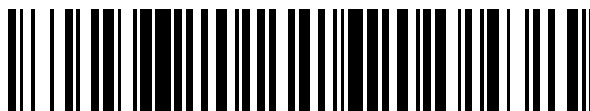


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 531 292**

51 Int. Cl.:

**C08B 37/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.12.2010 E 10812976 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.01.2015 EP 2510017**

54 Título: **Derivado oxidado del ácido hialurónico, un método para su preparación y un método para su modificación**

30 Prioridad:

**11.12.2009 CZ 20090836**

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

**12.03.2015**

73 Titular/es:

**CONTIPRO PHARMA, A.S. (100.0%)  
Dolni Dobrouc 401  
561 02 Dolni Dobrouc, CZ**

72 Inventor/es:

**BUFFA, RADOVAN;  
KETTOU, SOFIANE;  
POSPISILOVÁ, LUCIE;  
NÉMCOVĀ, MIROSLAVA y  
VELEBNÝ, VLADIMIR**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 531 292 T3**

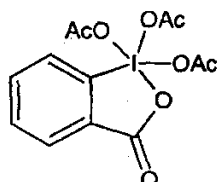
Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar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

## DESCRIPCIÓN

Derivado oxidado del ácido hialurónico, un método para su preparación y un método para su modificación

## Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere a un método para la preparación de un nuevo derivado de ácido hialurónico que contiene un grupo aldehído  $-\text{CH}=\text{O}$  en vez del grupo hidroxilo primario  $-\text{CH}_2-\text{OH}$ . La oxidación se puede realizar usando el agente DPM (periodinano de Dess-Martin) en disolventes polares apróticos.

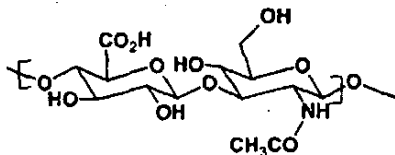


DMP- periodinano de Dess-Martin

en el que el disolvente incluye, por ejemplo, sulfóxido de dimetilo.

## 10 Antecedentes de la invención

- El ácido hialurónico es un polisacárido importante compuesto por dos unidades repetidas de ácido  $\beta$ -(1,3)-D-glucurónico y  $\beta$ -(1,4)-N-acetil-D-glucosamina. El peso molecular está en el intervalo de  $5 \cdot 10^4$  a  $5 \cdot 10^6$   $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$  dependiendo del método de aislamiento y del material fuente. El ácido hialurónico o su sal sódica hialuronano es un componente esencial de los tejidos conectores, fluido sinovial de articulaciones, y desempeña un papel importante en procesos biológicos tales como hidratación, organización de proteoglicanos, diferenciación, proliferación de células y angiogénesis. El ácido hialurónico es un polisacárido considerablemente hidrófilo que es soluble en agua en forma de su sal dentro del intervalo de pH total.



Ácido hialurónico

## 20 Oxidación de ácido hialurónico

La oxidación de polisacáridos es un proceso en el que el grado de oxidación de los grupos funcionales de polisacárido es cambiante. Muy frecuentemente se forman los ácidos carboxílicos o aldehídos que pueden cambiar espectacularmente las propiedades de los polisacáridos. En la mayoría de los casos, la reacción se realiza usando agentes que contienen átomos en grados de oxidación superiores.

- 25 Se usó el método de oxidación selectiva de sacáridos en el grupo hidroxilo primario, descrito por Angelino, European Journal of Organic Chemistry, 2006, 19, 4323-4326, el sistema de 2,2,6,6-tetrametil-1-piperidiniloxilo radical TEMPO/TCC en DMF a la temperatura de  $0^\circ\text{C}$ , con el aldehído correspondiente como producto principal.

- La oxidación de ciclodextrina a monoaldehído ha sido descrita por Cornwell, Tetrahedron Letters 1995, 36 (46), 8371-8374. La oxidación se realizó añadiendo periodinano de Dess-Martin (DMP) en DMSO o en DMF a la temperatura de  $20^\circ\text{C}$  como agente oxidante.

- 30 La oxidación mediada por 2,2,6,6-tetrametil-1-piperidiniloxilo radical (TEMPO)- y NaOCl del grupo hidroxilo primario de hialuronano a ácido carboxílico se realizó a pH 10,2 y a la temperatura de  $0^\circ\text{C}$  (Esquema 2) (Carbohydr Res 2000, 327 (4), 455-61):

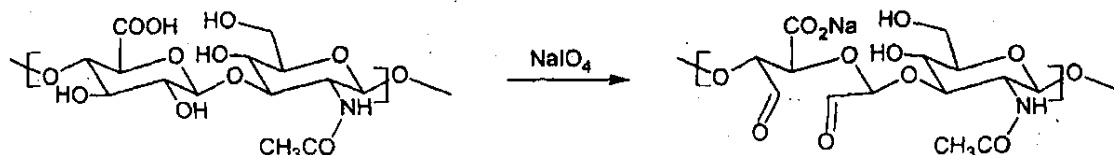


Esquema 2: Oxidación a ácido carboxílico

35

Análogamente a lo observado en otros polisacáridos, se observó una alta regioselectividad y una ligera degradación del polímero. Un aumento de la concentración de la sal (NaBr, NaCl, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) en la solución causó una disminución de la velocidad de oxidación.

