

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 549 668**

51 Int. Cl.:

**C08B 37/08** (2006.01)  
**A61L 27/20** (2006.01)  
**A61K 8/73** (2006.01)  
**A61L 15/28** (2006.01)  
**A61L 26/00** (2006.01)  
**A61L 31/04** (2006.01)  
**A61Q 19/00** (2006.01)  
**A61Q 19/08** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.02.2013 E 13714185 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.09.2015 EP 2820051**

54 Título: **Derivados basados en ácido hialurónico, capaces de formar hidrogeles, método de preparación de los mismos, hidrogeles basados en dicho derivados, método de preparación de los mismos y uso**

30 Prioridad:

**28.02.2012 CZ 20120136**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**30.10.2015**

73 Titular/es:

**CONTIPRO BIOTECH S.R.O. (100.0%)  
Dolni Dobrouc 401  
56102 Dolni Dobrouc, CZ**

72 Inventor/es:

**WOLFOVA, LUCIE;  
PRAVDA, MARTIN;  
FOGLAROVA, MARCELA;  
NEMCOVA, MIROSLAVA;  
NIEDOBA, KRZYSTOF y  
VELEBNY, VLADIMIR**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

ES 2 549 668 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 basados en ácido hialurónico, capaces de formar hidrogeles, método de preparación de los mismos, hidrogeles basados en dicho derivados, método de preparación de los mismos y uso

## Campo de la técnica

- 5 La invención se refiere a un nuevo derivado de ácido hialurónico que es adecuado para la preparación de hidrogeles, y un método de preparación del mismo. Además, esta se refiere a hidrogeles basados en dicho derivado, propiedades de los mismos, uso y método de preparación de los mismos.

## Estado de la técnica

- 10 El hialuronano es un polisacárido que consiste en unidades de disacáridos compuestas por ácido D-glucurónico y N-acetil-D-glucosamina que se unen alternando enlaces glicosídicos  $\beta$ -1,4 y  $\beta$ -1,3. El peso molecular medio ponderal (si en lo sucesivo se menciona el peso molecular, será siempre el peso molecular medio ponderal) *in vivo* está dentro del intervalo de 3 kDa - 20 MDa. Es un polisacárido que es fácilmente soluble en un medio acuoso en el que forma disoluciones altamente viscosas, dependiendo de su peso molecular y concentración.

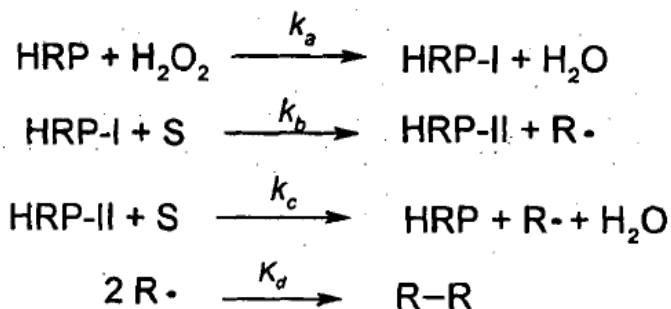
- 15 Los hidrogeles son materiales que se forman en agua mediante una red insoluble de al menos polímeros parcialmente hidrófilos<sup>1</sup>. Existen varias maneras de producir una red insoluble a partir de un polímero inicialmente hidrófilo. Es hidrofobización polimérica<sup>2</sup> o el uso de un derivado de polímero soluble en agua que porta grupos funcionales reactivos que pueden tomar parte en otras reacciones químicas que llevan a la formación de una red polimérica 3-dimensional<sup>3-5</sup>.

- 20 La preparación de derivados de hialuronano solubles y la siguiente reticulación de los mismos han sido descritas por diversos autores<sup>3-6</sup>. En el pasado, también se ha descrito el uso de derivados de fenol hialuronano para reacciones de reticulación y la preparación de hidrogeles. Calabro *et al.*,<sup>4,7,8</sup> describen el método de preparación de derivados de fenol hialuronano por medio de una reacción de carboxilos que están presentes dentro de la estructura del ácido D-glucurónico de hialuronano con derivados de aminoalquilo de fenol. Esta reacción produce hialuronano amidas. La característica crucial para el procedimiento de dicha síntesis es la activación del carboxilo de hialuronano, para lo cual se usa la reacción con agentes deshidratantes de tipo carbodiimida (tal como EDC). El aminoalquil fenol más frecuentemente usado es tiramina<sup>6</sup>.

- 30 En general, la reticulación de derivados de fenol hialuronano se inicia añadiendo una peroxidasa (tal como, la peroxidasa de rábano picante - HRP) y una disolución de peróxido de hidrogeno diluido. La peroxidasa de rábano picante (Horseradish peroxidase, HRP, E.C.1.1.1.1.7) se utiliza ampliamente en la actualidad como catalizador de reacciones orgánicas y de biotransformación<sup>9-13</sup>. Se caracteriza por una especificidad de sustrato muy amplia y por lo tanto, es capaz de oxidar varios compuestos tanto orgánicos como inorgánicos<sup>13-15</sup>.

- 35 Es una enzima que comprende hierro que contiene hemo, como grupo prostético. El hierro tiene el grado de oxidación (III) en el estado no-activado de la enzima. La reacción con peróxidos lleva a la formación de un intermedio que se denomina HRP-I. El hierro hemo Fe<sup>(III)</sup> se oxida a grupo oxiferrilo (Fe<sup>(IV)</sup>=O) y al mismo tiempo, se forma un radical catiónico  $\pi$  en el ciclo de la porfirina. Dicha enzima activada es capaz de formar complejos con las moléculas del sustrato que, durante esta interacción, sufre una oxidación.<sup>14,16-18</sup>

- 40 La conversión de la enzima oxidada de vuelta a la forma inicial de la misma se realiza en dos etapas. En la primera etapa, tiene lugar una reacción entre la molécula del sustrato (S) y HRP-I, dando lugar al sustrato radical (R•) y a una forma parcialmente reducida de la enzima HRP-II. La HRP-II aún retiene el grupo oxiferrilo (Fe<sup>(IV)</sup>=O) pero ya no contiene el radical  $\pi$  de la porfirina. Durante la transición de un electrón al radical porfirina un H<sup>+</sup> es tomado al mismo tiempo por la proteína. La HRP-II se somete de nuevo a la reacción con el sustrato, dando lugar a R•. El grupo oxiferrilo (Fe<sup>(IV)</sup>=O) se reduce de vuelta a Fe<sup>(III)</sup> durante esta reacción. Este proceso se asocia con la transferencia de 2 H<sup>+</sup> al oxígeno del grupo oxiferrilo. Un protón se origina a partir del sustrato (o disolvente), la otra forma de proteína. Esto da como resultado la formación de una molécula de agua (Ecuación I y Esquema I).



45

## Ecuación I: Descripción básica del mecanismo de catálisis de oxidación de sustrato por medio de HRP

Los radicales obtenidos del sustrato son capaces en varios casos de interactuar juntos, formando dímeros R-R. Este procedimiento ya no se ve afectado enzimáticamente y se asocia con la estabilidad y reactividad de los radicales resultantes.<sup>14,16-26</sup>

5 Por lo tanto, en caso de una reacción de reticulación enzimática del derivado de fenol de polisacárido, el sustrato (ligando fenol - reactivo unido al polímero) es transformado por una enzima en un radical reactivo. Este radical puede luego reaccionar con otro radical fenol, formando ditiramina. Suponiendo una libre movilidad de la moléculas del sustrato (ligando) de la reacción enzimática y la consecución de la reacción copiando exactamente la Ecuación I, la enzima debería transformar gradualmente (siempre que se use una cantidad suficiente de peróxido) todas las moléculas de sustrato en radicales reactivos y estos deberían sufrir gradualmente dimerización (u oligomerización), si se proporciona un tiempo de reacción suficientemente largo. En caso de unir el sustrato (ligando) al polímero, el grado de reticulación del polímero debería alcanzar siempre el mismo valor, pese a que el tiempo para alcanzar este valor puede diferir dependiendo de la cantidad usada de enzima. Sin embargo, en la práctica es diferente. La bibliografía<sup>27</sup> describe con detalle las relaciones entre la relación esperada de reticulación intramolecular e intermolecular y el peso molecular de los segmentos de polímero entre los sitios de reticulación (densidad de reticulación, la distancia entre los nudos de red), mientras que las interacciones intramoleculares que llevan a la reticulación se indican como no eficaces elásticamente, comparada con la reticulación intermolecular.

