

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 428 376**

51 Int. Cl.:

C08B 37/08 (2006.01)

A61K 31/726 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.03.2007 E 07713305 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.07.2013 EP 1991587**

54 Título: **Derivados hidrazido de ácido hialurónico**

30 Prioridad:

07.03.2006 US 779423 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.11.2013

73 Titular/es:

PROCHON BIOTECH LTD. (50.0%)
P.O. Box 4082
Ness-Ziona, 70400, IL y
BIO-TECHNOLOGY GENERAL (ISRAEL) LTD.
(50.0%)

72 Inventor/es:

AMIT, BOAZ;
WORTZEL, AVRAHAM y
YAYON, AVNER

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 428 376 T3

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

DESCRIPCIÓN

Derivados hidrazido de ácido hialurónico

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a derivados de ácido hialurónico modificados químicamente que contienen grupos hidrazido unidos directamente y a sus derivados marcados. La invención además se refiere a métodos para la preparación de dichos derivados de HA.

Antecedentes de la invención

Los glucosaminoglucanos (GAGs) que son parte de la matriz extra celular (ECM) se pueden modificar químicamente y se pueden adaptar para uso médico.

10 El ácido hialurónico (HA), que es el único GAG no sulfatado conocido, es un componente ubicuo de ECM de todos los tejidos conectivos. Es un polisacárido formado por una unidad de repetición de disacárido. Los componentes de la unidad de disacárido son N-acetil-D-glucosamina y ácido D-glucurónico unidos por medio de enlaces β 1-4 y β 1-3. HA tiene un intervalo de masas moleculares que ocurren de forma natural desde varios miles a más de 10 millones de Dalton.

15 Debido a sus propiedades fisicoquímicas únicas, se ha implicado a HA en la homeostasis de agua de tejidos, en la regulación de la permeabilidad de otras sustancias y en la lubricación de articulaciones. HA se une específicamente a proteínas en el ECM y en la superficie celular. Estas interacciones son importantes a la hora de estabilizar la matriz cartilaginosa, en la motilidad celular, proliferación celular, cicatrización de heridas, inflamación así como también en las metástasis cancerígenas (Morra, Biomacromolecules 6:1205-1223, 2005; Vercruysse y Prestwich, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems 15(5):513-555,1998; Entwistle et al., J.Cell. Biochem. 61: 569-577, 1996). La naturaleza viscoelástica única de HA junto con su biocompatibilidad y carácter no inmunógeno ha conducido a su uso en un número de aplicaciones clínicas, que incluyen: tratamiento de osteoartritis de rodilla, adyuvante quirúrgico en cirugía ocular, y cicatrización y regeneración de heridas quirúrgicas (Goldberg y Buckwalter, Osteoarthritis Cartilage 13(3): 216-224, 2005; Brown y Jone, J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. 19(3): 308-318, 2005).

Se ha propuesto una variedad de modificaciones químicas de HA nativo para mejorar sus propiedades mecánicas y químicas. Las dianas principales para las modificaciones químicas de HA son las funciones hidroxilo y carboxilo.

30 Las modificaciones por medio de la función hidroxilo se usan principalmente para la preparación de HA reticulado por medio de reacción con agentes de reticulación bifuncionales, por ejemplo divinil sulfona y éteres de diglucídilo (patentes de EE.UU. Nos. 4.582.865 y 4.713.448).

Las modificaciones de las funcionales carboxílicas se usan principalmente para introducir funcionalidades colgantes que permitan además la unión de fármacos y reactivos bioquímicos (Li et al., Biomacromolecules 5:895-902, 2004; Shu et al., J. Biomed. Mater. Res. 68A:365-375,2004). También se pueden usar las modificaciones de los grupos carboxílicos para obtener productos reticulados (Bulpitt y Aeschlimann, J. Biomed. Matter. Res. 47:152-169, 1999).

35 Estas modificaciones se llevan a cabo usando hidrazidas o aminas. La activación de las funciones carboxílicas de HA hacia el ataque nucleófilo por parte de hidrazidas o aminas, en medio acuoso, se lleva a cabo principalmente por medio del uso de carbodiimidias solubles en agua, especialmente 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida (EDC). Los dos procedimientos principales para llevar a cabo esta activación se conocen en la técnica. El primero fue desarrollado por Prestwich et al y se describe en el documento US 5.616.568, documento US 5.874.417 (Prestwich et al., J. Controlled Release 53:93-103, 1998, y Pouyani y Prestwich, Bioconjugate Chem. 5:339-347, 1994). De acuerdo con este procedimiento, se hace reaccionar HA con EDC en condiciones moderadamente ácidas (por ejemplo pH 4,75) para producir un intermedio de O-acilisourea inestable activo. Las hidrazidas que tienen un pKa bajo de 3-4 y conservan su carácter nucleófilo a pH 4,75, reaccionan eficazmente con el intermedio de O-acilisourea para producir derivados de hidrazida de los residuos de ácido glucurónico. Por el contrario, las aminas primarias que no son nucleófilas a este pH fallaron a la hora de reaccionar con el intermedio activo que finalmente se reordena para dar un derivado de N-acilurea estable.

El uso de compuesto de dihidrazida tal como dihidrazida adípica (ADH) proporcionó derivados de fórmula HA-CO-NH-NH-CO-(CH₂)₄-CO-NH-NH₂ (HA-ADH) que tenían múltiples grupos hidrazido colgantes para la posterior derivatización con fármacos, sondas bioquímicas y reactivos de reticulación.

50 Las últimas publicaciones han demostrado la conjugación del fármaco antitumoral Tuxol al derivado HA-ADH (Luo y Prestwich, Bioconjugate Chem. 10:755-763,1999) y la preparación de películas de hidrogel como apósito bio-interactivo para la cicatrización de heridas a partir de un derivado de HA-ADH reticulado con poli(etilenglicol)propionaldehído (Kirker et al., Biomaterials 23:3661-3671,2002).

Se ha desarrollado un segundo procedimiento para la activación de las funciones carboxílicas de HA por parte de

Bulpitt y Aeschlimann (J. Biomed. Mater. Res. 47:152-169, 1999) y el documento US 6.630.457. De acuerdo con este procedimiento, se hace reaccionar HA a pH 6,8 con una combinación de EDC y el aditivo 1-hidroxibenzotriazol (HOBt). Inicialmente, la carbodiimida y el anión de carboxilato reaccionan para producir un intermedio de O-acilisourea, que posteriormente reacciona con el aditivo para formar un éster activo más resistente a la hidrólisis y no apto para reordenamiento. Este éster activo reacciona fácilmente con hidrazidas así como también con determinadas aminas (que están presentes en forma no protonada a pH de aproximadamente 5,5-7,0). El uso de este procedimiento permite la formación de derivados de HA con hidrazido colgante, amino así como también otros grupos funcionales.