5 En la solicitud de patente WO 02/18448 A2 se describe la oxidación de hialuronano al usar el sistema TEMPO/NaClO. Los autores consideraron también las interacciones de polisacáridos percarboxilados mientras que se formaban complejos biológicos.



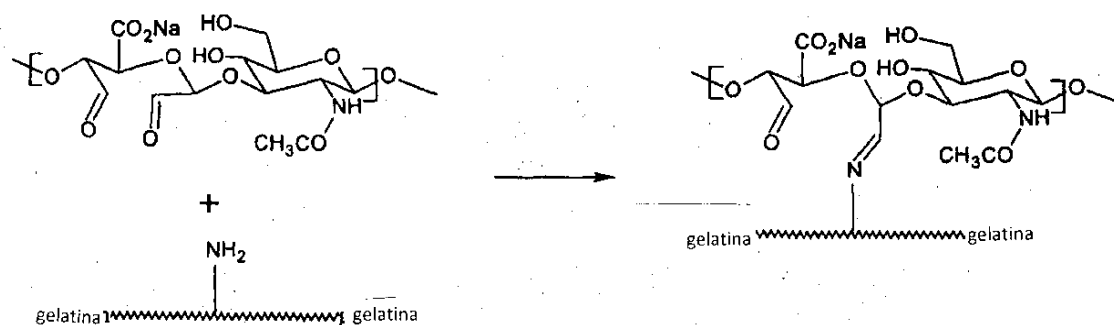
Esquema 3. Oxidación a dialdehído

10 La velocidad de oxidación de HA usando peryodato sódico fue estudiada por Scott y otros (Esquema 3) (Histochemie 1969, 19(2), 155-61). Se estudiaron y cuantificaron factores tales como longitud de cadena, sustitución, configuración del polímero y temperatura. También se consideró en las patentes U.S. n.º. 6 683 064 y n.º. 6 953 784 el uso de NaIO<sub>4</sub> para una oxidación del ácido hialurónico.

15 Se estudiaron reacciones modelo de análogos de HA de un peso molecular bajo en un tampón fisiológico (Carbohydric Res 1999, 321, (3-4), 228-34). Se identificaron por análisis de GC-EM los productos de oxidación de las partes glucurónica y de glucosamina. Los resultados sugirieron que la oxidación se realiza principalmente en la parte glucurónica, mientras que la parte de ácido mesotartárico es el producto principal y se puede usar como biomarcador de la oxidación de hialuronano.

#### 3.4.2. Uso de un HA oxidado en reacciones de reticulación

20 Weng y otros (Esquema 4), J. Biomed. Mater Res. A 2008, 85 (2), 352-65, han descrito el uso de un Ha oxidado para la preparación de hidrogeles reticulados. Se usaron dos precursores en este caso: un hialuronano parcialmente oxidado y gelatina



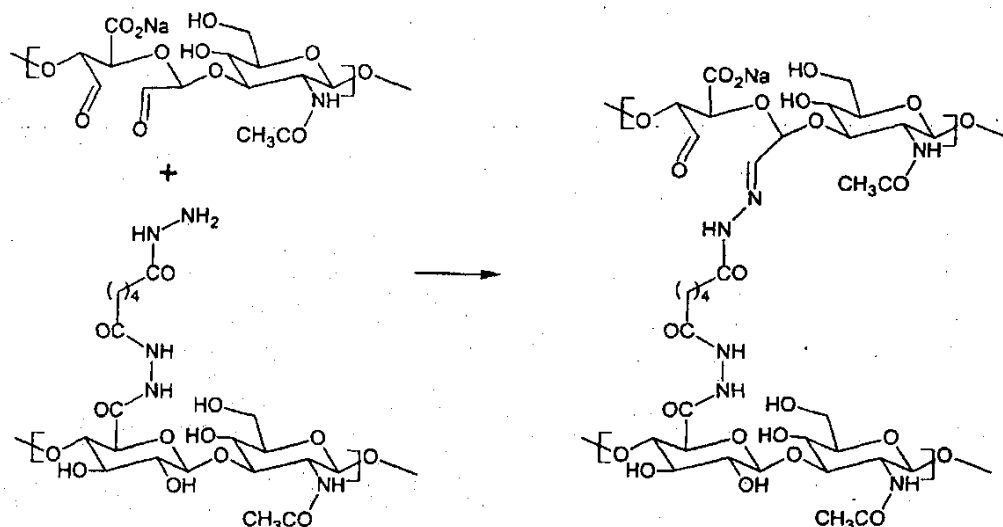
Esquema 4. Reacción de reticulación del hialuronano oxidado y gelatina