Además, se conoce a partir de la bibliografía que en el caso de usar los derivados fenólicos de ácido hialurónico (HA, del inglés hyaluronic acid), la cantidad de enzima afecta no sólo a la velocidad de la reacción de reticulación, sino que también afecta significativamente las propiedades mecánicas resultantes de los hidrogeles<sup>4,6,7,28</sup>. La bibliografía establece que a través de mediciones reológicas se ha encontrado que el módulo de cizalla (G') es mayor si se usa una mayor concentración de la enzima. La causa de este fenómeno, según los autores, es una mayor densidad de reticulación de los hidrogeles. Si se desea preparar un hidrogel de máxima firmeza, la reacción de reticulación debe realizarse a una concentración relativamente alta de peroxidasa y, por lo tanto, también de forma más rápida. Sin embargo, realizar muy rápidamente la reacción puede llevar a la formación de un hidrogel reticulado no homogéneo. Como consecuencia, pueden aparecer sitios en las muestras que no se han reticulado en absoluto. Asimismo, realizar muy rápidamente la reacción también puede causar problemas a la hora de colocar el gel en el sitio de la aplicación final del mismo y similares.

La causa de esto es una pequeña distancia desde el centro activo a la cadena polimérica básica. La baja movilidad del ligando disminuye la probabilidad de una colisión eficaz de los radicales ligando para formar ditiramina. Por lo tanto, si hay una baja concentración de la enzima dentro del sistema, se puede formar una pequeña cantidad de formas de ligando reactivas en una unidad de tiempo. Así, la reacción de reticulación procede lentamente y es poco eficaz.

Park *et al.*,<sup>29</sup> trataron de aumentar la reactividad de los ligandos unidos al polímero insertando un espaciador adecuado entre el ligando reactivo y la cadena polimérica. El documento describe la inserción de una cadena hidrófila entre la cadena de polisacárido y anillo de fenol o anilina, con el fin de aumentar la reactividad de estos sustitutos. El principal motivo de introducir la cadena hidrófila en la estructura del polímero fue mejorar la solubilidad del mismo y mejorar la accesibilidad de los centros reactivos (anillo de fenol o anilina). Una más fácil accesibilidad espacial de los centros reactivos aumenta la probabilidad de la reacción entre los ligandos. Lo más frecuente es que al tiempo que se mantiene la misma actividad enzimática, esta etapa lleve a un mayor grado de sustitución, una mayor concentración y mejor homogeneidad de la reticulación del hidrogel. Asimismo, según el autor, gracias a la introducción de esta cadena hidrófila en la estructura del hidrogel, aumentaron la bioestabilidad y las propiedades mecánicas del hidrogel. Sin embargo, Park *et al.*, usan como "espaciador" un polímero hidrófilo PEG con un peso molecular de 3.500 Da, y por lo tanto, al final es más bien un copolímero. Sin embargo, esta intervención en la estructura del hidrogel, incluso en un bajo grado de sustitución, lleva a cambios significativos de las propiedades físicas del polímero original. Asimismo, en el caso de hialuronano, una mayor concentración de reticulación lleva a una dureza aumentada del hidrogel, pero al mismo tiempo también lleva a una fragilidad aumentada del mismo, que es indeseable para el uso previsto en la ingeniería de tejidos. Cuando un material se destina a la elaboración de matrices, por ejemplo, pero no sólo de matrices para cartílago articular, se pone el acento en la resistencia suficiente del mismo, mientras que un material que es frágil se deforma irreversiblemente ante una mayor carga y, en el caso de hidrogeles, incluso puede ocurrir una destrucción total de los mismos.

## Compendio de la invención

El objeto de la invención, por lo tanto, es encontrar un material que sea lo suficientemente fuerte y al mismo tiempo tenaz y que no muestre cambios significativos de las propiedades biológicas y físicas comparado con el polímero original. La fuerza del hidrogel basado en hialuronano puede aumentarse generalmente aumentando la concentración de reticulación, tal como aumentado la concentración del polímero en la disolución a partir de la cual se forma el hidrogel, o aumentado el grado de sustitución del polímero. Sin embargo, en el estado de la técnica en el caso del hialuronano, ambos de estos métodos han llevado también a una fragilidad aumentada del hidrogel resultante que limita significativamente los posibles usos del hidrogel.

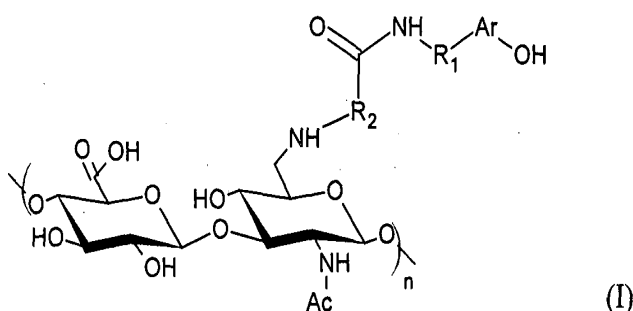
El problema solucionado por esta invención consiste en encontrar tales derivados que llevarían a una reactividad de ligando aumentada y una fuerza de hidrogel aumentada, al tiempo que se mantienen las propiedades físicas y biológicas del polímero original. Sorprendentemente, se ha encontrado que introduciendo un espaciador relativamente corto (con un peso molecular de aproximadamente 130 Da) según la invención entre el ligando reactivo y HA da como resultado un aumento significativo de la tenacidad de los hidrogeles finales ya con un muy bajo grado de sustitución.

Por lo tanto, en un aspecto la invención se refiere a un derivado de HA que porta ligandos reactivos unidos a través de espaciadores hidrófobos, con el fin de aumentar la movilidad de los ligandos y aumentar así la probabilidad de una colisión eficaz de los mismos, incluso en el caso de una baja concentración de los mismos (bajo grado de sustitución y baja actividad enzimática). Se ha encontrado que pese a una muy baja abundancia de peso del espaciador dentro del hidrogel, con hacer, por ejemplo, únicamente 0,01 a 0,02%, se logra un significativo aumento de la tenacidad y fuerza del hidrogel comparado con un hidrogel basado en un derivado HA análogo sin un espaciador insertado (es decir, concentración, peso en moles y grado of sustitución / reticulación idénticos). Por lo tanto, la invención se refiere a este nuevo derivado de hialuronano adecuado para la preparación de hidrogeles y un método de preparación de los mismos. Además, esta se refiere a hidrogeles basados en este derivado, el uso de los mismos y el método de preparación de los mismos.

El hidrogel se prepara mediante un método en el que se usa reticulación de las cadenas del hialuronano modificado por medio de una reacción que es catalizada por peroxidasa de rábano picante o análogos de la misma. Los derivados de hialuronano adecuados contienen en su estructura anillos de fenol o heteroaril fenol enlazados covalentemente a la cadena de polisacárido básica. El procedimiento de reticulación puede describirse como una cascada de reacciones químicas consecutivas que comienza con la formación de las formas reactivas de oxígeno (ROS) dentro del sistema. Estas se añaden a la mezcla o se habilita su formación mediante la presencia de compuestos químicos que sirven como un "generador" de las mismas. Las ROS activan la enzima peroxidasa o análogos de la misma que catalizan posteriormente la dimerización (u oligomerización) de anillos aromáticos o heteroaromáticos presentes en la estructura del derivado de hialuronano. Esto lleva a la formación de una red polimérica tridimensional.

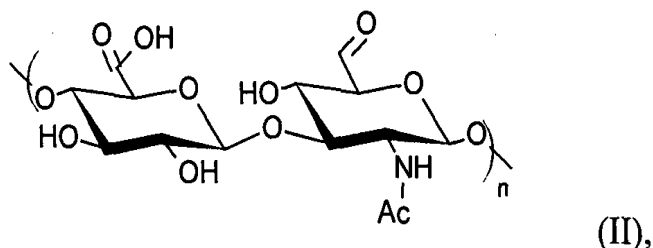
Según la invención, se usa hialuronano modificado uniendo un ligando que contiene aminoalquil fenol o aminoalquil heteroaril fenol (por ejemplo, tiramina, 5-hidroxi-triptofano, serotonina) para la preparación de este hidrogel. Los derivados de hialuronano descritos en esta invención, contienen un ligando unido a un polisacárido por medio de un espaciador. La presencia de este espaciador dentro de la estructura del derivado de HA lleva, gracias a su flexibilidad, a un aumento de la elasticidad y libertad de posibilidades de disposiciones conformacionales de los segmentos de polímeros participantes, y así también la posibilidad de disipación de la energía de deformación. La introducción de un espaciador también aumenta la distancia entre el centro aromático reactivo (fenol, heteroaril fenol) y la cadena de polímero básica, mejora la accesibilidad del mismo para una interacción con la enzima y afecta significativamente el curso de la reacción de reticulación y las propiedades del hidrogel resultante.

En su primer aspecto, la invención se refiere al derivado basado en ácido hialurónico según la fórmula general (I)

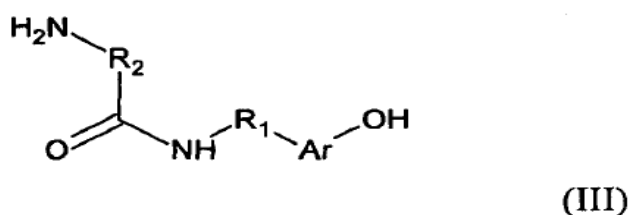


donde Ar es fenilo y R<sub>1</sub> es etileno, o Ar es indolo y R<sub>1</sub> es etileno, o Ar es indolo y R<sub>1</sub> es carboxietileno, y donde R<sub>2</sub> es un alquilo que tiene de 3 to 7 átomos de carbono, y donde n está dentro del intervalo de 1 a 7.500.