Los métodos anteriormente mencionados para la introducción de grupos hidrazido colgantes con hidrazida adípica (ADH) introducen una entidad de enlace no natural en el ácido hialurónico. El uso de dichos derivados para aplicaciones clínicas introduce inherentemente estas entidades de enlace no naturales en el organismo (humano) lo que puede conducir a complicaciones inesperadas. Por tanto, resulta altamente deseable evitar el uso de dichos restos de agente de enlace. La presente invención proporciona una forma de introducir grupos hidrazido en HA al tiempo que evita el uso conjunto de agentes de enlace, evitando de este modo las posibles complicaciones indicadas anteriormente.

El documento WO 02006001046 se refiere a nuevos hidrogeles de ácido hialurónico y alfa, beta-poliaspartilhidrazida, y las aplicaciones de dichos hidrogeles en los campos biomédico y farmacéutico.

El documento WO 0241877 se refiere a microesferas que comprenden derivados de hidrazida de hialuronato de sodio y a un método para preparar dichas microesferas.

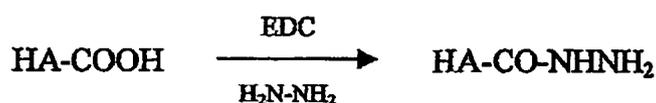
20 Sumario de la invención

Se ha comprobado, de acuerdo con la presente invención, que la propia hidrazina puede reaccionar con ácido hialurónico en presencia de una carbodiimida, dando como resultado de este modo compuestos en los cuales los grupos carboxilo de la molécula de HA están directamente modificados hasta grupos hidrazido.

La presente invención se refiere de este modo, en un aspecto, a un derivado de ácido hialurónico o una de sus sales, teniendo dicho derivado una parte de los grupos carboxi de los residuos de ácido D-glucurónico convertidos en grupos hidrazido, en el que dicho derivado de ácido hialurónico es un compuesto no reticulado y soluble en agua representado por medio de la fórmula HA-CO-NH-NH₂.

La presente invención se refiere además a un método para convertir grupos carboxílicos de HA en funciones hidrazido que usan hidrazina de acuerdo con la reacción general descrita en el Esquema 1.

30 Esquema 1:



De este modo, los derivados de hidrazido HA de la presente invención difieren de las hidrazidas HA descritas previamente en la técnica en que tienen los grupos hidrazido CO-NH-NH₂ directamente unidos a los residuos de ácido hialurónico de la cadena principal de ácido hialurónico y no por medio de un espaciador.

35 De acuerdo con la presente invención, se puede determinar la generación de un HA reticulado, insoluble en agua o soluble en agua, modificado con hidrazido por medio del pH de la reacción. Además, el pH de la reacción determina la cantidad de grupos hidrazido en la molécula de HA soluble en agua modificada con hidrazido.

Cuando la reacción se lleva a cabo en condiciones ácidas (pH 3,0-5,5) se obtiene un producto reticulado, insoluble en agua y de tipo gelatina, que tiene una cantidad estimada de 5-10 % de grupos hidrazido. Cuando se lleva a cabo la reacción en condiciones ligeramente ácidas o ligeramente básicas (pH 6,0-7,5), se obtiene una molécula de HA soluble que tiene hasta 3 % de grupos hidrazido.

En una realización preferida de la invención, se lleva a cabo la reacción en un intervalo de pH de aproximadamente 5,6 a aproximadamente 7,5 dando lugar a un HA funcionalizado hidrazido soluble en agua. En la realización más preferida, la reacción se lleva a cabo a pH 5,7-5,9, en el que la reacción tiene como resultado una molécula de HA soluble en agua que tienen 11-20 % de grupos hidrazido.

El derivado de HA-CO-NH-NH₂ no reticulado y soluble en agua modificado químicamente de la invención se puede acoplar, a través del resto de amina de los grupos hidrazido, a componentes adicionales tales como materiales biocompatibles, marcadores detectables, y materiales biológicamente activos, por ejemplo, fármacos y agentes bioactivos.

50 En una realización, el resto de amina del grupo hidrazido se une covalentemente a un marcador detectable que

contiene un grupo específico de amina o reactivo de amina. Los marcadores detectables apropiados para este fin incluyen por ejemplo: un marcador fluorescente, un marcador fosforescente, un radio-marcador, un marcador de afinidad, un marcador de resonancia de espín electrónico (ESR), nanopartículas detectables tales como por ejemplo nanopartículas de oro y de semiconductor, oligonucleótidos, polinucleótidos, anticuerpos, enzimas, perlas poliméricas.

De este modo, debe entenderse que las composiciones que comprenden un fármaco o un agente bioactivo se pueden conjugar bien químicamente hasta el HA funcionalizado con hidrazido o bien se quedan sin conjugar. Las composiciones de HA de la presente invención que comprenden sustancias farmacéuticas u otros restos bioactivos son particularmente útiles como formulaciones de liberación prolongada, liberación controlada o liberación lenta de los agentes activos.

Descripción detallada de la invención

La técnica anterior describe derivados de HA que contienen grupos hidrazido colgantes unidos a las funciones carboxílicas a través de un agente de enlace. No obstante, no existe divulgación de HA funcionalizado con hidrazido en el que los grupos carboxílicos se conviertan directamente en funciones hidrazido.

Se conocen dos métodos predominantes para la introducción de grupos hidrazido colgantes en los sitios de ácido glucurónico de HA. El primer método de Prestwich et al., (Bioconjugate Chem. 5:339-347, 1994) comprende la reacción de HA con EDC a pH 4,75 para producir un intermedio de O-acilisourea inestable activo que posteriormente reacciona con hidrazidas que tienen valores de pKa de 3-4 que conservan su carácter nucleófilo a pH 4,75.

Bulpitt et al. (J. Biomed. Mater. Res. 47:152-169, 1999) activaron las funciones carboxi de HA con EDC en presencia de 1-hidroxibenzotriazol (1-HOBt) a pH 6,8 o sulfo-N-hidroxisuccinimida (sulfo-NHS) a pH 7,5, seguido de la reacción con determinadas hidrazidas y aminas que todavía son nucleófilas (no protonadas) en estas condiciones.

Los intentos para usar los métodos anteriormente mencionados para hacer reaccionar funciones carboxi de HA con hidrazina resultaron insatisfactorios, el método de Prestwich et al condujo a un producto funcionalizado con hidrazido reticulado e insoluble en agua. El procedimiento de Bulpitt proporcionó derivados hidrazido solubles en agua pero la cantidad de funciones hidrazido no superó 3 %.

Sorprendentemente, ahora se ha comprobado que la reacción de HA con hidrazina y una carbodiimida a pH 5,7-5,9 conduce a derivados hidrazido solubles en agua que tienen hasta 20 % de funciones hidrazido. Esto representa un aumento dramático de la cantidad de funciones hidrazido en comparación con las que se obtienen a un intervalo de pH de 6,0-7,5.