25 Las propiedades fisicoquímicas de los hidrogeles resultantes se han elucidado por análisis instrumental de FT-IR, SEM (microscopía electrónica de barrido) y reometría. El aumento del grado de oxidación del hialuronano condujo a un aumento de la compatibilidad de hidrogeles y una disminución de la capacidad de absorción de agua. Se usaron dermoblastos dérmicos para estudiar las interacciones célula-hidrogel. Tanto los hidrogeles como sus productos de degradación son biocompatibles como lo demuestra el ensayo de viabilidad de células a largo plazo. Cuando se cultivó con células, el hidrogel experimentó degradación en 4 semanas, con una obvia pérdida de cohesión. La buena biocompatibilidad y capacidad biodegradación se demostró además en implantes subdérmicos de ratones. Finalmente, por análisis de SEM se demostraron depósitos in vitro e in vivo de matriz extracelular en hidrogeles.

30 En la publicación de Weng y otros, Biomaterials 2008, 29, (31), 4149-56, se describió el método de preparación de HA reticulado de un hialuronano oxidado y gelatina por un método de emulsión de agua en aceite, en el que se forma un hidrogel tridimensional en ausencia de cualquier reticulador externo. En este trabajo se estudió por HPLC la incorporación de fármacos modelo en la estructura del hidrogel (encapsulación) y su liberación mediante macrófagos.

35 Sahiner y otros, (Esquema 5), J. Biomater. Sci. Polym. Ed 2008, 19 (2), 223-43, describieron la preparación de hidrogeles elásticos por acoplamiento de HA oxidado a HA-aldehído mediante peryodato sódico y el HA modificado

con dihidrazida de ácido adípico.

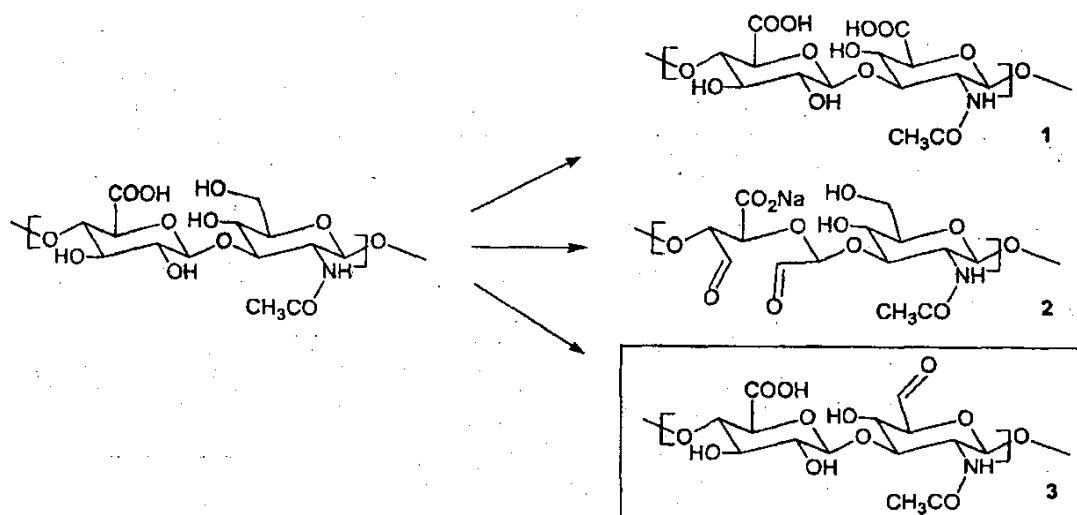


Esquema 5. Preparación del hialuronano reticulado

Los derivados resultantes no tienen efecto observable alguno sobre la proliferación de los fibroblastos cultivados, según lo revela el ensayo MTT.

**Sumario de la invención**

La presente invención se refiere a un método de oxidación selectiva del grupo hidroxilo primario de ácido hialurónico en la posición 6 de la parte de glucosamina del polisacárido a aldehído. La reacción se realiza en un medio aprótico usando periodinano de Dess-Martin DMP como agente oxidante. El presente método es original en cuanto a que introduce un grupo aldehído en la posición 6 de la parte de glucosamina del hialuronano (esquema 6, estructura 3). Enfoques publicados hasta ahora han introducido un grupo aldehído en la posición 2 y 3 de la parte glucurónica del hialuronano, mientras que se abre el anillo del sacárido (esquema 6, estructura 2), o un grupo carboxilo en la posición 6 de la parte de glucosamina de hialuronano (esquema 6, estructura 1).