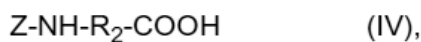
En otro aspecto, la invención se refiere al método de preparación del derivado según la fórmula general (I), donde se primero se prepara un derivado aldehídico de ácido hialurónico según la fórmula (II),



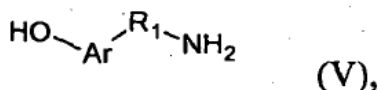
5 donde el derivado de aldehído se prepara usando el sistema de oxidación 4-acetamido-TEMPO/NaClO en un medio prótico y tiene el grado de sustitución 5 - 15% y el peso molecular dentro del intervalo 10.000 g/mol a 2.000.000 g/mol, a continuación se prepara el compuesto de forma separada según la fórmula general (III)



10 donde Ar es fenilo y R1 es etileno, o Ar es indolo y R1 es etileno, o Ar es indolo y R1 es carboxietileno, y donde R2 es un alquilo que tiene de 3 a 7 átomos de carbono, y donde n está dentro del intervalo de 1 a 7.500, en donde el compuesto según la fórmula general (III) se prepara por una reacción de un precursor espaciador según la fórmula (IV)

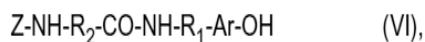


donde Z es un grupo protector que se usa comúnmente para la protección del grupo amino primario, siendo el ligando según la fórmula (V)



15 en un medio aprótico a una temperatura en el intervalo de 40°C a 150°C durante 1 a 24 horas en presencia de un agente que activa los grupos funcionales carboxilo,

formando el compuesto según la fórmula general (VI)



20 a partir del cual se prepara el compuesto según la fórmula general (III) retirando el grupo protector Z,

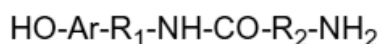
y a continuación se hace reaccionar el derivado aldehídico de ácido hialurónico según la fórmula (II) con el compuesto según la fórmula general (III) a un pH dentro del intervalo de 3 a 8, a temperatura ambiente durante 1 a 72 horas, en presencia de complejo picolin-borano, para formar el derivado según la fórmula (I).

25 Por lo tanto, el derivado según la invención contiene un ligando capaz de sufrir oligomerización por medio de un tratamiento mediante un agente adecuado, y un espaciador flexible que se inserta entre la cadena de hialuronano y el ligando. El ligando según la fórmula general (V) según la invención, se selecciona preferiblemente del grupo que comprende tiramina, serotonina y 5-hidroxitriptofano. El compuesto según la fórmula general (IV), es decir, el precursor espaciador, se selecciona preferiblemente del grupo de aminoácidos que incluyen derivados de ácidos ω-[(terc-butoxicarbonil) amino] carboxílicos en donde R2 es un alquilo que tiene de 3 to 7 átomos de carbono.

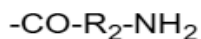
30 En otra realización preferida del método según la invención, la reacción del precursor espaciador con el ligando tiene lugar en THF o DMF a 50°C durante 2 a 6 horas en presencia de 1,1'-carbodiimidazol.

Además, se prefiere que la retirada del grupo protector Z se realice por medio de trifluoro y ácido acético o ácido clorhídrico.

Sólo en beneficio de esta invención, el intermedio espaciador-ligando se representa mediante los compuestos según la fórmula general:



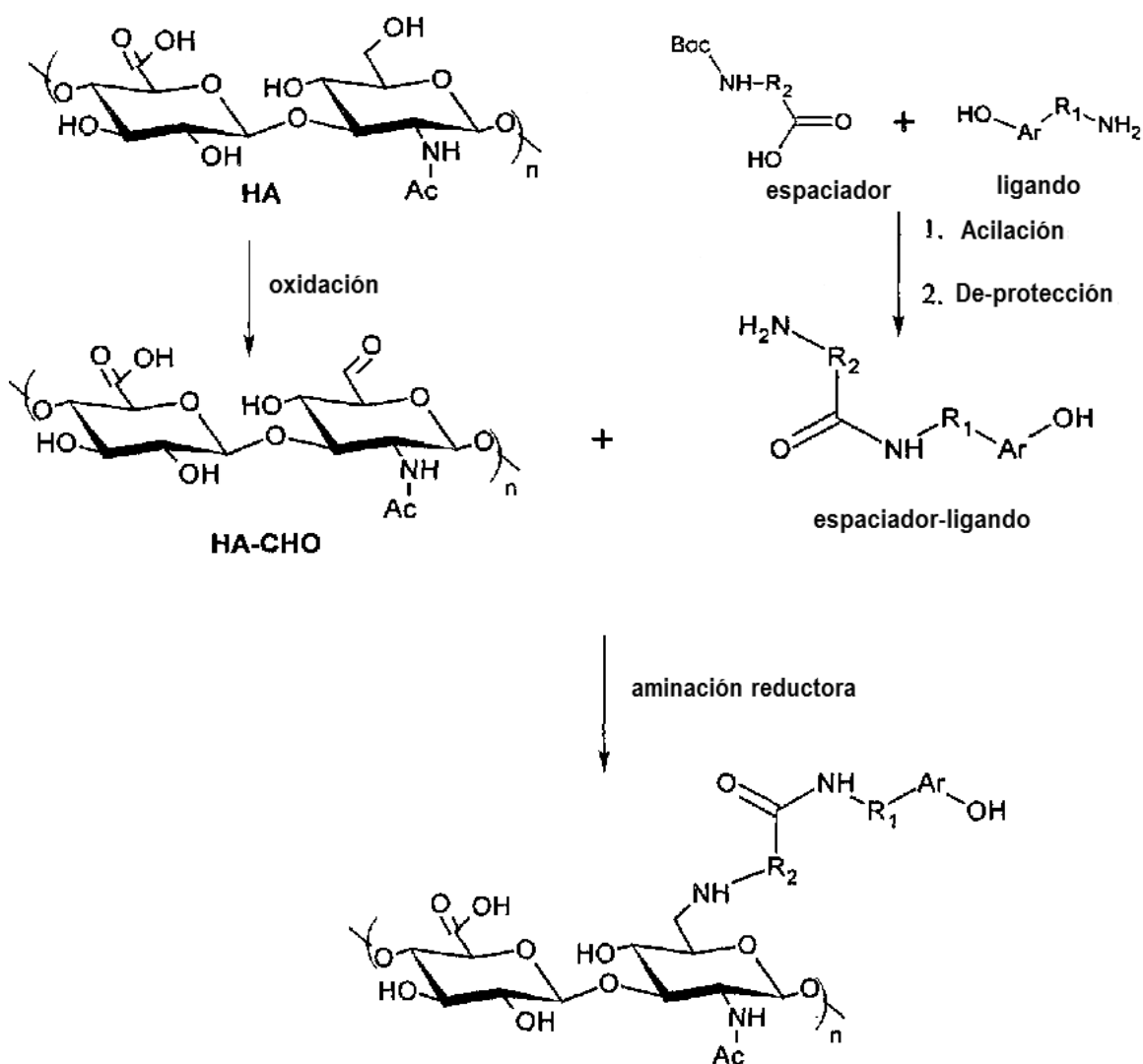
Preferiblemente, el compuesto según la fórmula general:



5

donde R<sub>2</sub> es un alquilo que tiene de 3 a 7 átomos de carbono, se usa como un espaciador.

El método de preparación del derivado según la invención puede caracterizarse por el Esquema 1 :



10

Esquema 1.: Ejemplo de un posible método de preparación del derivado de HA-espaciador-ligando según la invención

15

Además, la invención se refiere al hidrogel formado por reticulación del derivado según la fórmula general (I) y a un método de preparación del mismo. Este método de preparación del hidrogel consiste en que el derivado según la fórmula general (I) se trata mediante un generador de radicales fenoxi reactivos, preferiblemente mediante un sistema de peroxidasa de rábano picante y una fuente de raciales hidroxilo, que puede ser una disolución de peróxido de hidrógeno en agua, o un sistema de oxidasa - oxígeno - sustrato, por ejemplo, galactosa oxidasa - glucosa oxidasa - glucosa, a un pH en el intervalo de 4 a 10.

20

Por lo tanto, para la oligomerización de los ligandos reactivos, se usan agentes que son capaces de producir la formación de radicales fenoxi a partir de los anillos aromáticos de ligandos. Según esta invención, se usa preferiblemente el sistema peróxido / peroxidasa de rábano picante. El peróxido se puede introducir en el sistema en forma de una disolución diluida, o se genera mediante una reacción química *in situ*. El peróxido de hidrógeno se

puede generar en la mezcla por medio de diversos tipos de enzimas (oxidasa) a partir de oxígeno, como un aceptor de electrones, y un respectivo donante de electrones en una reacción de oxidación - reducción. Preferiblemente, una combinación de galactosa oxidasa o glucosa oxidasa y los sustratos de las mismas: se pueden usar galactosa y glucosa. Otros agentes que son capaces de causar la formación de radicales fenoxi en presencia de oxígeno molecular son enzimas tirosinasa, lactasa etc.

