, como un derivado de un carbohidrato, puede ser más estable con respecto a las pérdidas de agua, en las mismas energías de colisión. En consecuencia, las intensidades relativas observadas de los picos que representan pérdidas de agua son menores.

La estabilidad del quitosano de 501 kDa reticulado al 3,2 % de la invención **(Ejemplo 2i)** preparado como se describió anteriormente se controló mediante espectrometría de masas después de la adición de 500 µl de una solución de lisozima de huevo a una concentración de 10 mg por ml en tampón de acetato de sodio (pH 5,5) a 5 mg de la invención. La mezcla se incubó en un agitador a 37 °C durante 7 días hasta que no se pudieron observar más cambios en el espectro de masas. En esa fase, los espectros de masas revelaron un patrón característico en forma de "peine" de compuestos de alto peso molecular: máximos regularmente intercalados con una intensidad que aumenta regularmente en relaciones m/z de 955-958, 1023-1024, 1101-1104, 1193-1196. Los máximos corresponden a los mismos fragmentos que difieren en la unidad de carga. Para las masas dadas, las cargas iónicas son +15, +14, +13 y +12. La masa del fragmento principal es 14.305 Da. Se obtuvieron resultados similares en muestras incubadas durante períodos más largos, de hasta 3 semanas. Esto demuestra que la hidrolasa, responsable de la hidrólisis del quitosano y sus derivados tanto en la lisozima de la clara del huevo como en los tejidos de los animales de sangre caliente, es capaz de hidrolizar el quitosano reticulado solo en fragmentos bastante grandes con una masa de aproximadamente 14 kDa. Por lo tanto, esto sugiere que el quitosano de mayor peso molecular y desacetilado se usa para preparar nanopartículas, cuanto más estable sea la hidrólisis enzimática.

Por lo tanto, estos datos respaldan una alta diferencia de estructura entre el quitosano reticulado de la invención que forma nanopartículas y el quitosano convencional usado como material de partida. Además, un método basado en la detección de una sustancia de Fórmula (II) o sustancias relacionadas es altamente sensible y altamente específico en la detección de nanopartículas obtenidas mediante un método de la invención.

Ejemplo 4: Internalización celular de las nanopartículas de un quitosano de la invención

La capacidad de las nanopartículas de un quitosano de la invención para internalizarse por las células se ha probado de la siguiente manera mediante microscopía de fluorescencia, usando isotiocianato de fluoresceína (FITC) y permeación de quitosano marcado con 5-(y 6-)carboxifluoresceína (FAM) dentro de la córnea murina.

Los quitosanos reticulados marcados con fluoresceína se prepararon usando quitosano inicial convencional con un peso molecular de 501 kDa y un grado de desacetilación del 93 % o el 3,2 %, quitosano reticulado de acuerdo con la invención (Ejemplo 2p). DMF (1 ml) previamente enfriado en un baño de hielo, se añadió a ambos quitosanos (100 mg) en tubos Eppendorf y se dejó que la suspensión se hinchara durante 1 hora. A continuación se añadieron soluciones de 2,85 mg de fluoresceína-5-isotiocianato (FITC) o succinimidil éster de 5-(y 6-) carboxifluoresceína (NHS-fluoresceína) en 250 µl de DMF en un baño ultrasónico lleno de agua helada y sometido a tratamiento ultrasónico. Los primeros veinte minutos la temperatura en el baño se mantuvo a 0 °C y a continuación el baño se calentó a 40 °C y la reacción se llevó a cabo a esta temperatura durante 100 minutos. El contenido de los tubos se transfirió a tubos de diálisis de 12-14 kDa y se dializó contra agua. Después de 20 procedimientos de diálisis contra 100 ml de agua, se añadieron 50 mg de ácido succínico a cada tubo de diálisis, se disolvieron los quitosanos y se repitió el procedimiento de diálisis. Las soluciones resultantes se liofilizaron y posteriormente se resuspendieron para obtener soluciones al 0,25 %.

Los leucocitos murinos se incubaron con estas soluciones durante 4 horas a 37 °C, se tiñeron con colorante específico de ADN (Hoechst 33258) y se analizaron mediante microscopía de fluorescencia. El análisis de fluorescencia **(Fig. 2)** muestra que la fluorescencia verde (C) es uniforme en todo el citoplasma, indicando que el quitosano reticulado marcado con FITC está dentro de la célula y por lo tanto ha sido endocitado (la simple asociación del quitosano marcado con la membrana celular habría creado un anillo fluorescente en el límite de la célula (A). La fluorescencia

azul observada fuera del núcleo (D) puede estar provocada por el inicio de la apoptosis
Las mismas soluciones (0,25 %) de isotiocianato de fluoresceína (FITC) y 5(6)-carboxifluoresceína (FAM) marcadas se aplicaron a los ojos de ratones CBA (una gota por ojo). Después de 6 horas, los animales experimentales se sacrificaron y los ojos se fijaron en formalina, se tiñeron como se describe en Stradleigh *et al.*, 2015, Prog Retin Eye Res., 48: 181-202 y se analizaron mediante microscopía de fluorescencia. Se observa que mientras que el quitosano convencional se concentró preferentemente en la superficie de la córnea y la esclerótica **(Fig. 3A),** las nanopartículas de quitosano de la invención (fluorescencia verde brillante) penetraron profundamente en la córnea, de manera uniforme **(Fig. 3B).**

Estos datos respaldan que las nanopartículas de quitosano reticuladas de la invención serían útiles para aumentar las capacidades de penetración celular de principios activos poco penetrantes en las células (hidrófilos) o no penetrantes en las células (moléculas grandes), ya sea en ubicaciones intracelulares a través de endocitosis mediada por nanopartículas y/o posiblemente a través de las células a través de transcitosis mediada por nanopartículas.

Ejemplo 5: Biocompatibilidad de las nanopartículas de un quitosano de la invención

La biocompatibilidad de un quitosano reticulado de la invención **(Ejemplo 2i)** se evaluó en cultivos celulares *in vitro* de células madre mesenquimales (MSC) de médula ósea humana, se recogieron de donantes sanos a través de aspiración de médula ósea como se describe en Bieback *et al.*, 2008, Transfus Med Hemother., 35(4): 286-294, doi: 10.1159/000141567 con el fin de evaluar su posible influencia en el cultivo y el crecimiento de las MSC.

Las MSC se aislaron como se describe en *Bieback, et al., 2008,* citado anteriormente mediante centrifugación en gradiente de densidad de 1.077 g/ml, seguido de 2 lavados y cultivado en medio de crecimiento DMEM que contiene 10 % de suero fetal Mesecult, l-glutamina y antibióticos. La pureza del cultivo se verificó usando citometría de flujo. Las MSC cultivadas mostraron el siguiente fenotipo: CD44+/CD73+/CD90+/CD105+/CD34-/HLA-DR- con una capacidad demostrada para diferenciación condrogénica., osteogénica y adipogénica tras la adición de medios específicos como se describe en Ciuffreda *et al.*, 2016, Methods Mol Biol. 2016;1416:149-58. doi: 10.10071978-1-4939-3584-0 8. El estudio empleó células en 4 pases.

Las paredes de las placas de cultivo de 25 cm^2 se cubrieron con una película de quitosano reticulado, las placas se secaron, se lavaron dos veces con medio de crecimiento y se sembraron con células. Se sembraron de manera similar placas de cultivo no tratadas del mismo tamaño para fines de comparación. La presencia del quitosano reticulado en las paredes plásticas de las placas de cultivo no interfirió con la adhesión celular ni con el crecimiento celular. En las 3-4 horas después de la inoculación, las células se extendieron y adoptaron su característica forma fusiforme. La tasa de crecimiento fue algo más lenta en las placas tratadas con quitosano reticulado. La confluencia se alcanzó después de 48-56 horas en placas de cultivo convencionales y después de 68-76 horas en placas de cultivo tratadas con quitosano reticulado.

En conclusión, el quitosano reticulado de la invención sustenta el crecimiento y la proliferación de células madre mesenquimales de médula ósea humana, aunque con una eficiencia menor que en condiciones convencionales.

Ejemplo 6: Uso de un quitosano de la invención para aplicaciones en agricultura

La utilidad de un quitosano reticulado de la invención **(Ejemplo 2i)** se probó en semillas de trigo de primavera de la siguiente manera. Se prepararon suspensiones en agua del quitosano reticulado de la invención a dos concentraciones diferentes, las semillas se sumergieron en las suspensiones y cada experimento incluyó los siguientes grupos de semillas, dependiendo del tratamiento aplicado:

(A) Control (Sin tratamiento de semillas);
(B) Tratamiento con quitosano reticulado al 0,1 % (p/p),
(C) Tratamiento con quitosano reticulado al 0,05 % (p/p).

Evaluación de los efectos promotores del crecimiento en las fases iniciales de la organogénesis

Después de un tratamiento de 24 horas, las semillas se colocaron sobre un sustrato húmedo (filtros con una capa de algodón) en placas de Petri (12 semillas por placa, en cuadrupletes), luz natural, t = +20-22 °C. La energía de germinación se determinó como se describe en Domin *et al.*, 2020, Sustainability 2020, 12(1), 46 y se midió después de 1 y 3 días de entrar en contacto con el sustrato húmedo y la capacidad de germinación (número de semillas germinadas dividido por el número total de semillas analizadas menos las vacías) se determinó después de 7 días de entrar en contacto con el sustrato húmedo. Los indicadores de crecimiento en las etapas iniciales de organogénesis se registraron después de 3 días (longitud de las raíces de cada plántula, longitud total de las plántulas) y después de 7 días (número de raíces por plántula, longitud de las plántulas, masa total de raíces y brotes por plántula, y masa de cada raíz) después del contacto con la humedad.