Como se ha descrito anteriormente, cuando se lleva a cabo la derivatización de HA con hidrazina en condiciones ácidas (pH 3,5-5,5), el HA funcionalizado con hidrazido se obtiene siempre en forma de producto insoluble en agua. No obstante se comprobó que se pudo obtener HA funcionalizado con hidrazido soluble en agua en las mismas condiciones ácidas con la condición de que parte de las funciones carboxílicas se modifiquen antes de la reacción de derivatización con hidrazina. Se obtuvo dicha modificación haciendo reaccionar HA con EDC, dando como resultado la conversión de parte de los grupos carboxi de HA para dar lugar a grupos de N-acilurea.

Por tanto, la presente invención se refiere a derivados de ácido hialurónico o sus sales, que tienen parte de los grupos carboxi de los residuos D-glucurónicos modificados para dar lugar a grupos hidrazido, en el que dicho derivado de ácido hialurónico es un compuesto soluble en agua no reticulado representado por medio de la fórmula HA-CO-NH-NH₂.

El derivado de ácido hialurónico resultante puede contener entre 2 % y 70 % de grupos hidrazido, preferentemente no menos de 10 %.

En otra realización, el resto de amina de los grupos hidrazido del compuesto soluble en agua no reticulado representado por medio de HA-CO-NH-NH₂ se acopla covalentemente a un marcador detectable que contiene un resto específico de amina o reactivo de amina. Dicha marcador está seleccionado entre la siguiente lista (no limitante):

Marcadores fluorescentes, en los que los restos fluorescentes incluyen, pero no se limitan a: fluoresceína, carboxifluoresceína, diclorotriazina de fluoresceína (5-DTAF), naftofluoresceína, rodamina, Verde de rodamina, tetrametil rodamina, Rojo de Texas, perileno, pireno, antraceno, naftaleno (por ejemplo, dansilo), estilbena, (bis)-benzoxazol, derivados de cumarina (por ejemplo, derivados de Alexa Fluor®), derivados de BODIPY®, piridiloxazoles, dixogenina, fenoxazina, triarilmetanos, xanteno, flavina, porfirina, cianina, naftocianina, complejos-lantánidos, complejos de metales de transición, microesferas excitables con luz UV, proteína fluorescente verde.

Marcadores fosforescentes en los que los restos fosforescentes incluyen, pero no se limitan a: Eosina, Eritrosinas, luciferina, lumazina, complejos de lantánidos, complejos de metales de transición,

Radiomarcadores que comprenden moléculas o complejos en los que el resto de radionucleido incluye, pero no se

limita a: ¹⁰B, ¹²³I, ¹²⁴I, ¹²⁵I, ¹³¹I, ⁷⁶Br, ⁷⁷Br, ³⁵Cl, ¹⁸F, ³H, ¹¹C, ¹⁴C, ¹³N, ¹⁸O, ¹⁵O, ³²P, ³⁵S, ⁴⁶Sc, ⁵¹Cr, ⁵²Fe, ^{52m}Mn, ⁵⁷Co, ⁶¹Cu, ⁶⁴Cu, ⁶⁷Cu, ⁶⁷Ga, ⁶⁸Ga, ⁷²As, ⁸⁵Sr, ⁸⁶Y, ⁹⁰Y, ⁹⁵Nb, ⁹⁷Ru, ^{99m}Tc, ¹⁰³Ru, ¹⁰⁵Rh, ¹⁰⁹Cd, ¹¹¹In, ^{113m}In, ¹¹³Sn, ¹¹⁴In, ¹³³Xe, ¹⁴⁰La, ¹⁴¹Ce, ¹⁵³Gd, ¹⁵³Sm, ¹⁵⁷Gd, ¹⁶¹Tb, ¹⁶⁶Dy, ¹⁶⁶Ho, ¹⁶⁹Er, ¹⁶⁹Yb, ¹⁷⁵Yb, ¹⁷⁷Lu, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ²⁰³Pb, ²¹²Bi, ²²⁵Ac.

Marcadores de afinidad tales como biotina y anticuerpos.

- 5 Marcadores de Resonancia de Espín Electrónico (ESR): radicales de nitroxilo estables tales como derivados de 2,2,6,6-tetrametil-1,4-piperadon-1-oxilo (TEMPO), derivados de DOXIL.

10 Nanopartículas metálicas y de semiconductor tales como nanopartículas de oro, nanopartículas de plata, puntos cuánticos, nanopartículas de indio-óxido de estaño (ITO), nanopartículas de seleniuro de cadmio (CdSe), nanopartículas de sulfuro de tungsteno (WS), nanopartículas de arseniuro de galio (GaAs), nanopartículas de sulfuro de cinc (ZnS).

Marcadores colorimétricos especiales, proteínas, enzimas tales como peroxidasa de rábano rusticano y fosfatasa alcalina, oligonucleótidos y polinucleótidos, perlas poliméricas.

15 En una realización más preferida, el resto amina de los grupos hidrazido se acopla covalentemente a un marcador fluorescente que contiene un grupo específico de amina o reactivo de amina, en el que los restos fluorescentes de dicho marcador incluyen, pero sin limitarse a: fluoresceína, carboxifluoresceína, diclorotriazina de fluoresceína (5-DTAF), naftofluoresceína, rodamina, verde de rodamina, tetrametil rodamina, rojo de Texas, perileno, pireno, antraceno, naftaleno (por ejemplo, dansilo), estilbeno, (bis)-benzooxazol, derivados de cumarina (por ejemplo, derivados de Alexa Fluor (R)), derivados de BODIPY (R), piridiloxazoles, dixogenina, fenoxazina, triarilmetanos, xanteno, flavina, porfirina, cianina, naftocianina, complejos de lantánidos, complejos de metales de transición, 20 microesferas excitables por luz UV, proteína fluorescente verde.

En una realización más preferida, el resto de amina del grupo hidrazido se acopla covalentemente al isotiocianato de fluoresceína de marcador fluorescente reactivo de amina (FITC). El compuesto marcado resultante se puede representar por medio de la fórmula HA-CO-NH-NH-CS-NH-Fluoresceína.

25 El derivado HA-CO-NH-NH₂ soluble modificado químicamente que contiene el grupo hidrazido puede estar en forma de un hidrogel.

30 Se debería hacer referencia a un hidrogel como una estructura reticular macromolecular de tipo gelatina semi-sólida que se hincha en agua. La red macromolecular está formada por unidades poliméricas hidrófilas que se mantienen juntas bien únicamente por medio de enlaces no covalentes o de manera adicional por medio de una determinada cantidad de enlaces covalentes. Los hidrogeles no covalentes, más conocidos como redes no reticuladas, pueden ser solubles en agua. Las redes covalentes, más conocidas como hidrogeles reticulados, son insolubles en agua. Se pueden preparar los hidrogeles reticulados a partir de hidrogeles no reticulados por medio de reacción química intramolecular o intermolecular de grupos funcionales mutuamente reactivos. Si fuese necesario, se puede conseguir la reticulación por medio de un agente de reticulación.

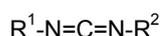
35 Por tanto, un aspecto importante de la presente invención se refiere a la conjugación de los derivados de ácido hialurónico, con un agente farmacológica o biológicamente activo así como un marcador detectable.