Las propiedades de estos hidrogeles son, como es generalmente conocido, afectadas por la estructura química del polímero y la concentración del mismo, así como los tipos seleccionados de agentes de reticulación y la cantidad usada de los mismos. Las propiedades físico químicas del polímero (derivado de HA) se ven sobre todo afectadas por la estructura del monómero, conformación de los segmentos de cadena del polímero, grado de reticulación y peso molecular. Las propiedades mecánicas del polímero también se ven afectadas por las características anteriores. Cuando el polímero se somete a un esfuerzo mecánico, se produce una deformación del mismo en donde una parte de la energía de deformación absorbida se disipa - consume para el cambio de la conformación de los nudos de red y los segmentos de cadena polimérica y una parte de la energía se transforma irrevocablemente en calor. La cantidad de energía disipada, y así también la posibilidad de adoptar diversas disposiciones de conformación dentro de la estructura del polímero, se asocia con la rigidez de las cadenas macromoleculares y refleja el grado de resistencia elástica del material a la deformación. Los materiales poliméricos compuestos por cadenas rígidas no flexibles y segmentos de las mismas pueden luego mostrar un bajo grado de resistencia elástica a la deformación y fragilidad.

El aumento de elasticidad de estos polímeros se lleva a cabo según el método de la invención donde se introducen segmentos flexibles en la estructura del polímero. Dichos segmentos se caracterizan por una mayor libertad de las moléculas individuales alrededor de sus uniones por lo que se logra un aumento de posibilidades de disposición conformacional cuando se someten a energía de deformación, y de posibilidades de disipación de dicha energía. Por lo tanto, la introducción de un espaciador flexible adecuado entre el ligando y la cadena de hialuronano básica lleva al logro de una mayor elasticidad, tenacidad y resistencia del material final, lo cual es muy beneficioso para, por ejemplo, hidrogeles destinados a la elaboración de matrices para tratar defectos de ciertos tejidos expuestos a cargas superiores, tal como cartílago articular o huesos. Como se describió previamente, la introducción del espaciador flexible entre el ligando y la cadena de hialuronano básica también se puede usar preferiblemente, en el caso donde las propiedades mecánicas de los hidrogeles dependen de la concentración de la enzima usada como catalizador de reacción de reticulación. La introducción del espaciador flexible entre el ligando y la cadena de hialuronano básica proporciona una accesibilidad estérica suficiente de los grupos reactivos del derivado para dimerización mutua, incluso después de una reticulación parcial del polímero.

Esta disolución da como resultado que la reacción de reticulación sea más eficaz lo que produce una mayor homogeneidad de los hidrogeles preparados y así se consigue superar los problemas tecnológicos asociados con la reticulación de hialuronano modificado por hidroxifenilo o heteroaril fenol (tiramina, serotonina etc.) en el caso donde los agentes de reticulación son peroxidasa de rábano picante y peróxido de hidrógeno (u otro tipo de generador de radicales fenoxi).

Sin embargo, sorprendentemente los autores de la presente invención han encontrado además que la introducción de sus espaciadores seleccionados entre el ligando y la cadena de hialuronano básica lleva, incluso con un grado de sustitución muy bajo, a un significativo aumento del grado de elasticidad, tenacidad y resistencia del hidrogel final basado en dicho derivado de HA.

Además, la invención se refiere al uso de hidrogeles basados en los derivados según la invención, especialmente en el campo de la ingeniería de tejidos, cosméticos, medicina y medicina regenerativa. El uso de los hidrogeles descrito en esta solicitud, está especialmente dirigido al material básico para la formación de matrices en la ingeniería de tejidos, principalmente en el campo del tratamiento de defectos articulares y de huesos, tal como apósitos para curar heridas, como barrera biodegradable que impide la formación de coalescencias post-cirugía, para el aumento de tejidos blandos y rellenos de defectos de tejido y similares. Cuando el hidrogel se usa como material para matrices, las matrices pueden ser o bien sembradas o no-sembradas. Si son matrices sembradas, el tipo de células que se incorporan en la matriz se selecciona dependiendo de la ubicación deseada de aplicación.

#### Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 representa las propiedades de deformación (curvas de "esfuerzo-deformación") obtenidas durante la medición de la deformación de hidrogeles basados en los derivados preparados según los ejemplos VIII, IX, XI y XII en compresión.

#### Realizaciones preferidas de la invención

##### 1. Ejemplo de la síntesis de derivados

La síntesis de derivados de hialuronano se llevó a cabo en varias etapas (véase el Esquema 1). La primera etapa es la preparación de un derivado aldehídico de hialuronano (Ejemplo 1.7). Otra etapa es la síntesis de diversos intermedios espaciador-ligando (Ejemplos 1.1 a 1.6) que se unieron luego a hialuronano mediante el procedimiento de aminación reductora (ejemplos 1.9 - 1.14).

Los ejemplos también comprenden la síntesis de derivados de hialuronano en la que el ligando (tiramina, hidroxitriptofano) se une directamente al polisacárido sin usar ningún espaciador (Ejemplos VIII). Estos derivados y los hidrogeles de ahí preparados sirvieron para comparar las propiedades de los mismos con las propiedades de los derivados descritos en esta solicitud (derivados de HA - espaciador - ligando - derivados IX a XIV).

5 Ejemplo 1.1: Síntesis de 6-amino-*N*-[2-(4-hidroxifenil) etil] hexanamida (intermedio espaciador - ligando (I))

Se disolvió ácido 6-[(terc-butoxicarbonil) amino] hexanóico (1,00 g, 4,3 mmol) en 50 ml de tetrahidrofurano (THF). A esta disolución de ácido se añadió 1,1'-carbodiimidazol (0,70 g, 4,3 mmol). La mezcla se calentó a 50°C durante sesenta minutos. A continuación, se lavó el recipiente de reacción con un gas inerte. Se añadió tiramina (0,59 g, 4,3 mmol) a la mezcla de reacción. La mezcla se calentó posteriormente durante otras 2 horas. A continuación, se retiró el THF mediante destilación a presión reducida. El residuo de la evaporación se disolvió en 50 ml de etilacetato. La disolución se lavó con 150 ml de agua purificada (dividida en tres partes). La capa orgánica se secó sobre un tamiz molecular. Se retiró etilacetato mediante destilación a presión reducida. El residuo de evaporación se disolvió en 50 ml de MeOH y se añadieron 2 ml de ácido trifluoroacético (TFA). La disolución se calentó durante 6 horas bajo reflujo. El disolvente se retiró mediante destilación a presión reducida. El residuo de evaporación se disolvió en 50 ml de etilacetato. La disolución se lavó con 150 ml de agua purificada (dividida en tres partes). La capa orgánica se secó sobre un tamiz molecular. Se retiró el etilacetato mediante destilación a presión reducida.

m = 0,75g (70% teoría)

RMN de <sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O, ppm) δ: 1,17 (m, 2 H, γ-CH<sub>2</sub>-ácido hexanóico); 1,48 (m, 2 H, β-CH<sub>2</sub>-ácido hexanóico); 1,58 (m, 2 H, δ-CH<sub>2</sub>-ácido hexanóico); 2,17 (t, 2 H, -CH<sub>2</sub>-CO-); 2,73 (m, 2 H, -CH<sub>2</sub>-Ph); 2,91 (m, 2 H, -CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>); 3,42 (m, 2 H, -CH<sub>2</sub>-NH-CO-); 6,83 (d, 2 H, arom.); 7,13 (d, 2 H, arom.).

RMN de <sup>13</sup>C (D<sub>2</sub>O, ppm) δ: 24 (γ-C- ácido hexanóico); 26 (δ-C- ácido hexanóico); 33 (β-C- ácido hexanóico); 35 (-C-CO-); 39 (-C-NH<sub>2</sub>); 40 (C-Ph); 63 (-C-NH-CO-); 115 (C3 arom.); 126 (C1 arom.); 130 (C2 arom.); 153 (C4 arom.); 176 (-CO-).