Se demostró un efecto positivo del tratamiento con el quitosano reticulado de la invención a la concentración más baja, como se muestra en la **Fig. 6** para la germinación y como se resume en la **Tabla 2** a continuación para el desarrollo

de las plántulas en las fases iniciales de la organogénesis:

Tabla 2

Duración del crecimiento	Indicadores de crecimiento	A	B	C
3 días	Número de raíces por plántula	2,9	3,0	3,0
	Longitud de la raíz por plántula, cm	7,79±0,27	8,64±0,46	10,20±0,94
	Longitud de la raíz individual, cm	2,60±0,12	2,86±0,08	3,4±0,11
	Longitud del brote, cm	1,84±0,09	2,29±0,03	2,69±0,30
7 días	Número de raíces por plántula	4,41	4,68	4,83
	Longitud del brote, cm	10,05±0,75	10,11±0,69	11,27±0,26
	biomasa de raíces secada al aire, por plántula, mg	8,20±0,07	9,60±0,56	9,40±0,20
	biomasa secada al aire de 1 raíz, mg	1,86±0,02	2,06±0,15	1,95±0,08
	biomasa secada al aire de 1 plántula, mg	15,13±0,13	17,25±0,19	16,45±0,41

Se observaron tasas más altas de emergencia radicular en un día del tratamiento con quitosano reticulado. El efecto más fuerte se observó con la suspensión de baja concentración (aumento del 22,9 % con quitosano reticulado al 0,05 %; 14,6 %; aumento con quitosano reticulado al 0,1 %, con un control de valor inicial del 75 %). La misma tendencia se observó al medir la energía de germinación (aumento del 6,2 %) y la capacidad de germinación (control = 93,8 %). El tratamiento de las semillas con la suspensión de quitosano reticulado de alta concentración aumentó la capacidad de germinación en un 4,1 %. En las fases tempranas de organogénesis, el quitosano reticulado provocó un aumento en el crecimiento de las raíces. Después de 3 días, la longitud total de las raíces fue un 10,9 % y un 30,9 % mayor para los grupos de quitosano reticulado al 0,1 % y quitosano reticulado al 0,05 %, respectivamente (control = 7,79 cm). Al mismo tiempo, el aumento más uniforme se observó en el grupo de quitosano reticulado de alta concentración (quitosano reticulado al 0,1 % coeficiente de uniformidad = 81 % (n = 45); quitosano reticulado al 0,05 % = 78,2 % (n = 48); control = 68,9 % (n = 45)). La misma tendencia se observó al medir la altura de las plántulas. Si el aumento después del tratamiento con quitosano reticulado al 0,05 % (46,2 % más alto que el control = 1,84 cm) fue más significativo que después del tratamiento con quitosano reticulado al 0,1 % (24,4 % más alto que el control), el coeficiente de uniformidad fue mayor para el grupo tratado con quitosano reticulado de alta concentración (quitosano reticulado al 0,1 %=75,4 %; quitosano reticulado al 0,05 %=72,8 % control=61,7 %).

Basado en mediciones realizadas 7 días después del inicio del experimento, el tratamiento con quitosano reticulado de baja concentración mejoró al máximo la formación de raíces (quitosano reticulado al 0,05 %: aumento del 9,5 %; quitosano reticulado al 0,1 %: aumento del 6,1 %, número promedio de raíces en el grupo de control: 4,41 por plántula). Se encontró lo mismo para el aumento de la longitud total de las plántulas (quitosano reticulado al 0,05 %: aumento del 7,7 %; Control: 10,05 cm). En cambio, el mayor aumento de la biomasa se observó después del tratamiento con la suspensión de quitosano reticulado más concentrada tanto para las raíces (quitosano reticulado al 0,1 %: aumento del 17,1 %; quitosano reticulado al 0,05 %: aumento del 14,6 %) como para toda la plántula (quitosano reticulado al 0,1 %: aumento del 12,9 %; quitosano reticulado al 0,05 %: aumento del 8,7 %)

Evaluación de los efectos sobre el crecimiento y el desarrollo de plántulas de Trigo de Primavera en sustrato de tierra

Las semillas se trataron 7 días antes de la siembra (chernozem alcalino, 500 gramos por maceta de plástico/12 macetas, repetido 4 veces, iluminación natural, t = 20-22 °C, humedad del suelo controlada). Se midió la energía de germinación, la capacidad de germinación, la altura y la biomasa de las plántulas. Los parámetros de crecimiento se registraron durante los primeros 7 días. Se observó una mayor tasa de emergencia radicular después de 24 horas para las semillas tratadas con quitosano reticulado, especialmente para la concentración más alta (control: 70,8 %, aumento relativo para semillas tratadas: el 27,1 % y el 23 %). Se obtuvo un 100 % de germinación después del tratamiento con quitosano reticulado de alta concentración como se muestra en la **Tabla 3** a continuación y debajo de la **Fig. 6.**

Tabla 3

Indicadores			Grupos experimentales		
			A	B	C
Energía de germinación, %	Después de 1 día	Emergencia radicular	70,8	97,9	93,8
	Después de 2 días	Plántulas germinadas normalmente %	95,9	93,8	100
	Después de 3 días		97,9	100	83,4

(continuación)

Indicadores		Grupos experimentales		
		A	B	C
Germinación, %	Después de 7 días	93,8	100	83,4
Longitud del brote desarrollado normalmente, cm	Después de 2 días	0,71±0,05	1,11±0,05	0,85±0,03
	Después de 3 días	2,87±0,13	3,40±0,13	2,92±0,06
	Después de 7 días	18,95±0,30	20,48±0,24	19,31±0,28
biomasa secada al aire, mg	Plántula total	16,65±0,32	18,95±0,41	20,90±0,37
	Raíces, por plántula	6,93±0,14	8,53±0,23	9,33±0,22

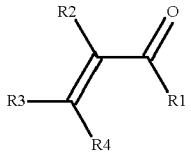
La alta tasa inicial de estimulación del crecimiento resultante del tratamiento con quitosano reticulado al 0,1 % (56,3 % después de 2 días) se redujo 3 veces después de 3 días (quitosano reticulado, 0,05 %, en 11,6 veces), y después de 7 días, en 2,3 veces. El aumento de biomasa después de 7 días en comparación con el control (16,63 mg) fue mayor tanto en el grupo tratado al 0,1 % (14 % mayor para biomasa total y 23,8 % para raíces) como en el grupo tratado al 0,05 % (25,7 % mayor para biomasa total y 35,1 % para raíces). El tratamiento con quitosano reticulado al 0,05 % produjo un aumento de 1,8 veces en la biomasa total y de 1,5 veces en la biomasa de las raíces.

En conjunto, estos datos respaldan que los tratamientos con un quitosano reticulado de la invención dieron como resultado una estimulación significativa del crecimiento en el trigo de primavera en germinación.

REIVINDICACIONES

1. Un método para la preparación de un quitosano reticulado que comprende las siguientes etapas:

a) proporcionar un quitosano y dejar que dicho quitosano se hinche en un disolvente;
b) acilar los grupos amino de dicho quitosano con un compuesto acrílico de Fórmula (I):



(I)

en donde R_1 es un halógeno o cualquier otro grupo saliente que tras su eliminación, asegura la acilación de un grupo amino tal como éster de 3-hidroxibenzotriazol, anhídrido (incluyendo anhídridos mixtos), N-hidroxisuccinimida, pentaclorofenol, ésteres de 2-nitro-4-sulfofenol y otros grupos salientes similares; R_2, R_3 y R_4 se seleccionan independientemente de H, alquilo opcionalmente sustituido (por ejemplo, alquilo C_1-C_6), alquenilo opcionalmente sustituido (por ejemplo, alquenilo C_2-C_6), alquinilo opcionalmente sustituido (por ejemplo, alquinilo C_3-C_6), cicloalquilo opcionalmente sustituido (por ejemplo, cicloalquilo C_3-C_8), cicloalquenilo opcionalmente sustituido (por ejemplo, cicloalquenilo C_4-C_8), cicloalquinilo opcionalmente sustituido (por ejemplo, cicloalquinilo C_5-C_8), heterocicloalquilo opcionalmente sustituido; arilo opcionalmente sustituido (por ejemplo, fenilo opcionalmente sustituido), heteroarilo opcionalmente sustituido y aril alquilo C_1-C_6 opcionalmente sustituido, en particular bencilo; en donde el término "sustituido" se refiere a grupos sustituidos con 1 a 5 sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en halógeno, -COOR', - NR'R'', =O, -OR', -COR', -CONR'R'', -SR', -SO_3R', -SO_2NR'R'', -SOR', -SO_2R', - NO_2 o -CN; o R_1 y R_2 o R_1 y R_3, o R_1 y R_4 juntos forman un arilo, heteroarilo, cicloalquilo o heterocicloalquilo de 4-24 miembros (por ejemplo, un arilo, heteroarilo, cicloalquilo o heterocicloalquilo de 6-24 miembros tales como un arilo, heteroarilo, cicloalquilo o heterocicloalquilo de 8-24 miembros);
c) hacer reaccionar el producto de acilación de la **etapa b)** en presencia de una base (reacción de Aza-Michael);
d) purificar el quitosano reticulado obtenido **de la etapa c)** (por ejemplo, de impurezas salinas y/o disolventes apróticos).

2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho método comprende además una **etapa e)** de secado del producto de la **etapa d).**

3. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en donde R es halógeno, en particular cloro.

4. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el compuesto acrílico se selecciona de cloruro de acriloílo y cloruro de metacriloílo.

5. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dicho método comprende además una **etapa f)** de saponificación después de la **etapa c) o d)** en condiciones alcalinas y el producto obtenido puede someterse además a al menos una secuencia de **etapas b) a c) (o d)).**

6. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la etapa a) y/o b) se lleva a cabo en un disolvente prótico y los ácidos acrílicos libres formados después de la etapa b) se lavan antes de llevar a cabo la etapa c).

7. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la etapa a) y/o b) se lleva a cabo en ausencia de agua.

8. Un método de acuerdo con la reivindicación 7 en donde la etapa c) se lleva a cabo en un disolvente aprótico o usando la base como un disolvente.

9. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde se añade una solución de un material biológicamente activo al producto resultante de la etapa b) antes de realizar la adición de Michael de acuerdo con la etapa c) para integrar el material biológicamente activo dentro del quitosano reticulado obtenido.

10. Un quitosano reticulado obtenible mediante un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 o cualquier sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

11. Una composición que comprende al menos un quitosano reticulado de acuerdo con una cualquiera de las

reivindicaciones 10 y al menos un portador.

12. Una composición de acuerdo con la reivindicación 11, en donde dicha composición es una composición farmacéutica y dicho portador es un portador farmacéuticamente aceptable o es una composición cosmética y dicho portador es un portador cosméticamente aceptable.

13. Una composición de acuerdo con la reivindicación 11, en donde dicha composición es un medio de cultivo de células o tejidos que comprende además nutrientes para células o tejidos.

14. Una composición de acuerdo con la reivindicación 11, en donde dicha composición es un tejido de reconstrucción.

15. Una composición de acuerdo con la reivindicación 11, en donde dicha composición es una composición agrícola.

16. Un relleno de tejido blando, un apósito para heridas o un tejido de reconstrucción que comprende al menos un quitosano reticulado de acuerdo con la reivindicación 10 o una composición del mismo.

17. Nanopartículas que comprenden un quitosano reticulado de acuerdo con al menos un quitosano reticulado de acuerdo con la reivindicación 10.

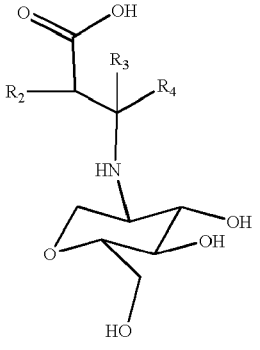
18. Un medio de cultivo para células o tejido biológico que comprende al menos un quitosano reticulado de acuerdo con la reivindicación 10.

19. Uso de quitosano reticulado de acuerdo con la reivindicación 10 para la preparación de un medio de cultivo celular o biológico o de un tejido de reconstrucción.

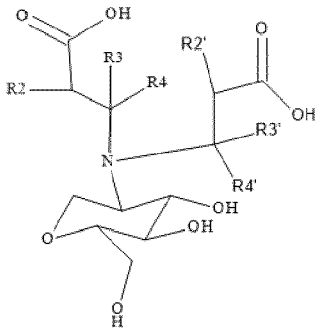
20. Un quitosano reticulado de acuerdo con la reivindicación 10 o una composición del mismo para su uso en la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad o trastorno seleccionado de afecciones cardiovasculares, tales como arritmias cardíacas, en particular fibrilación auricular e hipertensión, patologías articulares y enfermedades articulares, tales como artritis reumatoide, artrosis, espondiloartritis y eventos traumáticos que provocan daño al cartílago, hueso, daño del ligamento o de la cápsula sinovial, patologías y lesiones oculares, tales como síndrome del ojo seco, uveítis, glaucoma, lesiones corneales, trastornos del tejido conectivo, tales como lupus y polimiositis, trastornos o lesiones de la piel/membrana mucosa, tales como heridas, cicatrices, psoriasis, acné, eccema, rosácea, quemaduras de naturaleza física o química, en particular, heridas quirúrgicas y quemaduras solares, úlceras, hemorroides, enfermedades periodontales y dentales, daño dural tal como el que se produce después de una lesión accidental o una cirugía del cerebro y del sistema nervioso central, neoplasias malignas y benignas, en particular carcinomas, sarcomas, linfomas y melanomas, complicaciones postoperatorias tales como fístulas e infecciones, tumores o malformaciones vasculares.

21. Un método para identificar un quitosano reticulado obtenible mediante un método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, comprendiendo dicho método las etapas de:

- proporcionar un quitosano a **caracterizar en** un disolvente;
- acilar dicho quitosano en agitación vigorosa;
- neutralizar el medio de reacción con una base;
- evaporar los disolventes y lavar el producto neutralizado obtenido;
- someter el producto a una hidrólisis ácida a reflujo;
- evaporar la mezcla de reacción y resuspender los productos hidrolizados en un ácido débil tal como ácido acético;
- determinar la presencia o la ausencia de un producto seleccionado de un producto de acuerdo con la Fórmula **(IIIa)** o de acuerdo con la Fórmula **(IIIb)**



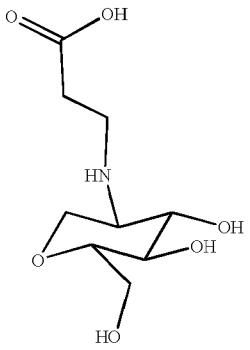
(IIIa);



(IIIb);

en donde R_2 y R_4 son como se definen en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, $R_{2'}$ a $R_{4'}$ se definen respectivamente como R_2 a R_4 en cualquiera de las reivindicaciones anteriores y en donde la presencia de un producto tal de Fórmula **(IIIa)** y/o **(IIIb)** es indicativa de quitosano reticulado obtenido mediante un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.

22. Un método de acuerdo con la reivindicación 21, en donde la presencia o ausencia de un producto de acuerdo con la Fórmula (III), en particular de Fórmula (II)



(II)

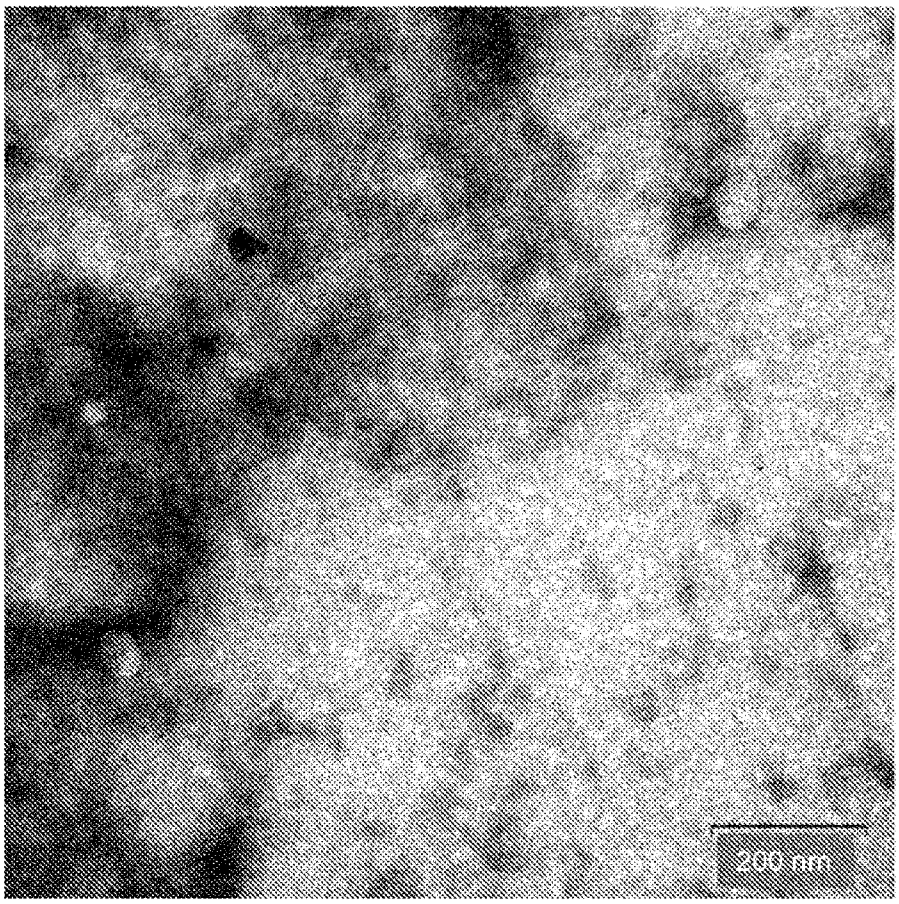
se lleva a cabo mediante análisis por electropulverización con espectrometría de masas.

23. Un método de acuerdo con la reivindicación 22, en donde un patrón de espectro de masas que comprende un máximo con m/z = 252,077 ± 0,01 iones positivos de electropulverización con espectrometría de masas es indicativo de la presencia de un quitosano reticulado obtenible mediante un método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.

24. Un método para la preparación de un sistema de suministro de fármacos para un agente bioactivo, comprendiendo dicho método las etapas de:

- Proporcionar un quitosano reticulado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 o 23 en estado húmedo o seco;
- Proporcionar un-agente bioactivo a suministrar;
- Disolver el agente bioactivo en un disolvente o un fluido supercrítico;
- Cargar las nanopartículas de dicho quitosano reticulado de la invención bien impregnando el quitosano reticulado con la solución de un agente bioactivo o bien mediante introducción directa en las nanopartículas mediante electroforesis o aceleración por un campo eléctrico;
- Recoger la composición o nanopartículas obtenidas de esta manera cargadas con agente bioactivo (por ejemplo fármaco).