40 El agente farmacológica o biológicamente activo puede estar seleccionado entre un antibiótico, un anti-infeccioso, un anti-microbiano, un anti-vírico, un citostático, un anti-tumoral, un anti-inflamatorio, un agente de cicatrización de heridas, un anestésico, un agonista colinérgico, un antagonista colinérgico, un agonista adrenérgico, un antagonista adrenérgico, un anti-trombótico, un anti-coagulante, un hemostático, un fibrinolítico, un agente trombolítico, un factor de crecimiento (por ejemplo, un factor de crecimiento de fibroblasto), una citocina, un anticuerpo, una proteína (por ejemplo, fibrinógeno), un fragmento de proteína, una polipéptido, un péptido, un polinucleótido y un polímero.

45 La presente invención además se refiere a un método para la preparación de un derivado de ácido hialurónico de la invención en forma soluble en agua y no reticulada, que comprende hacer reaccionar ácido hialurónico, activado por una carbodiimida, por ejemplo hidrocloreuro de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida (EDC), con hidrazina, en un intervalo de pH de 5,6-7,5, preferentemente de 5,7-5,9. La reacción se puede llevar a cabo en una etapa por medio de reacción de una mezcla de ácido hialurónico, una carbodiimida e hidrazina.

El ácido hialurónico usado para la preparación de los derivados de la invención tiene un peso molecular medio (M.W.) de aproximadamente 800 a aproximadamente 4.000.000 Da.

50 Las carbodiimidias usadas en la invención son compuestos bien conocidos representados por medio de la fórmula siguiente:



Se prefieren las carbodiimidias que tienen esta fórmula en la que R¹ y/o R² representan más específicamente alquilo, cicloalquilo, arilo o sus formas sustituidas. Las más preferidas son carbodiimidias que son completamente solubles en agua o las que son solubles en mezclas de disolventes apróticos dipolares y agua. Representativas de las

carbodiimidias preferidas son 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida (EDC), p-toluensulfonato de ciclohexil- β -(N-metilmorfolino)etil carbodiimida (CMC), N,N'-diclohexilcarbodiimida (DCC), N,N'-diisopropilcarbodiimida (DIC) y similares.

5 La relación molar de hidrazina o hidrazina sustituida con respecto a grupos carboxi de HA puede estar entre 1:1 y 80:1, preferentemente entre 10:1 a 60:1, más preferentemente 40:1. La relación molar de carbodiimida (por ejemplo, EDC) con respecto a grupos carboxi de HA puede estar entre 0,1:1 a 10:1, más preferentemente entre 4:1 a 8:1. En general, el aumento de la relación molar de carbodiimida con respecto a grupos carboxílicos de HA conduce a un mayor grado de formación de grupos hidrazido.

10 La reacción se puede llevar a cabo en agua o en un tampón acuoso, preferentemente tampón Bis-Tris acuoso. La concentración del tampón puede variar entre 50 mM y 500 mM preferentemente entre 200 mM y 300 mM. La reacción también se puede llevar a cabo en una mezcla de tampón acuoso y disolvente orgánico miscible con agua tal como alcoholes hidrocarbólicos, dioles, gliceroles o disolventes polares apróticos. Preferentemente, el disolvente orgánico miscible con agua es un disolvente aprótico dipolar, por ejemplo, sulfóxido de dimetilo, N,N-dimetilformamida, 1-metil-2-pirrolidona, 1,1,3,3-tetrametilurea, hexametilosforamida y acetonitrilo.

15 El grado de formación de grupos hidrazido se puede medir usando técnicas colorimétricas tales como, pero sin limitarse a, procedimiento de TNBS (ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfónico) como se describe por parte de Qi et al. (Analytical Biochem. 175:139-144, 1988). En este procedimiento, el reactivo TTSfBS reacciona covalentemente con un grupo hidrazido para formar un derivado altamente cromogénico, cuyo color se puede cuantificar por vía espectrofotométrica.

20 En otro aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que contiene un derivado de ácido hialurónico de la invención, que comprende opcionalmente de manera adicional un vehículo farmacéuticamente aceptable y/o que comprende opcionalmente de manera adicional un agente farmacéuticamente activo conjugado químicamente o sin conjugar, siendo capaz opcionalmente la composición farmacéutica de proporcionar una liberación lenta o una liberación prolongada del agente farmacéuticamente activo.

25 Los vehículos farmacéuticamente aceptables pueden ser cualesquiera de los usados convencionalmente y están únicamente limitados por consideraciones físico-químicas, tales como solubilidad y pérdida de reactividad con el compuesto de la invención, y por la ruta de administración. La elección del vehículo vendrá determinada por el método particular usado para administrar la composición farmacéutica. Algunos ejemplos de vehículos apropiados incluyen lactosa, glucosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidones, goma arábiga, fosfato de calcio, alginatos, tragacanto, gelatina, silicato de calcio, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, celulosa, agua y metilcelulosa. Otros vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluyendo los de petróleo, de origen animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares, polietilen glicoles, glicerina, propilen glicol u otros disolventes sintéticos. Agua es un vehículo preferido cuando se administra la composición farmacéutica por vía intravenosa. También se pueden emplear disoluciones salinas y disoluciones acuosas de dextrosa y glicerol como vehículos líquidos, en particular para disoluciones inyectables.

30

35

En otro aspecto, la invención proporciona una composición cosmética, que además comprende un vehículo cosméticamente aceptable, y que opcionalmente comprende un agente cosmético.

40 Ejemplos de agentes cosméticos que se pueden usar de acuerdo con la presente invención incluyen, pero sin limitarse a, xantinas, retinoides, α -hidroxi ácidos, β -hidroxi ácidos, hidroquinona, ácido ascórbico, ácido cojico, corticoesteroides, mucopolisacáridos, colágeno, isoflavonoides, ácido cinámico, peróxido de benzoilo, tropolona, catecol, mercaptoamina, niacinamida, tocoferol, ácido ferúlico, ácido azelaico, botulina, urea, uno de sus derivados o una de sus sales.

45 Ejemplos de vehículos cosméticos apropiados incluyen, pero sin limitarse a, escualeno, aceite de oliva, aceite de maíz, aceite de colza, aceite de cacahuete, aceite de cártamo, aceite de lino, aceite de girasol, aceite mineral, ricino, alcohol cetílico, alcohol estearílico y ácido esteárico, así como también vehículos de base acuosa tales como glicerina, agua, alcohol, propilen glicol y similares.

50 En otro aspecto, la invención proporciona un vehículo para la liberación lenta de sustancias terapéuticas que comprenden HA funcionalizado con hidrazido, estando presentes dichas sustancias terapéuticas en el volumen de dicho HA funcionalizado.