Ejemplo 1.2: Síntesis de 4-amino-*N*-[2-(4-hidroxifenilo) etil] butanamida (intermedio espaciador - ligando (II))

Se disolvió ácido 4-[(terc-butoxicarbonil) amino] butanóico (0,50 g, 2,5 mmol) en 25 ml de tetrahidrofurano (THF). A la disolución de ácido se añadió 1,1'-carbodiimidazol (0,40 g, 2,5 mmol). La mezcla se calentó a 50°C durante sesenta minutos. A continuación, se lavó el recipiente de reacción con un gas inerte. Se añadió tiramina (0,34 g, 2,5 mmol) a la mezcla de reacción. La mezcla se calentó posteriormente durante otras 2 horas. A continuación, se retiró el THF mediante destilación a presión reducida. El residuo de la evaporación se disolvió en 50 ml de etilacetato. La disolución se lavó con 150 ml de agua purificada (dividida en tres partes). La capa orgánica se secó sobre un tamiz molecular. Se retiró el etilacetato mediante destilación a presión reducida. El residuo de evaporación se disolvió en 50 ml de MeOH y se añadieron 2 ml de ácido trifluoroacético (TFA). La disolución se calentó durante 6 horas bajo reflujo. El disolvente se retiró mediante destilación a presión reducida. El residuo de evaporación se disolvió en 50 ml de etilacetato. La disolución se lavó con 150 ml de agua purificada (dividida en tres partes). La capa orgánica se secó sobre un tamiz molecular. Se retiró el etilacetato mediante destilación a presión reducida.

m = 0,44 g (80 % teoría)

RMN de <sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O, ppm) δ: 1,75 (m, 2 H, β-CH<sub>2</sub>-ácido butanóico); 2,16 (t, 2 H, -CH<sub>2</sub>-CO-); 2,59 (m, 2 H, -CH<sub>2</sub>-In); 2,78 (m, 2 H, -CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>); 3,20 (m, 2 H, -CH<sub>2</sub>-NH-CO-); 6,69 (d, 2 H, arom.); 6,99 (d, 2 H, arom.).

RMN de <sup>13</sup>C (D<sub>2</sub>O, ppm) δ: 23 (β-C- butanóico); 25 (t, 2 H, -C-CO-); 32 (-C-NH<sub>2</sub>); 45 (CH<sub>2</sub>- Ar); 60 (-C-NH-CO-); 115 (C3 arom.); 117 (C1 arom.); 129 (C2 arom.); 155 (C4 arom.); 171 (-CO-).

Ejemplo 1.3: Síntesis de 8-amino-*N*-[2-(4-hidroxifenilo) etil] octanamida (intermedio espaciador - ligando (III))

Se disolvió ácido 8-[(terc-butoxicarbonil) amino] octanóico (0,50 g, 1,9 mmol) en 25 ml de tetrahidrofurano (THF). A la disolución de ácido se añadió 1,1'-carbodiimidazol (0,31 g, 1,9 mmol). La mezcla se calentó a 50°C durante sesenta minutos. A continuación, se lavó el recipiente de reacción con un gas inerte. Se añadió tiramina (0,26 g, 1,1 mmol) a la mezcla de reacción. La mezcla se calentó posteriormente durante otras 2 horas. A continuación, se retiró el THF mediante destilación a presión reducida. El residuo de la evaporación se disolvió en 50 ml de etilacetato. La disolución se lavó con 150 ml de agua purificada (dividida en tres partes). La capa orgánica se secó sobre un tamiz molecular. Se retiró etilacetato mediante destilación a presión reducida. El residuo de evaporación se disolvió en 50 ml de MeOH y se añadieron 2 ml de ácido trifluoroacético. La disolución se calentó durante 6 horas bajo reflujo. El disolvente se retiró mediante destilación a presión reducida. El residuo de evaporación se disolvió en 50 ml de etilacetato. La disolución se lavó con 150 ml de agua purificada (dividida en tres partes). La capa orgánica se secó sobre un tamiz molecular. Se retiró el etilacetato mediante destilación a presión reducida.

m = 0,40 g (75 % teoría)



RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , ppm)  $\delta$ : 1,16-1,34 (m, 6 H, C4 az C6  $-\text{CH}_2-$  ácido octanóico); 1,56 – 1,44 (m, 4 H, C3 a C7 ácido octanóico); 2,58 (m, 2 H,  $-\text{CH}_2-\text{Ar}$ ); 2,78 (m, 2 H,  $-\text{CH}_2-\text{NH}_2$ ); 3,19 (m, 2 H,  $-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-$ ); 6,68 (d, 2 H, arom.); 6,98 (d, 2 H, arom.).

5 RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , ppm)  $\delta$ : 21 (C7 ácido octanóico); 24 (C4 ácido octanóico); 26 (C6-ácido octanóico); 28 (C5-ácido octanóico); 33 (C3- ácido octanóico); 35 ( $-\text{C}-\text{CO}-$ ); 39 ( $-\text{C}-\text{NH}_2$ ); 40 (C-Ph); 63 ( $-\text{C}-\text{NH}-\text{CO}-$ ); 115 (C3 arom.); 126 (C1 arom.); 130 (C2 arom.); 153 (C4 arom.); 176 ( $-\text{CO}-$ ).

Ejemplo 1.4: Síntesis de 4-amino-*N*-[2-(5-hidroxi-1H-indol-3-il) etil] butanamida (intermedio espaciador - ligando (IV))

10 Se disolvió ácido 4-[(terc-butoxicarbonil) amino] butanóico (0,50 g, 2,5 mmol) en 25 ml de *N,N*-dimetilformamida (DMF). A la disolución de ácido se añadió 1,1'-carbodiimidazol (0,40 g, 2,5 mmol). La mezcla se calentó a 50°C durante sesenta minutos. A continuación, se lavó el recipiente de reacción con un gas inerte. Se añadió una disolución de hidrocloreto de 5-hidroxitriptamina (0,52 g, 2,5 mmol) y trietilamina (0,68 ml; 4,9 mmol) en 25 ml de DMF a la mezcla de reacción. La mezcla se calentó además durante otras 2 horas. La mezcla se diluyó añadiendo etilacetato (100 ml). La disolución resultante se lavó con 300 ml de agua purificada (dividida en tres partes). La capa orgánica se secó sobre un tamiz molecular. Se retiró el etilacetato mediante destilación a presión reducida. El residuo de evaporación se disolvió en 50 ml de MeOH y se añadieron 2 ml de ácido trifluoroacético. La disolución se calentó durante 6 horas bajo reflujo. El disolvente se retiró mediante destilación a presión reducida. El residuo de evaporación se disolvió en 50 ml de etilacetato. La disolución se lavó con 150 ml de agua purificada (dividida en tres partes). La capa orgánica se secó sobre un tamiz molecular. Se retiró el etilacetato mediante destilación a presión reducida.

20 m = 0,43 g (65 % teoría)

RMN de  $^1\text{H}$  (DMSO, ppm)  $\delta$ : 1,77 (m, 2 H,  $\beta$ -CH - ácido butanóico); 2,20 (t, 2 H,  $-\text{CH}_2-\text{CO}-$ ); 2,73 (m, 2 H,  $-\text{CH}_2-\text{In}$ ); 2,81 (m, 2 H,  $-\text{CH}_2-\text{NH}_2$ ); 3,30 (m, 2 H,  $-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-$ ); 6,60 (d, 1 H, C6-arom.); 6,82 (s, 1 H, C4-arom.); 7,03 (s, 1 H, C2-arom.); 7,13 (d, 1 H, C7-arom.).

25 RMN de  $^{13}\text{C}$  (DMSO, ppm)  $\delta$ : 23 ( $\beta$ -C- ácido butanóico); 25 (t, 2 H,  $-\text{C}-\text{CO}-$ ); 32 ( $-\text{C}-\text{NH}_2$ ); 39 ( $\text{CH}_2-\text{In}$ ); 60 ( $-\text{C}-\text{NH}-\text{CO}-$ ); 102 (C4 arom.); 110 (C6 arom.); 111 (C7 arom.); 111 (C3 arom.); 123 (C2 arom.); 127 (C7 - C- NH- arom.); 131 (C4-C-C3- arom.); 150 (C5 arom.); 171 ( $-\text{CO}-$ ).

Ejemplo 1.5: Síntesis de 6-amino-*N*-[2-(5-hidroxi-1H-indol-3-il) etil] hexanamida (intermedio espaciador - ligando (V))

30 Se disolvió ácido 6-[(terc-butoxicarbonil) amino] hexanóico (1,00 g, 4,3 mmol) en 50 ml de *N,N*-dimetilformamida (DMF). A la disolución de ácido se añadió 1,1'-carbodiimidazol (0,70 g, 4,3 mmol). La mezcla se calentó a 50°C durante sesenta minutos. A continuación, se lavó el recipiente de reacción con un gas inerte. Se añadió una disolución de hidrocloreto de 5-hidroxi-triptamina (0,91 g, 4,3 mmol) y trietilamina (0,68 ml, 4,9 mmol) en 25 ml de DMF a la mezcla de reacción. La mezcla se calentó además durante otras 2 horas. La mezcla se diluyó añadiendo etilacetato (100 ml). La disolución resultante se lavó con 300 ml de agua purificada (dividida en tres partes). La capa orgánica se secó sobre un tamiz molecular. Se retiró el etilacetato mediante destilación a presión reducida. El residuo de evaporación se disolvió en 50 ml de MeOH y se añadieron 2 ml de ácido trifluoroacético. La disolución se calentó durante 6 horas bajo reflujo. El disolvente se retiró mediante destilación a presión reducida. El residuo de evaporación se disolvió en 50 ml of etilacetato. La disolución se lavó con 150 ml de agua purificada (dividida en tres partes). La capa orgánica se secó sobre un tamiz molecular. Se retiró el etilacetato mediante destilación a presión reducida.