A



B1

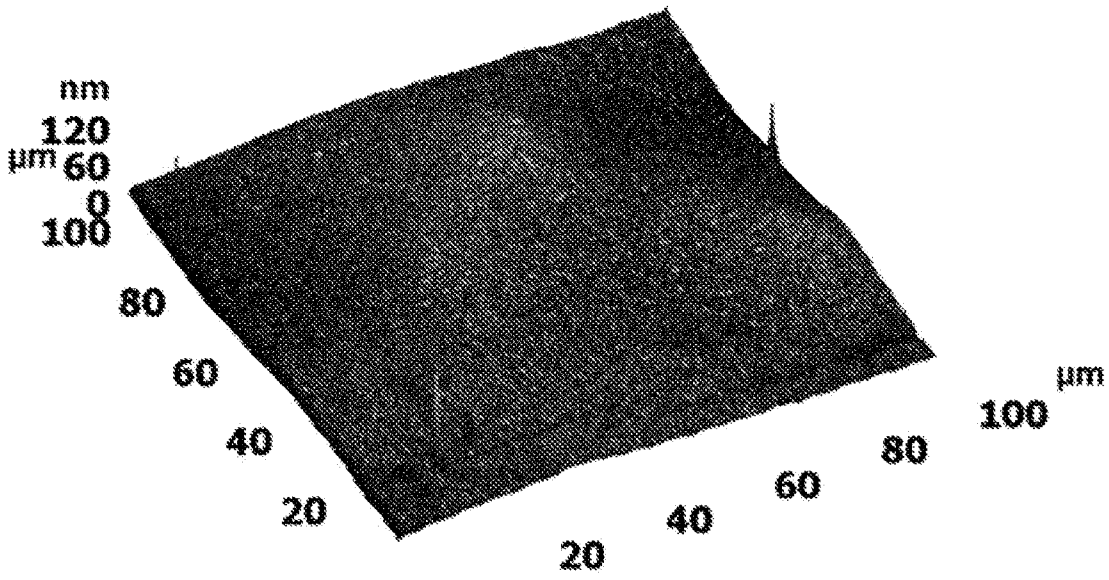


Figura 1

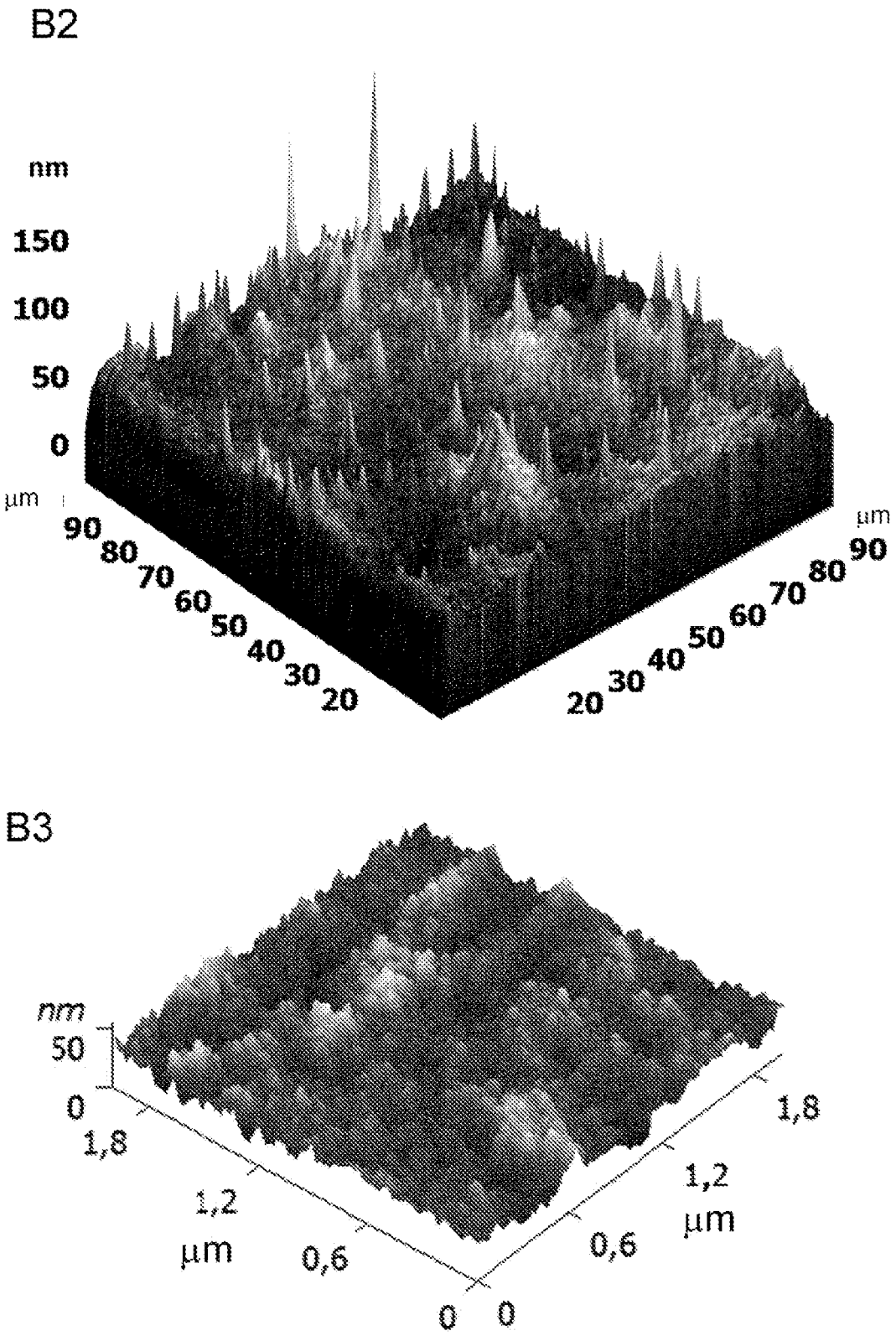


Figura 1 (continuación)

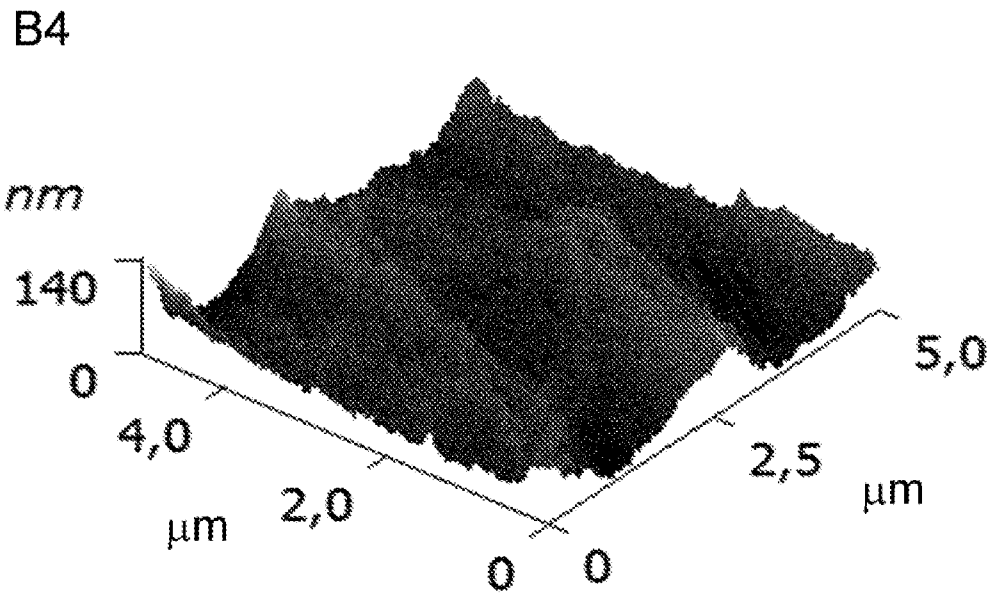


Figura 1 (continuación)