A continuación, se ilustra la invención por medio de los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplos

Se usan las siguientes abreviaturas en los Ejemplos:

EDC	1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida
HOBt	1-hidroxibenzotriazol
NHS	N-hidroxisuccinimida
TNBS	Ácido 2,4,6-trinitrobencenosulfónico
DTSSP	3,3'-ditiobis[propionato de sulfosuccinimidilo]
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
DTT	Ditiotreitol
FITC	Isocianato d fluoresceína
PEGDA	Poli(etilen glicol) – butirdialdehído (M.W. 3400 Da)
DMS	Dimetil suberimida · HCl
PBS	Disolución salina tamponada con fosfato
Bis-Tris	2,2-bis (hiroximetil)-2',2"-nitrioloetanol
BSA	Albúmina de suero bovino
bFGF	Factor de crecimiento de fibroblasto básico humano recombinante
ELISA	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima

Se obtuvieron todos los reactivos EDC, HOBt, NHS, TNBS, DTT, EDTA, FITC, BSA e hidrato de hidrazina, los tampones PBS y Bis-Tris, los disolventes DMSO y 1-metil-2-pirrolidona, y la enzima hialuronidasa testicular de oveja en Sigma (Weizmann Science Park, Israel).

- 5 Los *agentes de reticulación homobifuncionales* DTSSP, DMS y glutaraldehído se obtuvieron en Pierce (Rockford, EE.UU.).

Se obtuvo PEGDA reticulado homobifuncional en Nektar (San Carlos, EE.UU.).

Se obtuvo bFGF en ProSpec TechnoGene (Weizmann Science Park, Israel).

- 10 Se obtuvo ácido hialurónico (M.W. 3.000.000 Da) como sal de sodio disponible comercialmente (hialuronato de sodio) y se usó durante todos los experimentos, a menos que se indicase lo contrario.

Ejemplo Comparativo 1: Modificación de HA con hidrazina a pH 4,75 en disolución acuosa

- 15 Se añadió hidrazina hidratada (44 mmol) a una disolución de hialuronato de sodio (440 mg, 1,1 mmol de grupos carboxílicos) en agua (100 ml). Se ajustó el pH a 4,75 por medio de la adición de HCl 1N. Se agitó la disolución durante 10 min después de lo cual se añadió EDC (840 mg, 4,4 mmol). Se agitó la mezcla de reacción durante 3 horas adicionales al tiempo que se mantenía el pH en 4,75 (HCl 0,1 N). Se detuvo la reacción aumentando el pH hasta 7,0 (NaOH 0,1 N). Se sumergió un tubo de diálisis con valor límite de MW de 3500 Dalton en agua a temperatura ambiente durante 3 horas y posteriormente se lavó con agua. Se transfirió la mezcla de reacción a este tubo y se sometió a diálisis exhaustiva frente a agua.

- 20 Se filtró la mezcla transparente a través de una membrana de 0,45 µm. Se aisló un producto reticulado insoluble en agua de tipo gelatina. Se secó el producto a vacío para dar lugar a 420 mg de fibras blancas que contenían grupos hidrazido libres como se confirmó cualitativamente por medio del método TNBS.

Ejemplo Comparativo 2: Modificación de HA con hidrazina a pH 4,75 en disolución tamponada

- 25 A. Se añadió hidrazina hidratada (44 mmol) a una disolución de hialuronato de sodio (440 mg, 1,1 mmol de grupos carboxílicos) en 100 ml de tampón Bis-Tris (400 mM, pH 4,75). Tras ajustar el pH de esta mezcla a 4,75 (HCl 1N), se añadió EDC (840 mg, 4,4 mmol) y se agitó la mezcla de reacción durante la noche. Posteriormente, se ajustó el pH a 7,0 (NaOH 0,1 N). Se purificó y aisló un producto reticulado insoluble en agua de tipo gelatina como se ha descrito en el ejemplo 1. El producto contenía grupos hidrazido libres como se confirmó por medio del método de TNBS.

B. La realización del mismo procedimiento con la mitad de cantidad de EDC (420 mg, 2,2 mmol) también dio como resultado un producto reticulado insoluble en agua que contenía grupos hidrazido libres.

Ejemplo Comparativo 3: Preparación hidrazido HA soluble en agua a pH 4,75

Se preparó HA derivatizado con grupos N-acilurea (HA-EDC) a partir de hialuronato de sodio y EDC de acuerdo con procedimientos establecidos (Bystricky et al., Chem. Pap. 1:49-52, 2001; Soltes et al., Biomed. Chromatogr. 17:376-384, 2003). El producto contenía aproximadamente 40 % de funciones carboxílicas bloqueadas.

- 5 Se derivatizó HA-EDC (440 mg, 0,66 mmol de grupos carboxílicos) exactamente como se describe en el Ejemplo 2B usando las mismas cantidades de hidrazina hidratada (44 mmol) y EDC (420 mg, 2,2 mmol).

- 10 Se sometió la mezcla de reacción a diálisis como se describe en el ejemplo 1 frente a agua (2 litros, 6 intercambios) durante 72 horas. Se filtró la disolución sometida a diálisis a través de una membrana de 0,45 µm. Se añadió NaCl al filtrado para producir una disolución de 5 % en peso/volumen y se precipitó el HA modificado por medio de la adición de tres equivalentes en volumen de etanol. Se secó el producto a vacío para dar lugar a 390 mg de fibras blancas. Contenía un 15 % de grupos hidrazido como se confirmó por medio del método TNBS.

Ejemplo Comparativo 4: Modificación de HA con hidrazina a pH 5,5

- 15 Se añadió hidrazina hidratada (44 mmol) a una disolución de hialuronato de sodio (440 mg, 1,1 mmol de grupos carboxílicos) en 100 ml de tampón Bis-Tris (400 mM, pH 5,5). Tras ajustar el pH de esta mezcla a 5,5 (HCl 1N), se añadió EDC (840 mg, 4,4 mmol) y se agitó la mezcla de reacción durante la noche. Posteriormente, se ajustó el pH a 7,0 (NaOH 0,1N).

Se purificó y aisló un producto reticulado insoluble en agua y de tipo gelatina como se describe en el ejemplo 1. El producto contenía grupos hidrazido libres como se confirmó por medio del método TNBS.

Ejemplo 5: Modificación de HA con hidrazina a pH 7,5

- 20 Se llevó a cabo esta modificación siguiendo los procedimientos establecidos para la derivatización de HA con aminas e hidrazidas (Bulpitt y Aeschlinmann, 1999; documento US 6.630.457).

- 25 Se añadió hidrazina hidratada (44 mmol) a una disolución de hialuronato de sodio (440 mg, 1,1 mmol de grupos carboxílicos) en agua (100 ml). Se ajustó el pH de la mezcla de reacción a 7,5 (HCl 0,1 N). Se añadió una mezcla de EDC (840 mg, 4,4 mmol) y NHS (506 mg, 4,4 mmol) en H₂O (2 ml) y se ajustó el pH a 7,5. Se dejó transcurrir la reacción durante la noche. Se sometió la mezcla de reacción a diálisis frente a agua y se aisló el producto soluble como se describe en el Ejemplo 3.