Esquema 6. Oxidación de hialuronano, productos de reacción

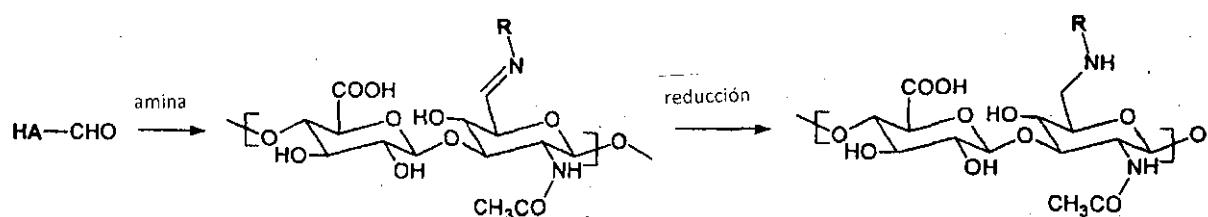
El método de acuerdo con la invención es más ventajoso en cuanto a que el producto de oxidación respectivo (estructura 3, esquema 6) mantiene la estructura de los anillos de sacárido conjugados. La apertura del anillo en el producto oxidado a dialdehído (estructura 2, esquema 6) da origen a la "rotura" de la linealidad de la cadena y, por tanto, a un cambio significativo de la estructura tridimensional del polisacárido en comparación con el hialuronano no modificado. Aunque en el producto oxidado a ácido carboxílico (estructura 1, esquema 6) no hay "rotura" de la linealidad de la cadena, el grupo carboxilo no permite diversas posibilidades de tal modificación (unión) como el

grupo aldehído. Dado que el grupo carboxilo es un componente del polisacárido no modificado, la oxidación a la estructura 1 (esquema 6) aporta sólo un aumento de la polaridad del polisacárido, no un desarrollo de una cualidad nueva utilizable para unir nuevos sustituyentes.

5 Es sabido que un grupo aldehído con un grupo alquilo de unión existe en agua en la forma diol denominada geminal HA-CH(OH)<sub>2</sub> que reacciona con nucleófilos similarmente a como lo hacen los aldehídos. En soluciones acuosas, más de 95% del hialuronano oxidado en la posición 6 de la parte de glucosamina (producto 3, esquema 6) existe en forma de un diol geminal, como se demuestra por espectroscopía de RMN.

10 En el método de acuerdo con la presente invención, el ácido hialurónico se disuelve en disolventes apróticos polares, por ejemplo DMSO, luego se añade un agente oxidante y la mezcla se agita a una temperatura de 10 a 50°C, preferiblemente a 20°C, durante como mínimo 5 minutos, preferiblemente durante 1 a 150 horas, más preferiblemente durante como mínimo 10 horas.

El hialuronano oxidado preparado se puede usar para unir compuestos que contienen, por ejemplo, un grupo amino. La unión se puede realizar en forma de imina o después de la reducción en forma de amina (aminación reductora) (esquema 7)



15

Esquema 7. Unión de aminas a hialuronano oxidado.

Ambos grados de esta modificación se realizan en solución acuosa, la disolución se realiza con NaBH<sub>3</sub>CN. Ambos grados de la reacción descrita en el esquema 7 se pueden realizar en una etapa.

20 La modificación del derivado de ácido hialurónico se puede realizar por reacción del derivado oxidado con una amina de la fórmula general H<sub>2</sub>N-R o con un hialuronano sustituido con un grupo -R-NH<sub>2</sub>, en el que R es un alquilo C<sub>1-30</sub> de cadena lineal o ramificada, que opcionalmente contiene grupos aromáticos o heteroaromáticos. Esta amina puede ser una alquilamina, por ejemplo butilamina o hexanodiamina, un aminoácido o polisacárido que contiene un grupo amino libre. En el caso de usar un grupo diamino o compuestos que contienen tres o más grupos amino, se pueden preparar derivados de hialuronano reticulados. Los derivados reticulados se pueden preparar también por  
25 reacción de un aldehído con un hialuronano sustituido por un grupo aminioalquilo HA-alquil-NH<sub>2</sub>.

#### Descripción detallada de las realizaciones preferentes de la invención

DS = grado de sustitución = 100% \* La cantidad molar del sustitutivo unido/la cantidad molar de todos los dímeros de polisacárido.

30 El término "equivalente (equiv)" tal como se usa aquí se refiere a un dímero de ácido hialurónico, a no ser que se indique lo contrario. Los porcentajes tal como se usan aquí significan un porcentaje en peso, a no ser que se indique lo contrario.

El peso molecular del hialuronano de partida (fuente: mancha CPN s.r.o., Dolni Dobrouc, CZ) se determinó por el ensayo SEC-MALLS.

Ejemplo 1: Oxidación del ácido hialurónico por DMP

35 Se añadió solución de DPM (0,2 equiv) en DMSO (1 ml) a una solución al 1% de ácido hialurónico (0,1 g, 20 kDa) en DMSO. La mezcla se agitó durante 24 horas a la temperatura de 20°C. La solución se diluyó luego a 0,1% y se dializó frente a 3 x 5 litros de la mezcla (0,1% de NaCl, 0,1% de NaHCO<sub>3</sub>) (una vez al día) y frente a 7 x 5 litros de agua destilada (2 veces al día). La solución resultante se evaporó y analizó.