40 m = 0,75 g (60 % teoría)

RMN de  $^1\text{H}$ : (DMSO, ppm)  $\delta$ : 1,17 (m, 2 H,  $\gamma$ - $\text{CH}_2$ -ácido hexanóico); 1,48 (m, 2 H,  $\beta$ - $\text{CH}_2$ -ácido hexanóico); 1,58 (m, 2 H,  $\delta$ - $\text{CH}_2$ -ácido hexanóico); 2,17 (t, 2 H,  $-\text{CH}_2-\text{CO}-$ ); 2,73 (m, 2 H,  $-\text{CH}_2-\text{In}$ ); 2,91 (m, 2 H,  $-\text{CH}_2-\text{NH}_2$ ); 3,42 (m, 2 H,  $-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-$ ); 6,60 (d, 1 H, C6-arom.); 6,82 (s, 1 H, C4-arom.); 7,03 (s, 1 H, C2-arom.); 7,13 (d, 1 H, C7-arom.).

45 RMN de  $^{13}\text{C}$ : (DMSO, ppm)  $\delta$ : 24 ( $\gamma$ -C-ácido hexanóico); 26 ( $\delta$ -C-ácido hexanóico); 33 ( $\beta$ -C-ácido hexanóico); 35 ( $-\text{C}-\text{CO}-$ ); 39 ( $-\text{C}-\text{NH}_2$ ); 40 (C-In); 63 ( $-\text{C}-\text{NH}-\text{CO}-$ ); 102 (C4 arom.); 110 (C6 arom.); 111 (C7 arom.); 111 (C3 arom.); 123 (C2 arom.); 127 (C7 - C- NH- arom.); 131 (C4-C-C3- arom.); 150 (C5 arom.); 171 ( $-\text{CO}-$ ).

Ejemplo 1.6: Preparación de ácido 2-[(6-aminohexanoil) amino]-3-(5-hidroxi-1H-indol-3-il)-propanóico (intermedio espaciador - ligando VI)

50 Se disolvió ácido 6-[(terc-butoxicarbonil) amino] hexanóico (0,50 g, 2,2 mmol) en 50 ml de tetrahidrofurano (THF). A la disolución de ácido se añadió 1,1'-carbodiimidazol (0,35 g, 2,2 mmol). La mezcla se calentó a 50°C durante sesenta minutos. A continuación, se lavó el recipiente de reacción con un gas inerte. Se añadió 5-hidroxitriptofano (0,48 g, 2,2 mmol) a la mezcla de reacción. La mezcla se calentó además durante otras 2 horas. La mezcla se diluyó añadiendo etilacetato (100 ml). La disolución resultante se lavó con 300 ml agua purificada (dividida en tres partes). La capa orgánica se secó sobre un tamiz molecular. Se retiró el etilacetato mediante destilación a presión reducida. El residuo de evaporación se disolvió en 50 ml de MeOH y se añadieron 2 ml de ácido trifluoroacético. La disolución

se calentó durante 6 horas bajo reflujo. El disolvente se retiró mediante destilación a presión reducida. El residuo de evaporación se disolvió en 50 ml de etilacetato. La disolución se lavó con 150 ml agua purificada (dividida en tres partes). La capa orgánica se secó sobre un tamiz molecular. Se retiró el etilacetato mediante destilación a presión reducida.

5 m = 0,62 g (85 % teoría)

RMN de  $^1\text{H}$ : (DMSO, ppm)  $\delta$ : 1,17 (m, 2 H,  $\gamma$ -CH<sub>2</sub>-ácido hexanóico); 1,48 (m, 2 H,  $\beta$ -CH<sub>2</sub>-ácido hexanóico); 1,58 (m, 2 H,  $\delta$ -CH<sub>2</sub>-ácido hexanóico); 2,19 (t, 2 H, -CH<sub>2</sub>-CO-); 2,51 (m, 2 H, -CH<sub>2</sub>-In); 2,90 (m, 2 H, -CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>); 3,81 (m, 2 H, -CH<sub>2</sub>-NH-CO-); (m, 2 H, -CH<sub>2</sub>-NH-CO-); 6,61 (d, 1 H, C6-arom.); 6,95 (s, 1 H, C4-arom.); 7,02 (s, 1 H, C2-arom.); 7,13 (d, 1 H, C7-arom.).

10 RMN de  $^{13}\text{C}$  (DMSO, ppm)  $\delta$ : 24 ( $\gamma$ -C-ácido hexanóico); 26 ( $\delta$ -C-ácido hexanóico); 33 ( $\beta$ -C-ácido hexanóico); 35 (-C-CO-); 39 (-C-NH<sub>2</sub>); 40 (C-Ph); 55 (-C-NH-CO-); 102 (C4 arom.); 110 (C6 arom.); 111 (C7 arom.); 111 (C3 arom.); 123 (C2 arom.); 127 (C7 - C - NH- arom.); 131 (C4-C-C3- arom.); 150 (C5 arom.); 171 (-CO-).

Ejemplo 1.7: Preparación de derivado de aldehído (HA-CHO) – procedimiento general (VII)

15 Se disolvió hialuronano (10,00 g,  $M_w$  = 2 MDa) en 750 ml de una disolución de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12 H<sub>2</sub>O al 2,5% (w/w). La disolución se enfrió a 5°C. A la disolución resultante se añadieron 2,60 g de NaBr y 0,05 g de 4-acetamido-2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-oxilo. Después de una exhaustiva homogenización de la disolución, se añadieron 3 ml de una disolución de NaClO (10-15 % de Cl<sub>2</sub> disponible) a la mezcla de reacción. La reacción prosiguió mientras se removía continuamente durante 15 min. La reacción se enfrió mediante la adición de 100 ml de una disolución de propan-2-ol al 40%. El producto se purificó mediante ultrafiltración y se aisló mediante precipitación por propan-2-ol.

20 IR (KBr): 3.417, 2.886, 2.152, 1.659, 1.620, 1.550, 1.412, 1.378, 1.323, 1.236, 1.204, 1.154, 1.078, 1.038, 945, 893 cm<sup>-1</sup>.

RMN de  $^1\text{H}$  (D<sub>2</sub>O)  $\delta$ : 2,01 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>-), 3,37 – 3,93 (m, cuerpo de hialuronano), 4,46 (s, 1H, anómero), 4,54 (s, 1 H anómero, -O-CH(OH)-), 5,27 (geminal glicol -CH(OH)<sub>2</sub>).

Ejemplo 1.8: Síntesis de derivado de tiramina (VIII)

25 Se disolvió derivado aldehídico de HA (VII) (5,00 g) en 500 ml de agua desmineralizada. El pH de la disolución se ajustó en 3 por medio de ácido acético. A continuación, se añadió tiramina en forma de una disolución en 100 ml de propan-2-ol al 40% a la mezcla de reacción (1,70 g). La mezcla se agitó posteriormente durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, se añadió una disolución de complejo picolin-borano (0,50 g) en 50 ml de propan-2-ol al 40% a la mezcla. La mezcla de reacción se agitó luego durante 12 horas a temperatura ambiente. Se retiraron las sustancias de lastre de bajo peso molecular del producto mediante ultrafiltración. El producto se obtuvo mediante precipitación por propan-2-ol. El precipitado fue privado de humedad y propan-2-ol residual secando en un secador de aire caliente (40°C, 3 días).

30 IR (KBr): 3.400, 2.893, 2.148, 1.660, 1.620, 1.549, 1.412, 1.378, 1.323, 1.236, 1.204, 1.154, 1.078, 1.038, 945, 893 cm<sup>-1</sup>.

35 RMN de  $^1\text{H}$  (D<sub>2</sub>O)  $\delta$ : 2,01 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>-), 2,66 – 2,77 (m, 4 H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-), 3,00 (s, 1H, H-CH-NH-), 3,37 – 3,93 (m, cuerpo de hialuronano), 4,46 (s, 1H, anómero), 4,54 (s, 1H anómero, -O-CH(OH)-), 6,59 (d, 2H, arom.), 7,04 (d, 2H, arom.).

Ejemplo 1.9: Preparación derivado tiraminado de HA con un espaciador C<sub>6</sub> (IX)

40 Se disolvió derivado aldehídico de HA (VII) (5,00 g) en 500 ml de agua desmineralizada. El pH de la disolución se ajustó en 3 por medio de ácido acético. A continuación, se añadió 6-amino-N-[2-(4- hidroxifenil) etil] hexanamida (intermedio (I)) (0,625 g, 2,5 mmol) a la disolución de HA-CHO. La mezcla se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente. A continuación, se añadió el complejo picolin-borano (0,270 g, 2,5 mmol) a la mezcla de reacción. La mezcla se agitó además durante 12 horas a temperatura ambiente. El producto se purificó mediante ultrafiltración y se aisló del residuo retenido mediante precipitación por propan-2-ol. El precipitado fue privado de humedad y propan-2-ol residual secando en un secador de aire caliente (40°C, 3 días).