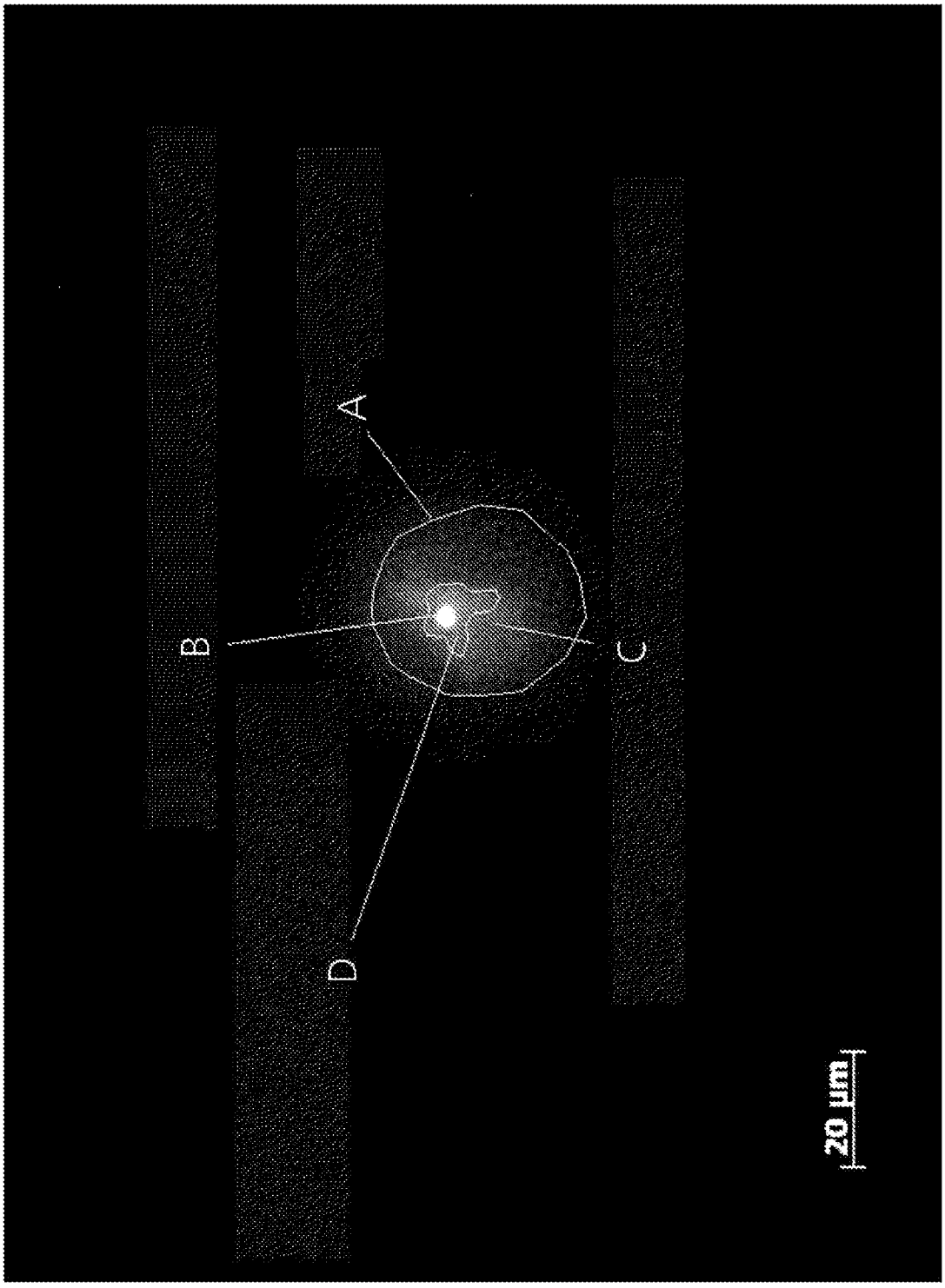
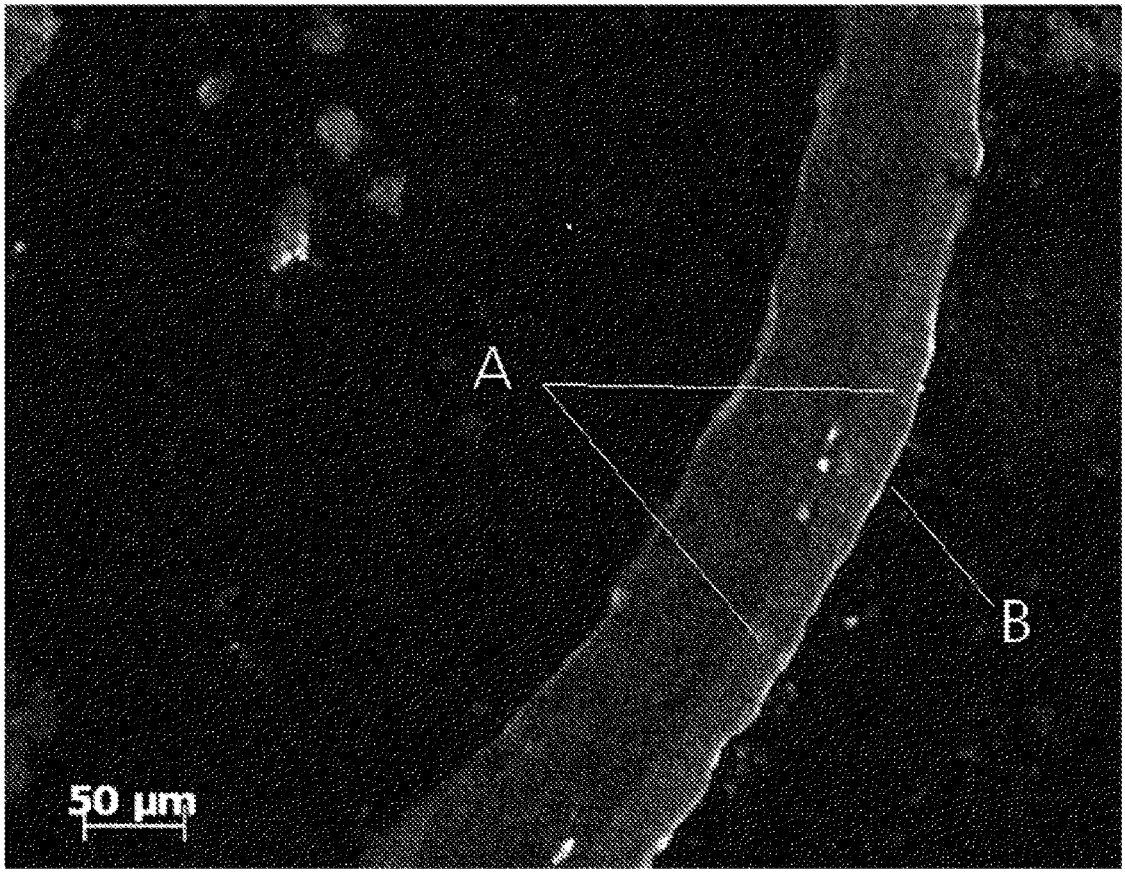


Figura 2

A



B

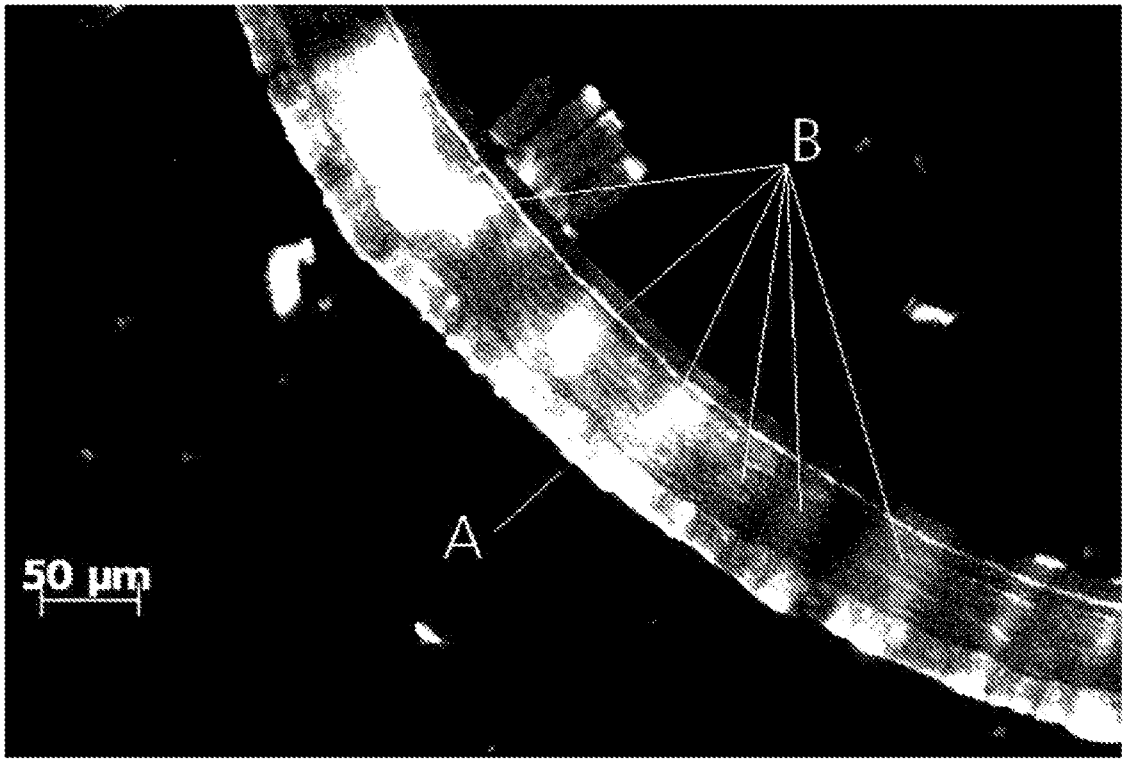


Figura 3

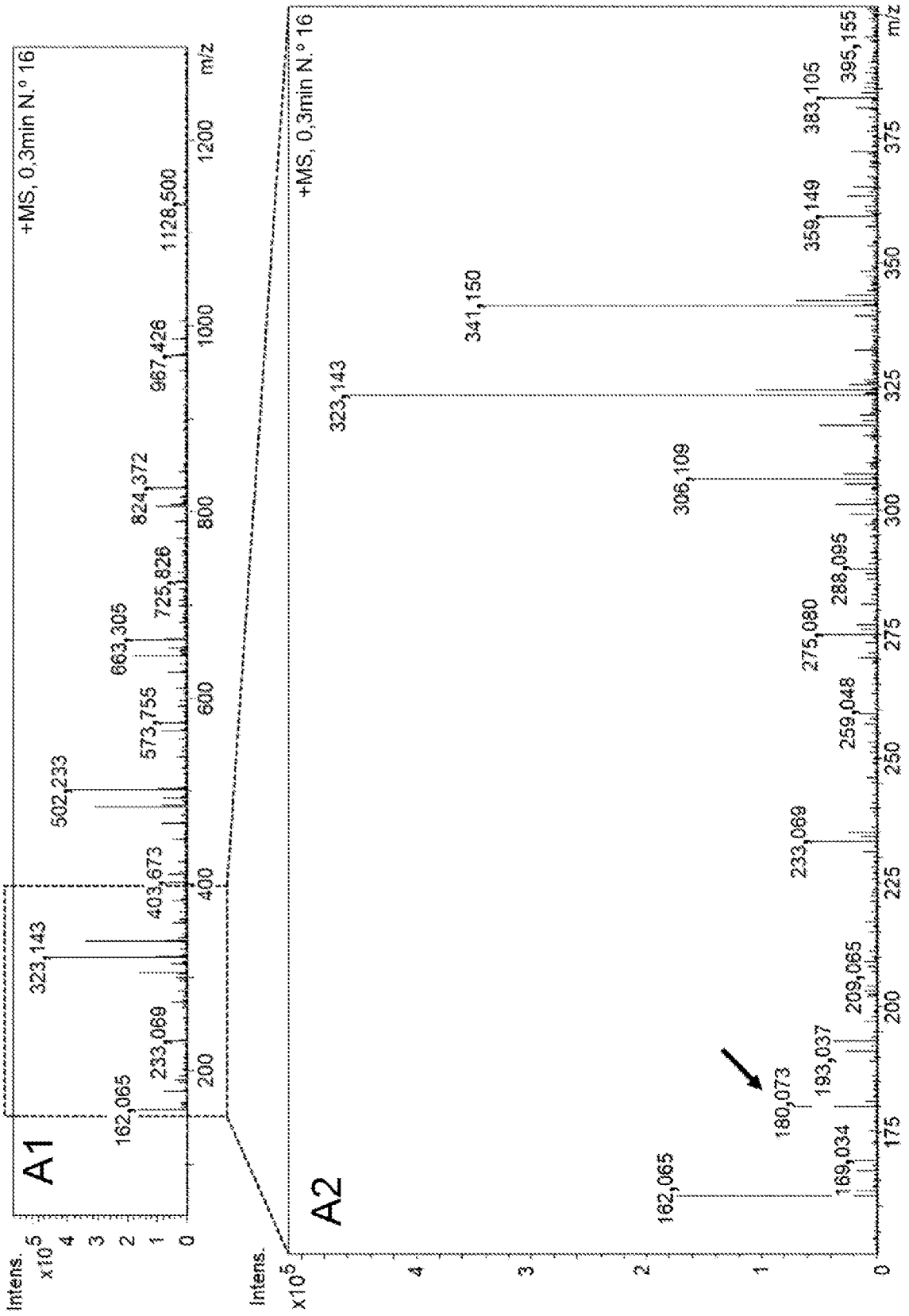

A1
+MS, 0,3min N.° 16
Intens.
x10^5
m/z
162,065
233,068
323,143
403,673
502,233
573,755
663,305
725,826
824,372
967,426
1128,500
A2
+MS, 0,3min N.° 16
Intens.
x10^5
m/z
162,065
169,034
180,073
193,037
209,065
233,069
259,048
275,080
288,095
306,109
323,143
341,150
359,149
383,105
395,155