DS 10% (determinado por RMN).

40 RMN <sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O) δ 5,26 (s, 1H, polímero-CH(OH)<sub>2</sub>)

HSQC (D<sub>2</sub>O) señal reticulada 5,26 ppm (<sup>1</sup>H)-90 ppm (<sup>13</sup>C) (polímero-CH(OH)<sub>2</sub>)

FT-IR (KBr) 1740 cm<sup>-1</sup> -CH=O

Ejemplo 2: Oxidación del ácido hialurónico por DPM

Se añadió solución de DPM (0,2 equiv) en DMSO (1 ml) a una solución al 0,5% de sal sódica de ácido hialurónico (0,1 g, 600 kDa) en DMSO. La mezcla se agitó durante 24 horas a la temperatura de 20°C. La solución se diluyó luego a 0,1% y se dializó frente a 3 x 5 litros de mezcla (0,1% de NaCl, 0,1% de NaHCO<sub>3</sub>) (una vez al día) y frente a 7 x 5 litros de agua destilada (2 veces al día). La solución resultante se evaporó y analizó..

DS 10% (determinado por RMN; para detalles véase el Ejemplo 1).

Ejemplo 3 : Oxidación del ácido hialurónico por DMP

Se añadió solución de DPM (1 equiv) en DMSO (1 ml) a una solución al 1% de ácido hialurónico (0,1 g, 20 kDa) en DMSO. La mezcla se agitó durante 24 horas a la temperatura de 20°C. La solución se diluyó luego a 0,1% y se dializó frente a 3 x 5 litros de la mezcla (0,1% de NaCl, 0,1% de NaHCO<sub>3</sub>) (una vez al día) y frente a 7 x 5 litros de agua destilada (2 veces al día). La solución resultante se evaporó y analizó.

DS 50% (determinado por RMN; para detalles véase el Ejemplo 1).

Ejemplo 4: Oxidación del ácido hialurónico por DMP

Se añadió solución de DPM (1 equiv) en DMSO (1 ml) a una solución al 1% de ácido hialurónico (0,1 g, 20 kDa) en DMSO. La mezcla se agitó durante 1 hora a la temperatura de 20°C. La solución se diluyó luego a 0,1% y se dializó frente a 3 x 5 litros de mezcla (0,1% de NaCl, 0,1% de NaHCO<sub>3</sub>) (una vez al día) y frente a 7 x 5 litros de agua destilada (2 veces al día). La solución resultante se evaporó y analizó.

DS 30% (determinado por RMN; para detalles véase el Ejemplo 1).

Ejemplo 5: Oxidación del ácido hialurónico por DMP

Se añadió solución de DPM (0,2 equiv) en DMSO (1 ml) a una solución al 1% de ácido hialurónico (0,1 g, 20 kDa) en DMSO. La mezcla se agitó durante 1 hora a la temperatura de 50°C. La solución se diluyó luego a 0,1% y se dializó frente a 3 x 5 litros de la mezcla (0,1% de NaCl, 0,1% de NaHCO<sub>3</sub>) (una vez al día) y frente a 7 x 5 litros de agua destilada (2 veces al día). La solución resultante se evaporó y analizó.

DS 10% (determinado por RMN; para detalles véase el Ejemplo 1).

Ejemplo 6: Reacción del hialuronano oxidado con una amina

Se mezcló una solución acuosa (1%) de ácido hialurónico oxidado (0,1%, grado de oxidación DS = 30%, Ejemplo 4) con butilamina (0,4 equiv). La mezcla se agitó a 20°C de temperatura durante 24 horas. La solución se precipitó luego por adición de una cantidad doble de acetona y 0,1 ml de solución acuosa saturada de NaCl, se filtró el precipitado y se secó en vacío. Luego se analizó el material amarillo resultante.

UV-VIS 328 nm,  $\rightarrow\pi^*$  transición-CH=N-

Ejemplo 7: Reacción del hialuronano oxidado con butilamina y posterior reducción

Se mezcló una solución acuosa (1%) de ácido hialurónico oxidado (0,1%, grado de oxidación DS = 50%, Ejemplo 3) con butilamina (0,4 equiv). La mezcla se agitó a 20°C de temperatura durante 24 horas. La solución se mezcló luego con NaBH<sub>3</sub>CN (3 equiv) en 0,5 ml de agua. La mezcla se agitó a 20°C de temperatura durante 24 horas. La solución se diluyó luego a 0,1% y se dializó frente a 3 x 5 l de la mezcla (0,1% de NaCl, 0,1% de NaHCO<sub>3</sub>) (una vez al día) y frente a 7,5 x 5 litros de agua destilada (dos veces al día). La solución resultante se evaporó y analizó.