Se comprobó que el producto era HA no modificado con sustitución cero de grupos hidrazido como se confirmó por medio del método TNBS.

Ejemplo 6: Modificación de HA con hidrazina a pH 6,8

- 30 Se llevó a cabo esta modificación de acuerdo con Bulpitt y Aeschlinmann (1999) como se describe en el ejemplo anterior.

- 35 Se añadió hidrazina hidratada (44 mmol) a una disolución de hialuronato de sodio (440 mg, 1,1 mmol de grupos carboxílicos) en agua (100 ml). Se ajustó el pH de la mezcla de reacción a 6,8 (HCl 0,1 N). Posteriormente, se añadió una mezcla de EDC (840 mg, 4,4 mmol) y HOBT (594 mg, 4,4 mmol) en DMSO/H₂O (1:1, 2 ml) y se re-ajustó el pH a 6,8. Se dejó transcurrir la reacción durante la noche. Se sometió la mezcla de reacción a diálisis frente a agua y se aisló el producto soluble como se describe en el Ejemplo 3.

Se secó el producto a vacío para dar lugar a 400 mg de fibras blancas. Contenía 3 % de grupos hidrazido como se confirmó por medio del método TNBS.

Ejemplo 7: Modificación de HA con hidrazina a pH 6,2

- 40 Se añadió hidrazina hidratada (44 mmol) a una disolución de hialuronato de sodio (440 mg, 1,1 mmol de grupos carboxílicos) en 100 ml de tampón Bis-Tris (400 mM, pH 6,2). Tras re-ajustar el pH de esta mezcla a 6,2 (HCl, 1N), se añadió EDC (840 mg, 4,4 mmol) y se agitó la mezcla de reacción durante la noche. Posteriormente, se ajustó el pH a 7,0 (NaOH 0,1N).

- 45 Se purificó y aisló el producto soluble en agua como se describe en el ejemplo 3. Se secó el producto a vacío para dar lugar a 400 mg de fibras blancas. Contenía 3 % de grupos hidrazido como se confirmó por medio del método TNBS.

Ejemplo 8: Preparación de hidrazido HA soluble en agua a pH 5,8

- 50 Se añadió hidrazina hidratada (44 mmol) a una disolución de hialuronato de sodio (440 mg, 1,1 mmol de grupos carboxílicos) en 100 ml de tampón Bis-Tris (400 mM, pH 5,8). Tras re-ajustar el pH de esta mezcla a 5,8 (HCl, 1N), se añadió EDC (840 mg, 4,4 mmol) y se agitó la mezcla de reacción durante la noche. Posteriormente, se ajustó el

pH a 7,0 (NaOH 0,1N).

Se purificó y aisló el producto soluble en agua como se describe en el ejemplo 3. Se secó el producto a vacío para dar lugar a 400 mg de fibras blancas que contenían 12 % de grupos hidrazido como se confirmó por medio del método TNBS.

- 5 El aumento de la cantidad de EDC hasta 8,8 mmol dio como resultado un producto que contenía 20% de grupos hidrazido.

La derivatización de HA que tenía pesos moleculares diferentes de 3.000.000 Da, en condiciones idénticas, también dio como resultado productos de HA solubles en agua que tenían ~ 12 % de grupos hidrazido. Se usaron HA con los siguientes pesos moleculares:

- 10 a. M.W. 700.000 Da
b. M.W. 250.000 Da obtenido por medio de hidrólisis ácida de HA (M.W. 3.000.000 Da) de acuerdo con Shu et al., Biomacromolecules 3:1304-1311, 2002.

Ejemplo 9: Preparación de hidrazido HA soluble en agua en una mezcla de tampón y disolvente aprótico dipolar

- 15 Se añadió hidrazina hidratada (44 mmol) a una disolución de hialuronato de sodio (440 mg, 1,1 mmol de grupos carboxílicos) en 100 ml de tampón Bis-Tris (400 mM, pH 5,8). Tras re-ajustar el pH de esta mezcla a 5,8 (HCl, 1N), se añadió DMSO (50 ml) seguido de EDC (840 mg, 4,4 mmol). Se agitó la mezcla de reacción durante la noche. Posteriormente, se ajustó el pH a 7,0 (NaOH 0,1N).

- 20 Se purificó y aisló el producto soluble en agua como se describe en el ejemplo 3. Se secó el producto a vacío para dar lugar a 400 mg de fibras blancas que contenían 20 % de grupos hidrazido como se confirmó por medio del método TNBS.

Se llevó a cabo un experimento adicional en condiciones idénticas exceptuando que se sustituyó DMSO por 1-metil-2-pirrolidona. Se obtuvo un hidrazido HA soluble en agua que contenía 19 % de grupos hidrazido.

Ejemplo Comparativo 10: Reticulación de hidrazido-HA usando agentes de reticulación homobifuncionales

- 25 La presencia de restos hidrazido reactivos en la cadena principal de HA permite la introducción de una variedad de agentes de reticulación covalentes entre las hebras individuales de HA usando agentes de reticulación homobifuncionales específicos de amina disponibles comercialmente tales como: DTSSP, DMS, glutaraldehído o PEGDA.

- 30 Procedimiento general para la reticulación de HA funcionalizado con hidrazido con agentes de reticulación homobifuncionales:

Se disolvió HA funcionalizado con hidrazido que contenía 12 % de grupos hidrazido (preparado como se ha descrito anteriormente en el ejemplo 8) en tampón PBS (pH 7,4) en concentraciones que variaron de 0,2 % a 1,5 %.

- 35 Se añadieron agentes de reticulación homobifuncionales a disoluciones transparentes e incoloras y se agitaron las mezclas durante varios segundos. Normalmente, las relaciones de equivalencia de los agentes de reticulación de hidrazido-HA estuvieron dentro del intervalo de 1:0,5 a 1:10.

Los detalles de algunas reacciones individuales se describen a continuación:

a. Reticulación con glutaraldehído

- 40 Se disolvió hidrazido-HA (16 mg) en PBS (2 ml, pH 7,4). Posteriormente se añadió glutaraldehído diluido con PBS (200 µl). La relación molar de los grupos hidrazido:glutaraldehído fue de 1:0,5. Se agitó la mezcla durante varios segundos. Se formó un hidrogel transparente después de un minuto.

b. Reticulación con PEGDA

Se disolvió hidrazido-HA (16 mg) en PBS (2 ml, pH 7,4). Posteriormente, se añadió PEGDA (6,8 mg) diluido en PBS (80 µl). La relación molar de grupos hidrazido: PEGDA fue de 1:0,5. Se agitó la mezcla durante varios segundos. Se formó un hidrogel transparente después de varios minutos.