Figura 4

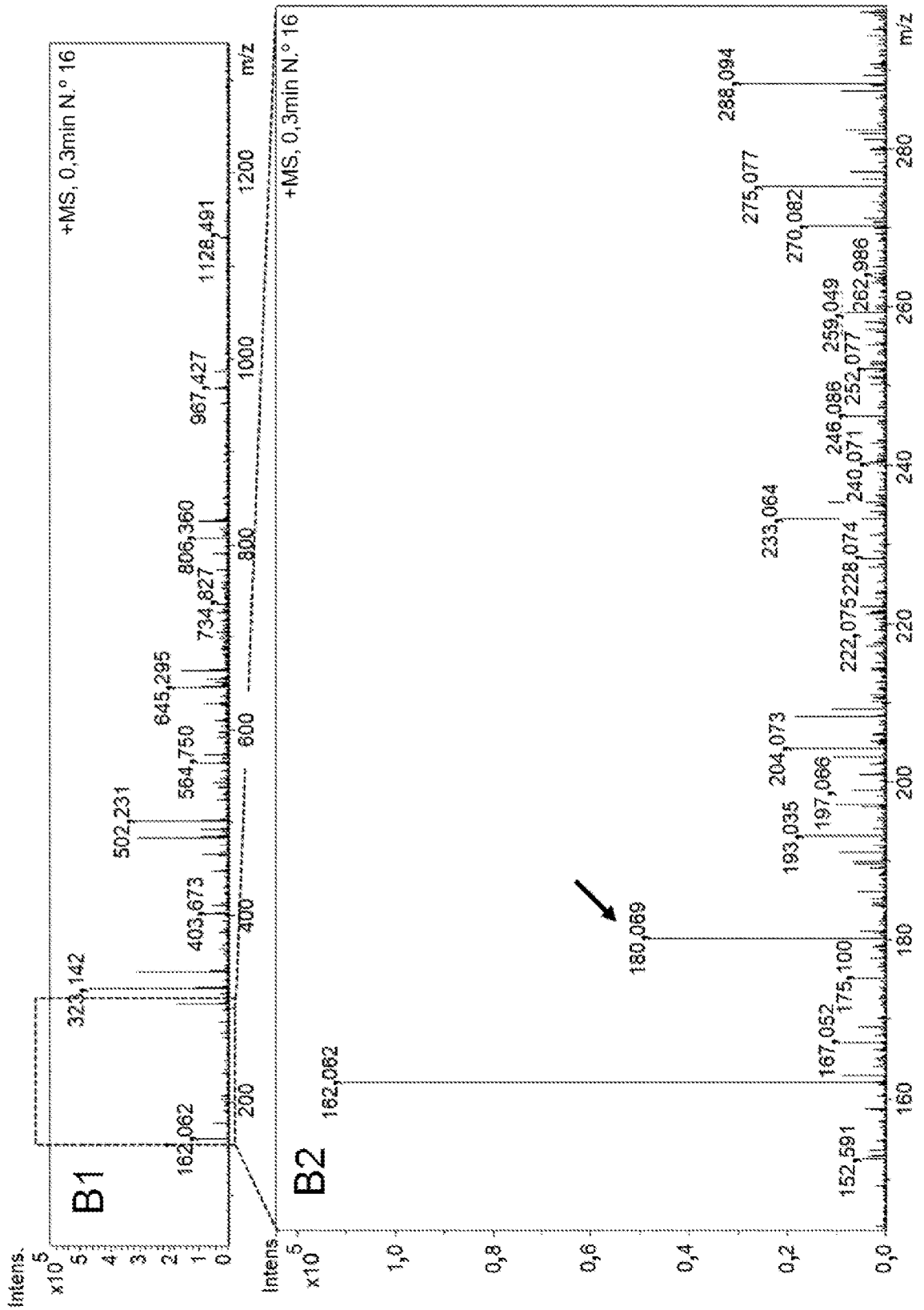


Figura 4 (continuación)

A

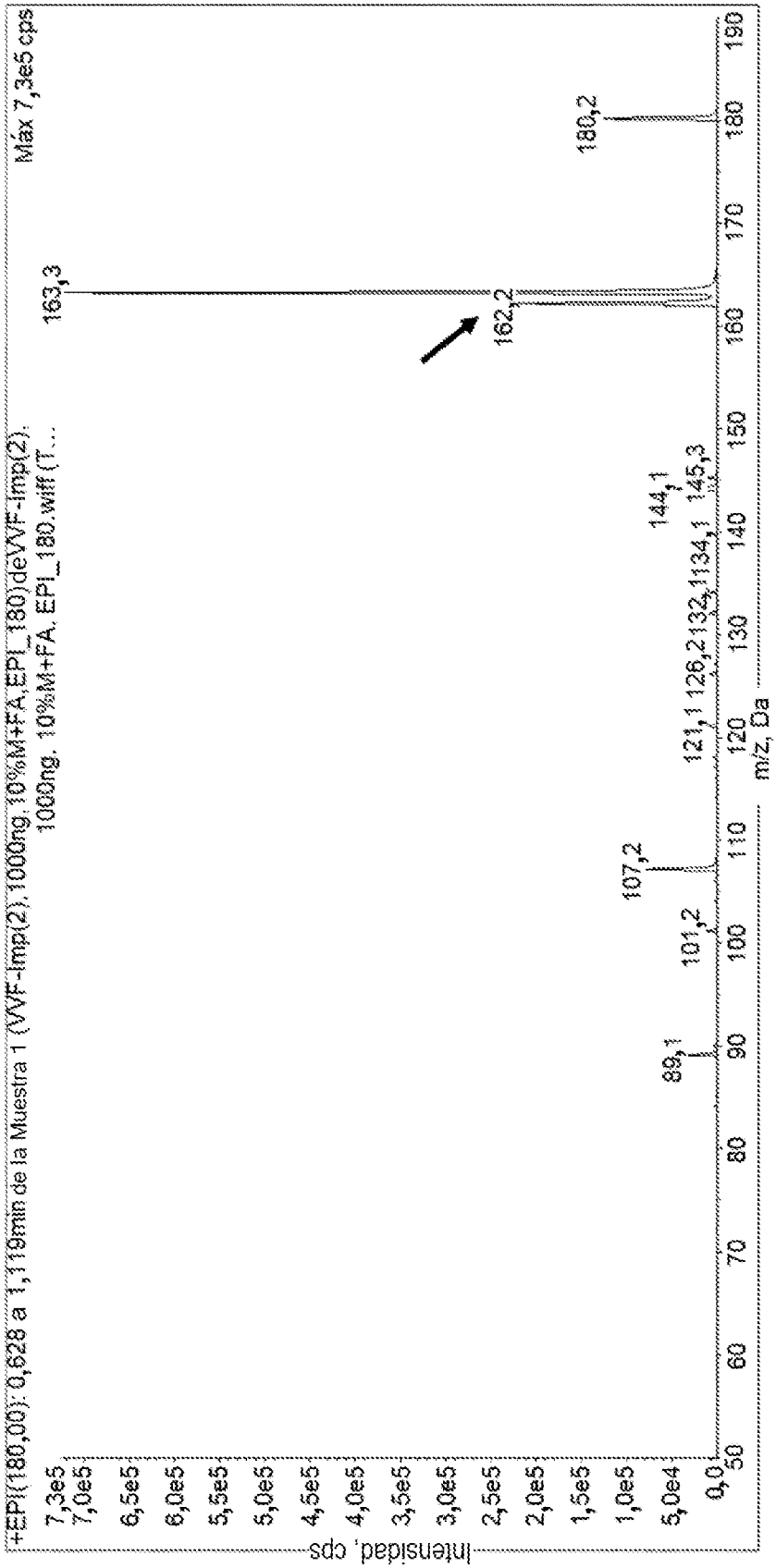

+EPI(180,00): 0,628 a 1,119min de la Muestra 1 (VVF-imp(2),1000ng,10%M+FA,EPI_180)deVVF-imp(2).
1000ng. 10%M+FA. EPI_180.wiff (T...
Máx 7,3e5 cps
Intensidad, cps
m/z, Da
163,3
162,2
180,2
144,1
145,3
121,1
126,2
132,1
134,1
107,2
101,2
89,1