DS 35% (determinado por RMN)

RMN <sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O)  $\delta$  3,05 (m, 2H, polímero-CH<sub>2</sub>-NH-CH<sub>2</sub>-), 1,60 (m, 2H, polímero-CH<sub>2</sub>-NH-CH<sub>2</sub>-), 1,35 (m, 2H polímero-CH<sub>2</sub>-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), 0,85 (m, 3H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>)

DOSY RMN logD (0,85 ppm, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>-) --10,3 m<sup>2</sup>/s

(D<sub>2</sub>O)

logD (1,35 ppm, polímero-CH<sub>2</sub>-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-) --10,3 m<sup>2</sup>/s

logD (1,60 ppm, polímero-CH<sub>2</sub>-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-) --10,3 m<sup>2</sup>/s

logD (3,05 ppm, polímero-CH<sub>2</sub>-NH-CH<sub>2</sub>-) --10,3 m<sup>2</sup>/s

logD (2,03 ppm, CH<sub>3</sub>-CO-NH-polímero) --10,3 m<sup>2</sup>/s

logD (H<sub>2</sub>O) --8,6 m<sup>2</sup>/s

## Ejemplo 8: Reacción del hialuronano oxidado con una diamina y posterior reducción

Se mezcló una solución acuosa (1%) de ácido hialurónico oxidado (0,1%, grado de oxidación DS = 50%, Ejemplo 3) con hexanodiamina (0,4 equiv). La mezcla se agitó a 20°C de temperatura durante 24 horas. La solución se mezcló luego con NaBH<sub>3</sub>CN (3 equiv) en 0,5 ml de agua. La mezcla se agitó a 20°C de temperatura durante 24 horas. La solución se diluyó luego a 0,1% y se dializó frente a 3 x 5 l de la mezcla (0,1% de NaCl, 0,1% de NaHCO<sub>3</sub>) (una vez al día) y frente a 7,5 x 5 litros de agua destilada (dos veces al día). La solución resultante se evaporó y analizó.

DS 35% (determinado por RMN)

RMN <sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O) δ 3,12 (m, 2H, polímero-CH<sub>2</sub>-NH-CH<sub>2</sub>-), 3,02 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>), 1,7 (m, 4H-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 1,45 (m, 4H, -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-)

10 DOSY RMN (D<sub>2</sub>O) logD (1,45 ppm, -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-)~10,5 m<sup>2</sup>/s

logD (1,7 ppm, -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-)~10,5 m<sup>2</sup>/s

logD (3,02 ppm, -CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>)~10,5 m<sup>2</sup>/s

log D (2,03 ppm, CH<sub>3</sub>-CO-NH-polímero)~m<sup>2</sup>/s

logD (H<sub>2</sub>O)~m<sup>2</sup>/s

## 15 Ejemplo 9: Reacción de hialuronano oxidado con amino-hialuronano

Se mezcló una solución acuosa (1%) de ácido hialurónico oxidado (0,1%, grado de oxidación DS = 30%, Ejemplo 4) con una solución acuosa al 1% de derivado de hialuronano sustituido con hexanodiamina (1 equiv DS=35%, Ejemplo 8) a la temperatura de 20°C. El precipitado gomoso compacto, insoluble, obtenido después de varios minutos, se desmenuzó manualmente en piezas pequeñas que se filtraron y secaron a presión reducida,

20 FT-IR (KBr) 1700 cm<sup>-1</sup>.

## Ejemplo 10: Aminación reductora del hialuronano oxidado con lisina

Se mezcló una solución acuosa (1%) de ácido hialurónico oxidado (0,1%, grado de oxidación DS = 30%, Ejemplo 4) con lisina (0,3 equiv). La mezcla se agitó a 20°C de temperatura durante 24 horas. La solución se mezcló luego con NaBH<sub>3</sub>CN (3 equiv) en 0,5 ml de agua. La mezcla se agitó a 20°C de temperatura durante 24 horas. La solución se diluyó luego a 0,1% y se dializó frente a 3 x 5 l de la mezcla (0,1% de NaCl, 0,1% de NaHCO<sub>3</sub>) (una vez al día) y frente a 7,5 x 5 litros de agua destilada (dos veces al día). La solución resultante se evaporó y analizó.

DS 25% (determinado por RMN)

30 RMN <sup>1</sup>H, HSQC, DOSY (2% de NaOD/D<sub>2</sub>O) δ 1,33 (m, 2H, -CH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), 1,48 (m, 2H, -CH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), 1,55 (m, 1H, -CH-CHH-), 1,63 (m, 1H, -CH-CHH), 2,62 (m, 2H, -CH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), 2,65 (m, 1H, polímero-CHH-NH-), 2,99 (m, 1H, polímero-CHH-NH), 3,16 (m, 1H, -CH-CK<sub>2</sub>-).