- 45 **c. Reticulación con DTSSP**

Se disolvió hidrazido-HA (16 mg) en PBS (2 ml, pH 7,4). Posteriormente, se añadió DTSSP (5 mg) en forma de sólido. La relación molar de grupos hidrazido:DTS SP fue de 1:1,6. Se agitó la mezcla durante 30 segundos. Se formó una hidrogel transparente después de 30 minutos.

d. Reticulación con DMS. Hidrazido-HA

Se disolvió (20 mg) en PBS (2 ml, pH 7,4). Posteriormente se añadió una disolución de DMS (13 mg) en H₂O (100 µl). La relación molar de grupos hidrazido:DMS fue de 1:10. Se agitó la mezcla durante 30 segundos. Se formó un hidrogel transparente después de 45 minutos.

5 Ejemplo Comparativo 11: Experimento comparativo con HA nativo

Se llevó a cabo un experimento de control en paralelo a los experimentos de reticulación descritos anteriormente. Se disolvió HA nativo (sin modificar) a una concentración de 10 mg/ml en tampón de PBS (pH 7,4). Se añadieron DMS, DTSP, glutaraldehído o PEGDA a la mezcla viscosa y se permitió la agitación a temperatura ambiente. No se observó gelificación alguna de la disolución con el tiempo y los componentes de la mezcla permanecieron completamente solubles en agua lo que indicó que, en ausencia de HA funcionalizado con hidrazido, no tuvo lugar reticulación covalente.

Ejemplo Comparativo 12: Reticulación de HA-hidrazido usando poli aldehídos

A. Reticulación con AH oxidado. A una disolución de hialuronato de sodio (15 mg, 37,5 µmol) en H₂O (3 ml), se añadió peryodato de sodio (8 mg, 37,5 µmol) y se dejó transcurrir la reacción durante dos horas a temperatura ambiente. Posteriormente se añadió DTT (12 mg) con el fin de destruir el peryodato que no había reaccionado. Transcurridos 15 minutos, se transfirió la mezcla de reacción al interior de un tubo de diálisis (valor límite de MW 3500 dalton) y se sometió a diálisis exhaustiva frente a PBS (pH 7,4). Se añadió una disolución de hidrazido-HA (15 mg, M.W. $2,5 \times 10^5$, 15 % de grupos hidrazido) en PBS (1 ml, pH 7,4) a la disolución anteriormente preparada se HA oxidado. Se agitó brevemente la mezcla. Se formó un hidrogel transparente durante la noche.

B. *Reticulación con gelatina oxidada.* Se generaron funciones de aldehído en gelatina por medio de oxidación de sus residuos de hidroxilisina de acuerdo con el siguiente procedimiento; se añadió peryodato de sodio (7,5 mg) a una disolución de gelatina (25 mg, Merck Cat. N°. 104080) en tampón de acetato (500 µl, 50 mM, pH 4,5). Se dejó que la reacción transcurriera durante 3 horas. Posteriormente se añadió DTT (38 mg) con el fin de destruir el peryodato que no había reaccionado. Después de 60 minutos a temperatura ambiente, se mezcló la disolución con una disolución de hidrazido-HA (5 mg, M.W. 3×10^6 , 20% de grupos hidrazido) en tampón de acetato (500 µl, 50 mM, pH 4,5). Se formó un hidrogel transparente después de varios minutos. Se llevó a cabo un experimento adicional en condiciones idénticas exceptuando que se sustituyó el tampón de acetato por PBS (pH 7,4), no obstante, a este pH ligeramente básico se formó el hidrogel únicamente trascurridas 12 horas.

Ejemplo Comparativo 13: Reticulación de longitud cero de hidrazido HA con EDC

Se disolvió HA funcionalizado con hidrazido que contenía 20 % de grupos hidrazido (preparado como se ha descrito en el ejemplo 9) en tampón Bis-Tris (100 mM, pH 4,75) a varias concentraciones que variaron de 0,2 % a 1,5 %.

Se añadió EDC sólido a una relación de equivalencia de EDC:grupos carboxílicos dentro del intervalo de 0,5:1 a 4:1. Se agitaron las mezclas durante varios segundos. El tiempo de gelificación dependió de la concentración de EDC. Los detalles de las dos reacciones individuales se describen a continuación:

a. Se disolvió hidrazido-HA (16 mg) en 2 ml de tampón Bis-Tris (100 mM, pH 4,75). Se añadió EDC (4 mg) y se agitó vigorosamente la mezcla durante unos pocos segundos. La relación molar de EDC con respecto a grupos carboxílicos fue de 0,5:1. Se formó un hidrogel transparente después de 3 horas.

b. Se disolvió hidrazido-HA (16 mg) en 2 ml de tampón Bis-Tris (100 mM, pH 4,75). Se añadió EDC (32 mg) y se agitó vigorosamente la mezcla durante unos pocos segundos. La relación molar de EDC con respecto a grupos carboxílicos fue de 4:1. Se formó un hidrogel transparente después de 1 minuto.

Cuando se hizo reaccionar HA nativo (sin modificar) con EDC usando las condiciones exactas descritas anteriormente, no se formaron hidrogeles.

Ejemplo Comparativo 14: Digestión de hidrogeles de HA reticulados con hialuronidasa

Se purificaron los dos hidrogeles descritos en el ejemplo anterior (13a y b) por medio de lavados repetidos con PBS (pH 7,4) durante 48 horas. Se añadió hialuronidasa testicular de oveja (200 u/ml en PBS, 500 µl) a cada hidrogel y se incubó a 37 °C. Se disolvió completamente el hidrogel preparado usando 4 mg de EDC (ejemplo 12a) en 4 horas. Se disolvió completamente el segundo hidrogel (preparado usando 32 mg de EDC, ejemplo 12b) en 26 horas.

Ejemplo 15: Preparación de ácido hialurónico marcado con FITC

Se añadió FITC (0,5 mg, 1,25 µmol) en tampón de carbonato (500 µl, 0,1 M, pH 9) a una disolución de hidrazido-HA (20 mg, M.W. $2,5 \times 10^5$, 10 % de grupos hidrazido) en el mismo tampón (2 ml). Se dejó transcurrir la reacción a temperatura ambiente en oscuridad. Transcurrida 1 hora, se transfirió la mezcla de reacción a un tubo de diálisis (valor límite de M.W. de 3500 dalton) y se sometió a diálisis exhaustiva, en oscuridad, frente a PBS (pH 7,4) hasta que el producto estuvo completamente libre de FITC que no había reaccionado y productos secundarios de peso

- 5 molecular bajo. Se liofilizó la fracción sometida a diálisis para dar lugar al producto en forma de sólido amarillo. Se determinó el grado de grupos hidrazido derivatizados con FITC siguiendo el procedimiento descrito por Akira et al. (Carbohydrate Res. 105:69-85,1982) y se comprobó que fue de aproximadamente 10 %. Se controla el grado de derivatización de los grupos hidrazido de la reacción descrita anteriormente por medio de la relación FITC:grupos hidrazido. Por ejemplo, el aumento de la cantidad de FITC hasta 2 mg (5 μ mol) condujo a un grado de derivatización de aproximadamente 40 % mientras que el uso de 4 mg (10 μ mol) de FITC condujo a un grado de derivatización de aproximadamente 60 %.