45 IR (KBr): 3.425, 2.893, 2.148, 1.660, 1.620, 1.549, 1.412, 1.378, 1.323, 1.236, 1.204, 1.154, 1.078, 1.038, 945, 893 cm<sup>-1</sup>.

50 RMN de  $^1\text{H}$  (D<sub>2</sub>O)  $\delta$ : 1,25 (t, 2 H,  $\gamma$  -CH<sub>2</sub>-ácido aminohexanóico), 1,48 (m, 2 H,  $\delta$  -CH<sub>2</sub>-ácido aminohexanóico) 1,51 (m, 2 H,  $\beta$  -CH<sub>2</sub>-ácido aminohexanóico), 2,01 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>-), 2,65 (m, 2H, Ph-CH<sub>2</sub>-), 2,73 (m, 2H,  $\epsilon$ -CH<sub>2</sub>-ácido aminohexanóico), 3,37 – 3,93 (m, cuerpo de hialuronano), 4,46 (s, 1H, anómero), 4,54 (s, 1H, anómero, -O-CH(OH)-), 6,59 (d, 2H, arom.), 7,01 (d, 2H. arom.).

Ejemplo 1.10: Preparación de derivado de HA con un espaciador C<sub>4</sub> y 5-hidroxi-triptamina (X)

Se disolvieron derivado aldehídico de HA (VII) (3,00 g) y  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$  (7,50 g) en 300 ml de agua desmineralizada. A continuación, se añadió 4-amino-N-[2-(5-hidroxi-1H-indol-3-il) etil] butanamida (0,40 g, 1,5 mmol) - (intermedio (IV)) a la disolución de HA-CHO. La mezcla se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente. A continuación, se añadió el complejo picolin-borano (0,16 g, 1,5 mmol) a la mezcla de reacción. La mezcla se agitó posteriormente durante 12 horas a temperatura ambiente. El producto se purificó mediante ultrafiltración y se aisló del residuo retenido mediante precipitación por propan-2-ol. El precipitado fue privado de humedad y propan-2-ol residual secando en un secador de aire caliente (40°C, 3 días).

IR (KBr): 3.400, 2.893, 2.148, 1.660, 1.620, 1.549, 1.412, 1.378, 1.323, 1.236, 1.204, 1.154, 1.078, 1.038, 945, 893  $\text{cm}^{-1}$ .

10 RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$ : 1,73 (m, 2 H,  $\beta$ - $\text{CH}_2$ -ácido aminobutanóico), 2,01 (s, 3 H,  $\text{CH}_3$ ), 2,60 (m, 2H,  $\gamma$ - $\text{CH}_2$ -ácido aminobutanóico), 2,93 (m, 2H, Ind- $\text{CH}_2$ -), 3,37 – 3,93 (m, cuerpo de hialuronano), 4,46 (s, 1H, anómero), 4,54 (s, 1H anómero, -O-CH(OH)-), 6,85 (d, 1H, arom.), 7,09 (s, 1H. arom.), 7,21 (s, 1H. arom.), 7,40 (s, 1H. arom.).

Ejemplo 1.11: Preparación de derivado de HA tiraminado con un espaciador  $\text{C}_4$  (XI)

15 Se disolvió derivado aldehídico de HA (VII) (3,50 g) en 350 ml of agua desmineralizada. El pH de la disolución se ajustó en 3 por medio de ácido acético. A continuación, se añadió 4-amino-N-[2-(4-hidroxifenil) etil] butanamida (0,40 g, 1,8 mmol) - (intermedio (II)) a la disolución de HA-CHO. La mezcla se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente. A continuación, se añadió el complejo picolin-borano (0,19 g, 1,8 mmol) a la mezcla de reacción. La mezcla se agitó posteriormente durante 12 horas a temperatura ambiente. El producto se purificó mediante ultrafiltración y se aisló del residuo retenido mediante precipitación por propan-2-ol. El precipitado fue privado de humedad y propan-2-ol residual secando en un secador de aire caliente (40°C, 3 días).

20 IR (KBr): 3.425, 2.893, 2.148, 1.660, 1.620, 1.549, 1.412, 1.378, 1.323, 1.236, 1.204, 1.154, 1.078, 1.038, 945, 893  $\text{cm}^{-1}$ .

25 RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$ : 1,25 (t, 2 H,  $\gamma$ - $\text{CH}_2$ -ácido aminohexanóico), 1,48 (m, 2 H,  $\delta$ - $\text{CH}_2$ -ácido aminohexanóico) 1,51 (m, 2 H,  $\beta$ - $\text{CH}_2$ -ácido aminohexanóico), 2,01 (s, 3 H,  $\text{CH}_3$ -), 2,65 (m, 2H, Ph- $\text{CH}_2$ -), 2,73 (m, 2H,  $\epsilon$ - $\text{CH}_2$ -  $\text{H}_2$ -ácido aminohexanóico), 3,37 – 3,93 (m, cuerpo de hialuronano), 4,46 (s, 1H, anómero), 4,54 (s, 1H anómero, -O-CH(OH)-), 6,59 (d, 2H, arom.), 7,01 (d, 2H. arom.).

Ejemplo 1.12: Preparación de derivado de HA tiraminado con un espaciador  $\text{C}_8$  (XII)

30 Se disolvió derivado aldehídico de HA (VII) (2,90 g) en 300 ml de agua desmineralizada. El pH de la disolución se ajustó en 3 por medio de ácido acético. A continuación, se añadió 8-amino-N-[2-(4-hidroxifenil) etil] octanamida (0,40 g, 1,4 mmol) - (intermedio (III)) a la disolución de HA-CHO. La mezcla se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente. A continuación, se añadió el complejo picolin-borano (0,15 g, 1,4 mmol) a la mezcla de reacción. La mezcla se agitó posteriormente durante 12 horas a temperatura ambiente. El producto se purificó mediante ultrafiltración y se aisló del residuo retenido mediante precipitación por propan-2-ol. El precipitado fue privado de humedad y propan-2-ol residual secando en un secador de aire caliente (40°C, 3 días).

35 IR (KBr): 3.425, 2.893, 2.148, 1.660, 1.620, 1.549, 1.412, 1.378, 1.323, 1.236, 1.204, 1.154, 1.078, 1.038, 945, 893  $\text{cm}^{-1}$ .

RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$ : 1,16-1,34 (m, 6 H, C4 az C6 - $\text{CH}_2$ -ácido octanóico); 1,56 – 1,44 (m, 4 H, ácido octanóico C3 a C7); 2,01 (s, 3 H,  $\text{CH}_3$ -), 2,58 (m, 2 H, - $\text{CH}_2$ -Ar); 2,78 (m, 2 H, - $\text{CH}_2$ -NH-), 3,37 – 3,93 (m, cuerpo de hialuronano), 4,46 (s, 1H, anómero), 4,54 (s, 1H anómero, -O-CH(OH)-), 6,59 (d, 2H, arom.), 7,01 (d, 2H. arom.).

40 Ejemplo 1.13 : Preparación de derivado de HA con un espaciador  $\text{C}_6$  y 5-hidroxi-triptamina (XIII)

45 Se disolvieron derivado aldehídico de HA (VII) (5,00 g) y  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$  (12,5 g) en 500 ml de agua desmineralizada. A continuación, se añadió 6-amino-N-[2-(5-hidroxi-1H-indol-3-il) etil] hexanamida (0,73 g, 2,5 mmol) - (intermedio (V)) a la disolución de HA-CHO. La mezcla se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente. A continuación, se añadió el complejo picolin-borano (0,27 g, 2,5 mmol) a la mezcla de reacción. La mezcla se agitó posteriormente durante 12 horas a temperatura ambiente. El producto se purificó mediante ultrafiltración y se aisló del residuo retenido mediante precipitación por propan-2-ol. El precipitado fue privado de humedad y propan-2-ol residual secando en un secador de aire caliente (40°C, 3 días).

IR (KBr): 3.400, 2.893, 2.148, 1.660, 1.620, 1.549, 1.412, 1.378, 1.323, 1.236, 1.204, 1.154, 1.078, 1.038, 945, 893  $\text{cm}^{-1}$ .

50 RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$ : 1,25 (t, 2 H,  $\gamma$ - $\text{CH}_2$ -ácido aminohexanóico), 1,48 (m, 2 H, 8- $\text{CH}_2$ -ácido aminohexanóico) 1,51 (m, 2 H,  $\delta$ - $\text{CH}_2$ -ácido aminohexanóico), 2,01 (s, 3 H,  $\text{CH}_3$ -), 2,65 (m, 2H, Ph- $\text{CH}_2$ -), 2,73 (m, 2H,  $\epsilon$ - $\text{CH}_2$ -ácido aminohexanóico), 3,37 – 3,93 (m, cuerpo de hialuronano), 4,46 (s, 1H, anómero), 4,54 (s, 1H anómero, -O-CH(OH)-), 6,85 (d, 1H, arom.), 7,09 (s, 1H. arom.), 7,21 (s, 1H. arom.), 7,40 (s, 1H. arom.).