## Ejemplo 11: Aminación reductora del hialuronano oxidado con lisina

35 Se mezcló una solución acuosa (1%) de ácido hialurónico oxidado (0,1%, grado de oxidación DS = 30%, Ejemplo 4) con lisina (20 equiv). La mezcla se agitó a 20°C de temperatura durante 24 horas. La solución se mezcló luego con NaBH<sub>3</sub>CN (10 equiv) en 0,5 ml de agua. La mezcla se agitó a 20°C de temperatura durante 24 horas. La solución se diluyó luego a 0,1% y se dializó frente a 3 x 5 l de la mezcla (0,1% de NaCl, 0,1% de NaHCO<sub>3</sub>) (una vez al día) y frente a 7,5 x 5 litros de agua destilada (dos veces al día). La solución resultante se evaporó y analizó.

DS 28% (determinado por RMN, Ejemplo 10))

## Ejemplo 12: Aminación reductora del hialuronano oxidado con serina

40 Se mezcló una solución acuosa (1%) de ácido hialurónico oxidado (0,1%, grado de oxidación DS = 30%, Ejemplo 4) con serina (0,3 equiv). La mezcla se agitó a 20°C de temperatura durante 1 minuto. La solución se mezcló luego con NaBH<sub>3</sub>CN (3 equiv) en 0,5 ml de agua. La mezcla se agitó a 20°C de temperatura durante 24 horas. La solución se diluyó luego a 0,1% y se dializó frente a 3 x 5 l de la mezcla (0,1% de NaCl, 0,1% de NaHCO<sub>3</sub>) (una vez al día) y frente a 7,5 x 5 litros de agua destilada (dos veces al día). La solución resultante se evaporó y analizó.

DS 26% (determinado por RMN)

45 RMN <sup>1</sup>H, HSQC, DOSY (2% de NaOD/D<sub>2</sub>O): δ 2,74 (m, 1H, polímero-CHH-NH-), 3,08 (m, 1H, polímero-CHH-NH-), 3,21 (m, 1H, -CH-CH<sub>2</sub>-OH), 3,72 (m, 1H, -CH-CHH-OH), 3,78 (m, 1H, -CH-CHH-OH).

## Ejemplo 13: Aminación reductora del hialuronano oxidado con arginina

Se mezcló una solución acuosa (1%) de ácido hialurónico oxidado (0,1%, grado de oxidación DS = 30%, Ejemplo 4) con arginina (0,3 equiv). La mezcla se agitó a 20°C de temperatura durante 100 horas. La solución se mezcló luego

con  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  (3 equiv) en 0,5 ml de agua. La mezcla se agitó a  $20^\circ\text{C}$  de temperatura durante 24 horas. La solución se diluyó luego a 0,1% y se dializó frente a 3 x 5 l de la mezcla (0,1% de  $\text{NaCl}$ , 0,1% de  $\text{NaHCO}_3$ ) (una vez al día) y frente a 7,5 x 5 litros de agua destilada (dos veces al día). La solución resultante se evaporó y analizó.

DS 23% (determinado por RMN)

- 5 RMN  $^1\text{H}$ , HSQC, DOSY (2% de  $\text{NaOD}/\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  1,61 (m, 1H,  $-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ ), 1,63 (m, 1H,  $-\text{CH}-\text{CHH}-$ ), 1,70 (m, 1H,  $-\text{CH}-\text{CHH}-$ ), 2,65 (m, 1H, polímero- $\text{CHH}-\text{NH}-$ ), 3,01 (m, 1H, polímero- $\text{CHH}-\text{NH}-$ ), 3,13 (m, 1H,  $-\text{CH}-\text{CH}_2-$ ), 3,21 (m, 2H,  $\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ ).

Ejemplo 14: Aminación reductora del hialuronano oxidado con pentapéptido PAL-KTTKS (palmitoil-Lys-Thr-Thr-Lys-Ser)

- 10 Se mezcló una solución acuosa (1%) de ácido hialurónico oxidado (0,1%, grado de oxidación DS = 10%, Ejemplo 1) en un sistema agua/isopropanol 2/1 con una solución al 1% de pentapéptido sustituido PAL-KTTKS (0,05 equiv) en alcohol isopropílico. La mezcla se agitó a  $20^\circ\text{C}$  de temperatura durante 24 horas. La solución se mezcló luego con  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  (3 equiv) en 0,5 ml de agua. La mezcla se agitó a  $20^\circ\text{C}$  de temperatura durante 24 horas. La solución se diluyó luego a 0,1% y se dializó frente a 3 x 5 l de la mezcla (0,1% de  $\text{NaCl}$ , 0,1% de  $\text{NaHCO}_3$ ) (una vez al día) y frente a 7,5 x 5 litros de agua destilada (dos veces al día). La solución resultante se evaporó y analizó.