Figura 5

B

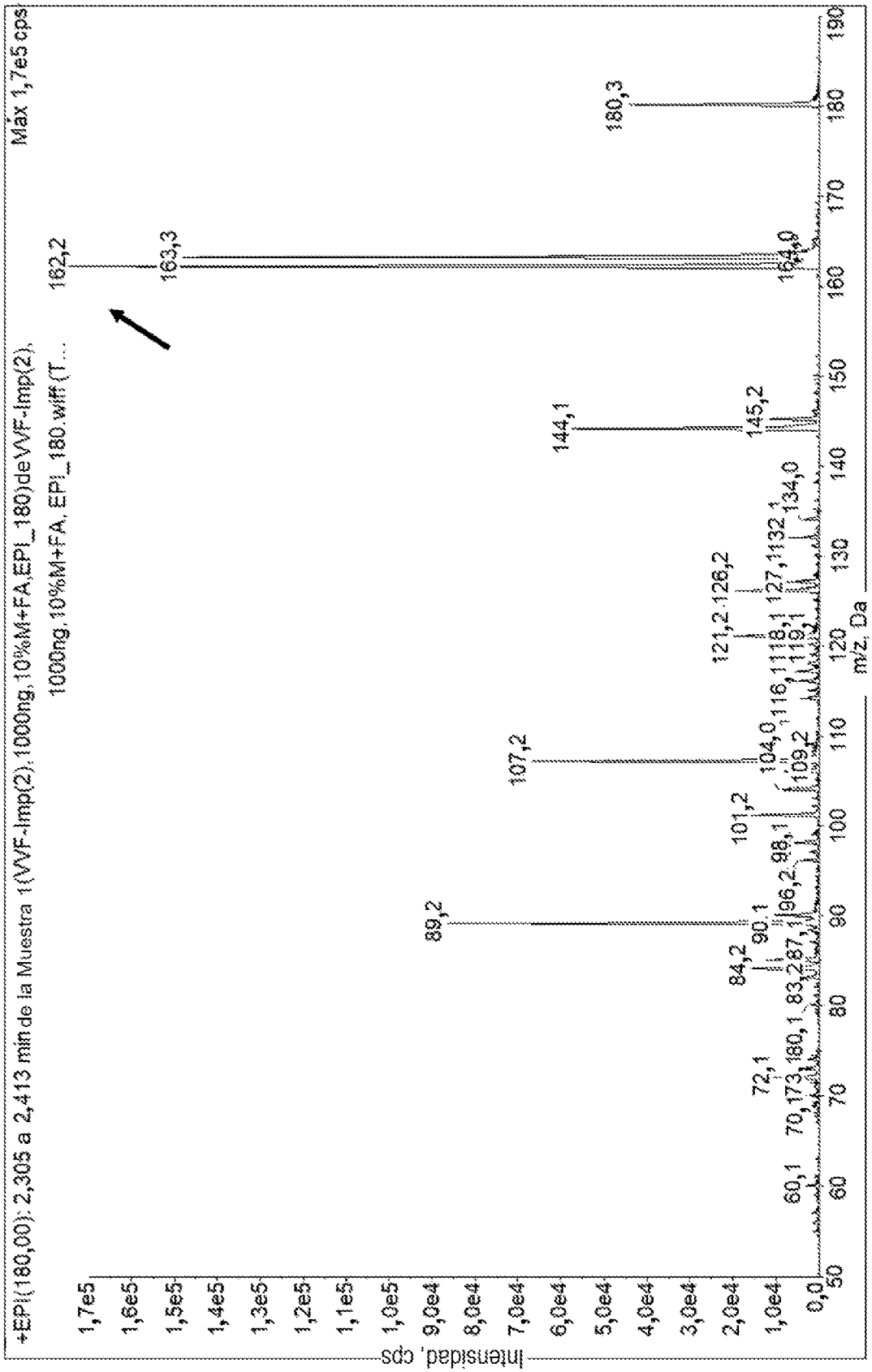


Figura 5 (continuación)

C

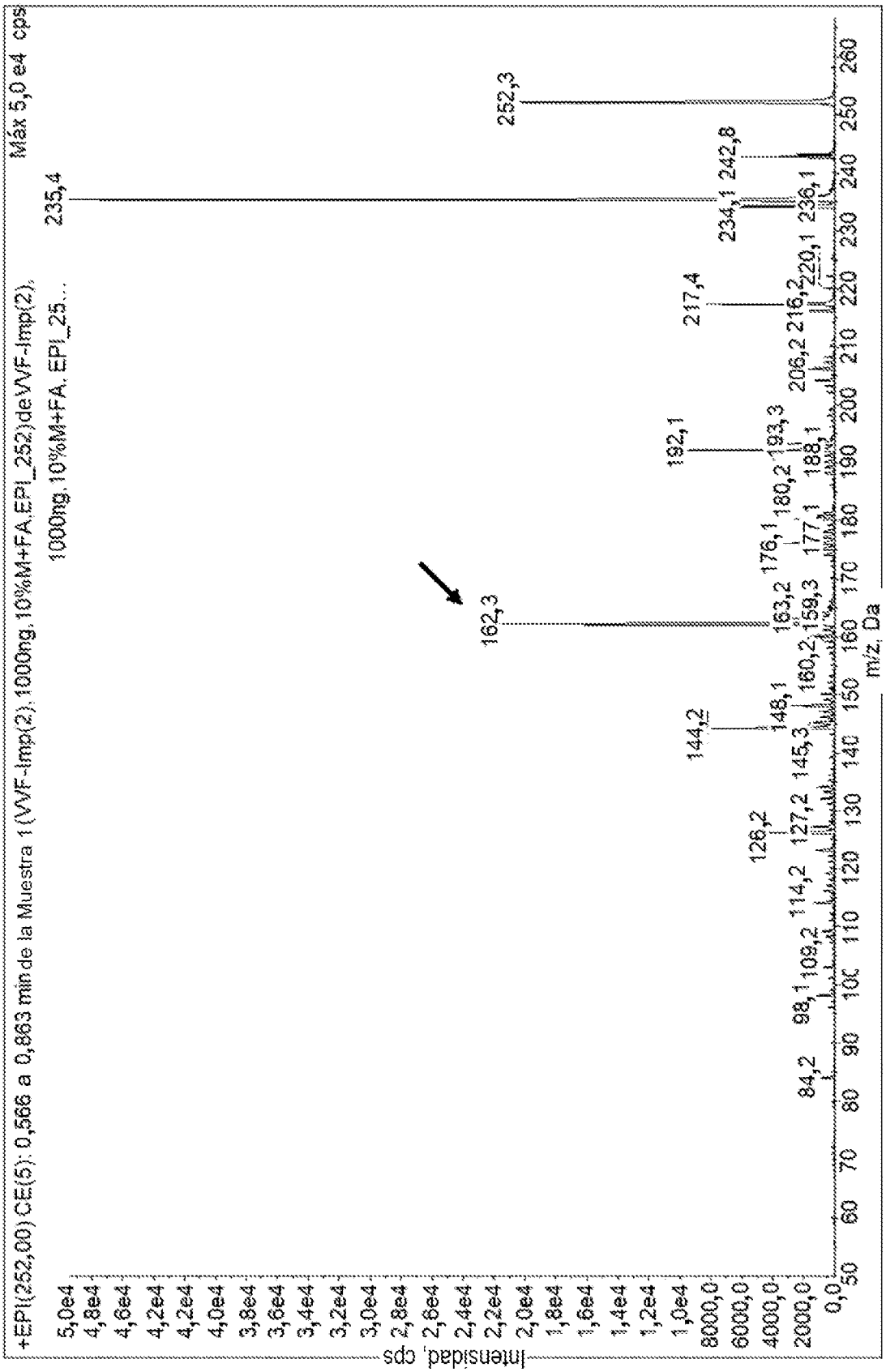


Figura 5 (continuación)