Ejemplo Comparativo 16: Incorporación de bFGF a un hidrogel de hidrazido-HA reticulado y su liberación a partir del hidrogel

- 10 Se disolvió hidrazido-HA (20 mg, M.W. $2,5 \times 10^5$, 10 % de grupos hidrazido) en PBS (2 ml, pH 7,4). Posteriormente, se añadió una disolución de bFGF (850 μ g) en PBS (complementado con EDTA 1mM, pH 7,4), seguido de una disolución de reticulador PEGDA homobifuncional (9 mg) en PBS (110 μ l, pH 7,4). Se agitó la mezcla transparente durante varios segundos. Se formó un hidrogel transparente en 30 minutos. Se liberó bFGF agitando el hidrogel a temperatura ambiente a 100 rpm con PBS (2 ml, complementado con 1 % de BSA y EDTA 1 mM, pH 7,4).
- 15 Se sustituyó el medio de liberación cada 24 horas y se almacenaron las muestras recogidas (2 ml cada una) a -70 °C hasta la medición. Se midió la cantidad de bFGF liberado en cada una de las muestras recogidas usando un estuche bFGF ELISA, proporcionado por R&D Systems (Minneapolis, MN, EE.UU., N°. Catalog. DY 233), de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Se comprobó que tras un tiempo de liberación acumulado de 240 horas, se liberó 77,6 % (660 μ g) del bFGF incorporado.

20

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un derivado de ácido hialurónico (en lo sucesivo HA) o una de sus sales, teniendo dicho derivado una parte de grupos carboxi de los residuos D-glucurónicos modificada para dar grupos hidrazido, en el que dicho derivado de ácido hialurónico es un compuesto soluble en agua no reticulado, representado por medio de la fórmula HA-CO-NH-NH₂.
2. Un derivado de ácido hialurónico de acuerdo con la reivindicación 1, que opcionalmente contiene además grupos N-acilurea.
- 10 3. Un derivado de ácido hialurónico de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en el que dicho derivado de ácido hialurónico se conjuga con un agente farmacológica o biológicamente activo, por ejemplo un agente farmacológica o biológicamente activo que está seleccionado entre el grupo que consiste en un antibiótico, un anti-infeccioso, un anti-microbiano, un anti-vírico, un citostático, un anti-tumoral, un anti-inflamatorio, un agente de cicatrización de heridas, un anestésico, un agonista colinérgico, un antagonista colinérgico, un agonista adrenérgico, un antagonista adrenérgico, un anti-trombótico, un anti-coagulante, un hemostático, un fibrinolítico, un agente trombolítico, un factor de crecimiento, una citocina, un anticuerpo, una proteína, un fragmento de proteína, un polipéptico, un péptido, un polinucleótido y un polímero.
- 15 4. Un derivado de ácido hialurónico de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho ácido hialurónico tiene un peso molecular medio de aproximadamente 800 a aproximadamente 4.000.000 Da en peso.
- 20 5. Un derivado de ácido hialurónico de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho derivado de ácido hialurónico tiene entre 0,5 % y 70 % de restos carboxi de grupos D-glucurónicos directamente convertidos en grupos hidrazido.
- 25 6. Un derivado de ácido hialurónico que comprende un derivado de ácido hialurónico de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en el que al menos una parte de los grupos hidrazido se unen covalentemente a un marcador detectable que tiene un grupo funcional capaz de formar un enlace covalente con la función hidrazido, por ejemplo un marcador detectable seleccionado entre el grupo que consiste en: marcadores fluorescentes, marcadores fosforescentes, marcadores de afinidad, marcadores de Resonancia de Espín Electrónico (ESR), nanopartículas de metal y semiconductor, marcadores colorimétricos espectrales, proteínas, enzimas, oligonucleótidos y polinucleótidos, perlas poliméricas.
- 30 7. Un derivado de ácido hialurónico de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el marcado detectable es un marcador detectable seleccionado entre la siguiente lista no limitante: fluoresceína, carboxi fluoresceína, diclorotriazina de fluoresceína (5-DTAF), naftofluoresceína, un derivado de isotiocianato de fluoresceína (FITC) representado por medio de la fórmula HA-CO-NH-NH-CS-NH-Fluoresceína, rodamina, verde de rodamina, tetrametil rodamina, rojo de Texas, perileno, pireno, antraceno, naftaleno (por ejemplo, dansilo), estilbena, (bis)-benzoxazol, derivados de cumarina (por ejemplo derivados de Alexa Fluor (R)), derivados de BODIPY(R), piridiloxazoles, dixogenina, fenoxazina, triarilmetanos, xanteno, flavina, porfirina, cianina, naftocianina, complejos de lantánidos, complejos de metales de transición, microesferas excitables con luz UV, proteína fluorescente verde.
- 35 8. Un derivado de ácido hialurónico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicho derivado de ácido hialurónico está en forma de un hidrogel.
- 40 9. Una composición farmacéutica que comprende un derivado de ácido hialurónico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 y que opcionalmente comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable y/o que opcionalmente comprende además un agente farmacológicamente activo químicamente conjugado o sin conjugar, siendo la composición farmacéutica opcionalmente capaz de proporcionar una liberación lenta o una liberación prolongada del agente farmacéuticamente activo.
- 45 10. Una composición cosmética que comprende un derivado de ácido hialurónico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que además comprende un vehículo cosméticamente aceptable, y que opcionalmente comprende además un agente cosmético.
- 50 11. Un método de preparación de un derivado de ácido hialurónico marcado de acuerdo con la reivindicación 6 que comprende hacer reaccionar el derivado de HA de una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 con un marcador aceptable que contiene un grupo específico de amina o reactivo de amina; por ejemplo un marcador fluorescente que contiene un grupo específico de amina o reactivo de amina, por ejemplo isotiocianato de fluoresceína (FITC).
- 55 12. Un método para la preparación de un derivado de ácido hialurónico de la reivindicación 1 en forma soluble en agua y no reticulada, que comprende hacer reaccionar ácido hialurónico activado por una carbodiimida, por ejemplo hidrocloreuro de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida (EDC), con hidrazina, a un intervalo de pH de 5,6-7,5, preferentemente de 5,7-5,9.
13. Un método de acuerdo con la reivindicación 12, en el que la reacción se lleva a cabo en un tampón acuoso o en una mezcla de tampón acuoso y disolvente orgánico miscible en agua; por ejemplo un disolvente aprótico dipolar,

por ejemplo un disolvente aprótico dipolar seleccionado entre el grupo que consiste en sulfóxido de dimetilo, N,N-dimetilformamida, 1-metil-2-pirrolidona, 1,1,3,3-tetrametilurea, hexametilfosforamida y acetonitrilo.

14. Un método de acuerdo con la reivindicación 12, en el que la reacción se lleva a cabo en una etapa por medio de la reacción de una mezcla de ácido hialurónico, una carbodiimida e hidrazina.