15 DS 8% (determinado por RMN)

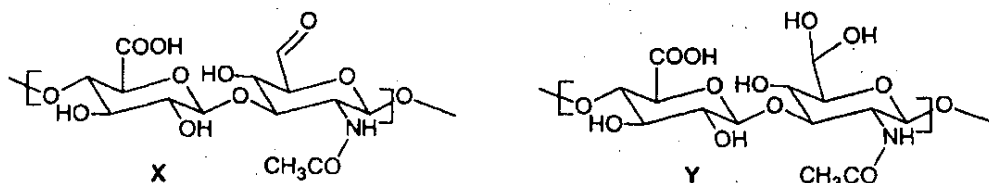
RMN  $^1\text{H}$ , HSQC, DOSY (2% de  $\text{NaOD}/\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  1,61 (m, 1H,  $-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ ), 1,63 (m, 1H,  $-\text{CH}-\text{CHH}-$ ), 1,70 (m, 1H,  $-\text{CH}-\text{CHH}-$ ), 2,65 (m, 1H, polímero- $\text{CHH}-\text{NH}-$ ), 3,01 (m, 1H, polímero- $\text{CHH}-\text{NH}-$ ), 3,13 (m, 1H,  $-\text{CH}-\text{CH}_2-$ ), 3,21 (m, 2H,  $\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ ).

20



## REIVINDICACIONES

1. Un derivado de ácido hialurónico, oxidado en la posición 6 de la parte de glucosamina a aldehído de acuerdo con la fórmula X, y su forma hidratada, el diol denominado geminal de acuerdo con la fórmula Y.



- 5 2. Un método de preparación del derivado de ácido hialurónico de la reivindicación 1, en el que el ácido hialurónico reacciona con periodinano de Dess-Martin (DMP) en un disolvente aprótico polar, especialmente en sulfóxido de dimetilo.
3. El método de preparación de la reivindicación 2, en el que el ácido hialurónico está en forma de ácido libre o una sal.
- 10 4. El método de preparación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 o 3, en el que el peso molecular del ácido hialurónico está en el intervalo de  $1 \cdot 10^4$  a  $5 \cdot 10^6$  g.mol<sup>-1</sup>.
5. El método de preparación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en el que la reacción del ácido hialurónico con periodinano de Dess-Martin (DMP) se realiza a una temperatura en el intervalo de 10 a 50°C, preferiblemente a 20°C, durante 5 minutos a 150 horas, preferiblemente durante como mínimo 10 horas.
- 15 6. El método de preparación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, en el que el DMP está presente en una cantidad en el intervalo de 0,05 a 1 equivalente respecto al dímero de ácido hialurónico.
- 20 7. El método de modificación del derivado de ácido hialurónico preparado usando el método de cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, en el que el derivado de ácido hialurónico oxidado reacciona con una amina de fórmula general H<sub>2</sub>N-R o con un hialuronano sustituido por un grupo -R-NH<sub>2</sub>-, en el que R es un alquilo C<sub>1-30</sub> de cadena lineal o ramificada, que opcionalmente contiene grupos aromáticos o heteroaromáticos.
8. El método de modificación de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el derivado de ácido hialurónico oxidado reacciona con un aminoácido.
9. El método de modificación de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el derivado de ácido hialurónico oxidado reacciona con un péptido.
- 25 10. El método de modificación de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el derivado de ácido hialurónico oxidado reacciona con un polisacárido que contiene un grupo amino libre.
11. El método de modificación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, en el que la cantidad de amina, aminoácido, péptido o polisacárido está en el intervalo de 0,05 a 10 equivalentes respecto al dímero de hialuronano.
- 30 12. El método de modificación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11, en el que la reacción del derivado de ácido hialurónico oxidado con la amina, el aminoácido, el péptido o el polisacárido se realiza en agua o en un sistema agua-disolvente orgánico a una temperatura en el intervalo de 0 a 80°C, preferiblemente a 20°C, durante 1 minuto a 24 horas, preferiblemente durante 1 hora.
- 35 13. El método de modificación de acuerdo con la reivindicación 12, en el que la reacción del derivado de ácido hialurónico oxidado con la amina, el aminoácido, el péptido o el polisacárido se realiza en presencia de NaBH<sub>3</sub>CN como agente de reducción, que se añade a la mezcla de reacción después de 0 a 100 horas de haber añadido la amina, el aminoácido, el péptido o el polisacárido.
14. El método de modificación de acuerdo con la reivindicación 13, en el que la cantidad de NaBH<sub>3</sub>CN como agente de reducción está en el intervalo de 0 a 20 equivalentes molares respecto a la cantidad de aldehído o diol geminal.
- 40 15. El método de modificación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, en el que el disolvente orgánico se selecciona entre el grupo que comprende alcoholes miscibles con agua, especialmente isopropanol o etanol, y por disolventes apróticos polares miscibles con agua, en especial sulfóxido de dimetilo.
16. El método de modificación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15, en el que la cantidad de agua es de como mínimo 50% (v/v) respecto al volumen de la solución total.