D

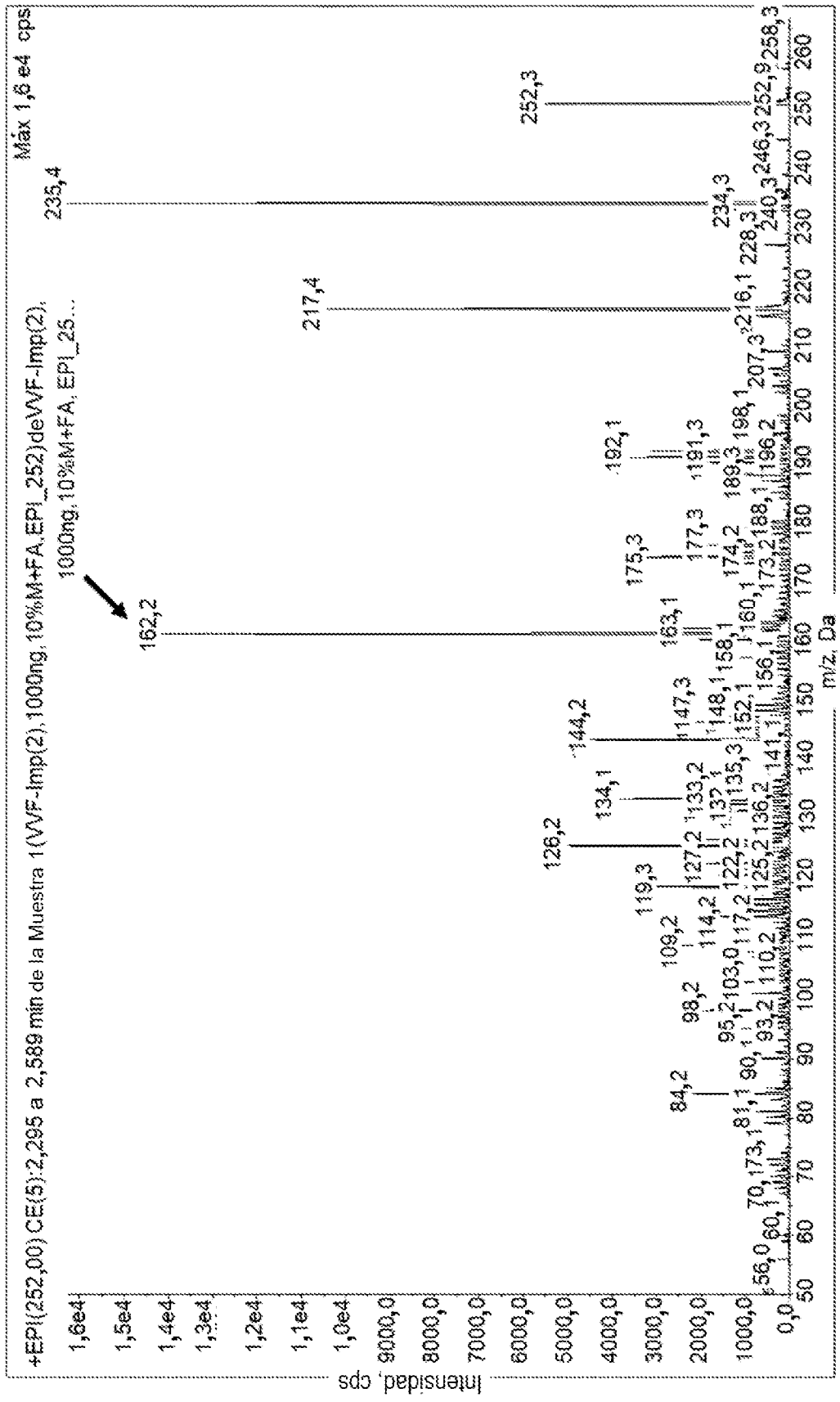


Figura 5 (continuación)

E

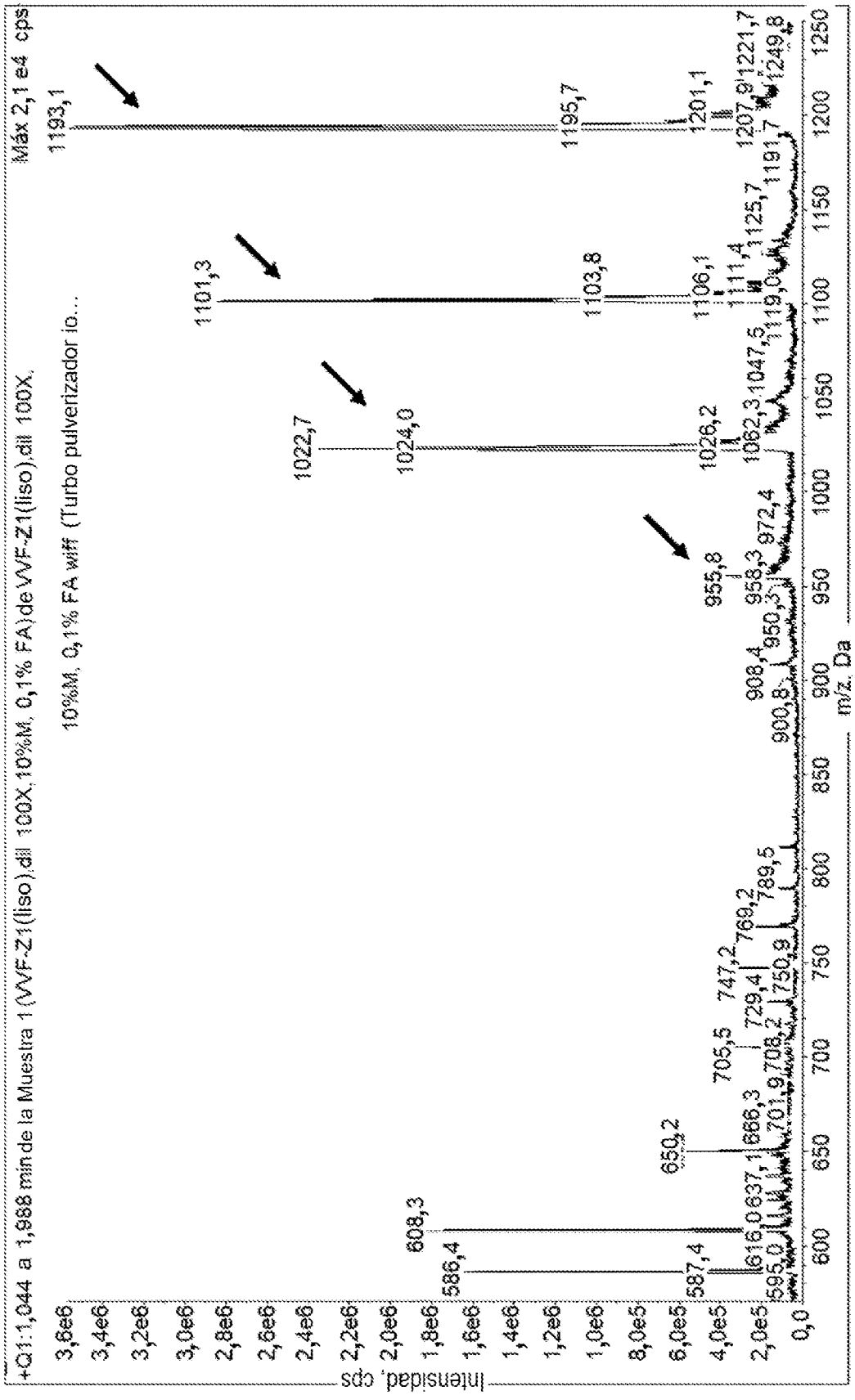
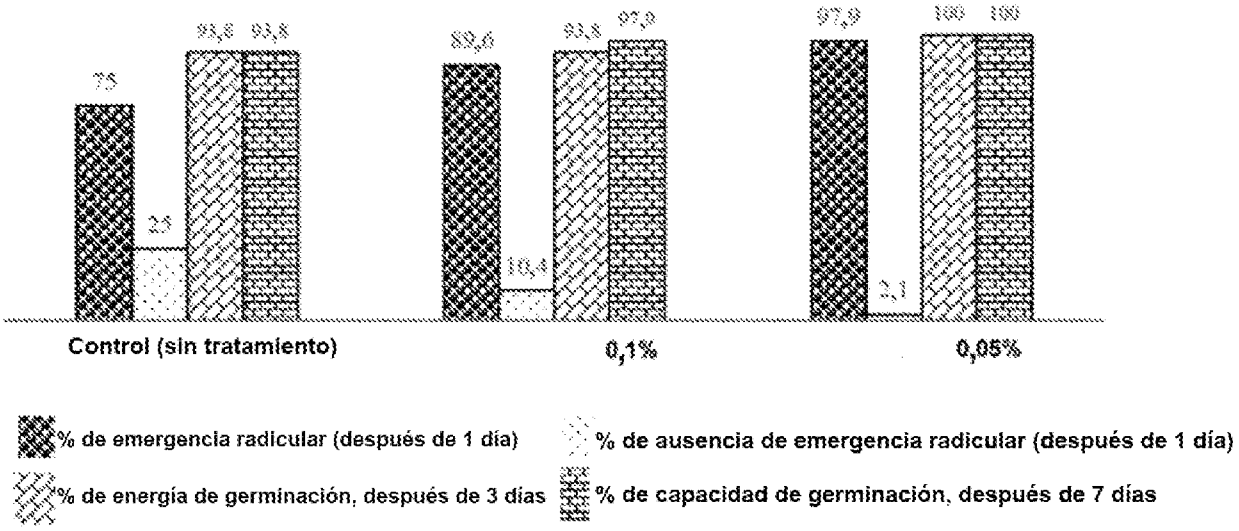


Figura 5 (continuación)

A


75
25
93,8
93,8
82,6
10,4
93,8
97,9
97,9
2,1
100
100
Control (sin tratamiento)
0,1%
0,05%
% de emergencia radicular (después de 1 día)
% de ausencia de emergencia radicular (después de 1 día)
% de energía de germinación, después de 3 días
% de capacidad de germinación, después de 7 días

B

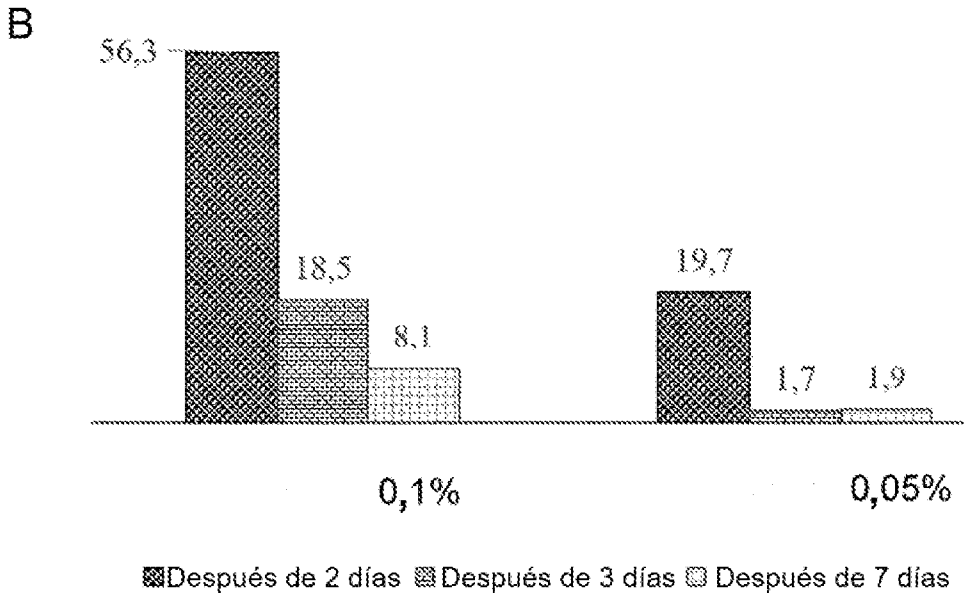

56,3
18,5
8,1
19,7
1,7
1,9
0,1%
0,05%
Después de 2 días
Después de 3 días
Después de 7 días

Figura 6