Ejemplo 1.14 : Preparación de derivado de HA con un espaciador C<sub>6</sub> y 5-hidroxi-triptofano (XIV)

Se disolvieron derivado aldehídico de HA (VII) (3,50 g) y Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12 H<sub>2</sub>O (8,75 g) en 350 ml de agua desmineralizada. A continuación, se añadió ácido 2-[(6-aminohexanoil)amino]-3-(5-hidroxi-1H-indol-3-il) propanóico (0,60 g, 1,8 mmol) - (intermedio (VI)) a la disolución de HA-CHO. La mezcla se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente. A continuación, se añadió el complejo picolin-borano (0,19 g, 1,8 mmol) a la mezcla de reacción. La mezcla se agitó posteriormente durante 12 horas a temperatura ambiente. El producto se purificó mediante ultrafiltración y se aisló del residuo retenido mediante precipitación por propan-2-ol. El precipitado fue privado de humedad y propan-2-ol residual secando en un secador de aire caliente (40°C, 3 días).

IR (KBr): 3.400, 2.893, 2.148, 1.660, 1.620, 1.549, 1.412, 1.378, 1.323, 1.236, 1.204, 1.154, 1.078, 1.038, 945, 893 cm<sup>-1</sup>.

RMN de <sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O) δ: 1,25 (t, 2 H, γ -CH<sub>2</sub>-ácido aminohexanóico), 1,48 (m, 2 H, δ -CH<sub>2</sub>-ácido aminohexanóico), 1,51 (m, 2 H, β-CH<sub>2</sub>-ácido aminohexanóico), 2,01 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>-), 2,65 (m, 2H, Ph-CH<sub>2</sub>-), 2,73 (m, 2H, ε-CH<sub>2</sub>-ácido aminohexanóico), 3,37 – 3,93 (m, cuerpo de hialuronano), 4,46 (s, 1H, anómero.), 4,54 (s, 1H anómero, -O-CH(OH)-), 6,85 (d, 1H, arom.), 7,09 (s, 1H. arom.), 7,21 (s, 1H. arom.), 7,40 (s, 1H. arom.).

Ejemplo 1.15 : Procedimiento general de la preparación del hidrogel basado en derivado de HA con un espaciador y 5-hidroxitriptofano y basado en un derivado de tiramina

El derivado de HA seleccionado se disolvió en 0,1 M PBS pH 7,4. La cantidad de derivado se elige según la concentración deseada. Se añadió la cantidad deseada de la enzima a la disolución del derivado. Después de una homogenización exhaustiva se añadió una disolución de peróxido de hidrógeno diluida. La mezcla se homogeneizó de nuevo y se formó un gel transparente.

Ejemplo 1.16: Preparación del hidrogel basado en derivado de tiramina

Se disolvieron de 40 a 60 mg (según la concentración deseada de la disolución polimérica) del derivado de HA preparado según el ejemplo 1.8 (VIII), en 2 ml de 0,1 M PBS con un pH de 7,4. A continuación, se añadieron 20 µl de la disolución de la enzima HRP (24 mg de la enzima HRP disueltos en 1 ml de 0,1 M PBS o pH 7,4) a la disolución del derivado. Después de una homogenización exhaustiva se añadieron 100 µl de la disolución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (33 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% disuelto en 10 ml de 0,1 M PBS con un pH de 7,4). La mezcla se homogenizó y se formó un gel transparente.

Ejemplo 1.17 Preparación del hidrogel basado en el derivado tiraminado de HA con un espaciador

Se disolvieron de 40 - 60 mg (según la concentración deseada de la disolución polimérica) del derivado de HA preparado según los ejemplos 1.9 (IX), 1.11 (XI) o 1.12 (XII), en 2 ml de 0,1 M PBS con pH de 7,4. Se añadieron 10 µl de la disolución de la enzima HRP (2,4 mg de la enzima HRP disuelta en 1 ml de 0,1 M PBS con un pH de 7,4) a la disolución del derivado. Después de una homogenización exhaustiva se añadieron 100 µl de la disolución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (33 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% disuelto en 10 ml de 0,1 M PBS con un pH de 7,4). La mezcla se homogenizó y se formó un gel transparente.

2. Diferencias en las propiedades del hidrogel

Ejemplo 2.1 : Diferencia en las propiedades mecánicas de los hidrogeles dependiendo del tipo de derivado de HA usado y la cantidad de la enzima añadida

Se prepararon muestras de hidrogeles a partir de los derivados VIII (tiramina, sin el espaciador incorporado), IX, XI y XII (con un espaciador incorporado) según los ejemplos 1.16 o 1.17, dependiendo del tipo de derivado usado. Las muestras, después de una homogenización exhaustiva, se dejaron madurar durante 120 minutos a temperatura ambiente. Los análogos de los derivados usados para la preparación de los hidrogeles comparados siempre tuvieron un peso molecular y un grado de sustitución comparables. Todas las muestras tenían las mismas dimensiones y se sometieron a ensayo en condiciones de laboratorio constantes (temperatura, presión, humedad).

Se midió el módulo de elasticidad de Young en compresión, tenacidad, resistencia a la compresión y la correspondiente deformación para cada muestra; y se midieron el módulo de cizalla y el ángulo perdido para determinar las propiedades viscoelásticas de las muestras.

Los resultados obtenidos implican claramente que la introducción del espaciador flexible entre el ligando y la cadena de hialuronano básica produce una mayor elasticidad, tenacidad y resistencia de los hidrogeles basados en dichos derivados, comparados con los hidrogeles basados en derivados de hialuronano análogos sin ningún espaciador.

La Tabla 1 muestra la comparación de las propiedades mecánicas del hidrogel dependiendo del tipo de derivado usado para la preparación del mismo. La concentración (%) significa la concentración del polímero en la disolución a partir de la cual se preparó el hidrogel, el grado de sustitución (%) indica el grado de sustitución por el ligando reactivo / reticulante, es decir, el número de los ligandos unidos por 100 de las unidades estructurales del polímero,

donde en el caso de HA la unidad estructural del polímero es disacárido (o dímero) de glicosamina + ácido glucurónico.

Tabla 1

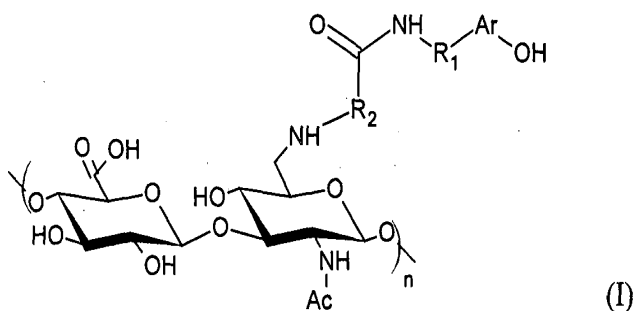
Tipo usado de derivado	Derivado de HA según el Ejemplo VIII	Derivado de HA según el Ejemplo IX	Derivado de HA según el Ejemplo VIII	Derivado de HA según el Ejemplo XI	Derivado de HA según el Ejemplo XII
Mw (kDa) / concentración (%)	320 / 3	250 / 3	280 / 2	280 / 2	285 / 2
Grado de sustitución (%)	3	3	2	1	1
Módulo Young de elasticidad en compresión (kPa)	6,59	5,68	8,99	3,87	8,19
Resistencia a la compresión (kPa)	73	310	108	167	218
Resistencia a la compresión en deformación (%)	67	68	58	65	65
Tenacidad (J/m <sup>3</sup> )	9150	23460	8050	9670	13650
Ángulo de pérdida (°)	0,12	0,18	0,19	0,96	0,43
Módulo de cizalla (Pa)	1861	1534	876	504	1.105

- 5 1. Slaughter, B. V.; Khurshid, S. S.; Fisher, O. Z.; Khademhosseini, A.; Peppas, N. A., *Hydrogels in Regenerative Medicine*. Advanced Materials 2009, 21 (32-33), pp. 3307-3329.
2. Benedetti, L.; Cortivo, R.; Berti, T.; Berti, A.; Pea, F.; Mazzo, M.; Moras, M.; Abatangelo, G., *Biocompatibility and biodegradation of different hyaluronan derivatives (Hyaff) implanted in rats*. Biomaterials 1993, 14 (15), pp. 1154-1160.
- 10 3. Calabro, A.; Gross, R. A.; Darr, A. B. *Hydroxyphenyl cross-linked macromolecular network and applications thereof*. 2004.
4. Calabro, A.; Akst, L.; Alam, D.; Chan, J.; Darr, A. B.; Fukamachi, K.; Gross, R. A.; Haynes, D. Kamohara, K.; Knott, D. P.; Lewis, H.; Melamud, A.; Miniaci, A.; Strome, M. *Hydroxyphenyl cross-linked macromolecular network and applications thereof*. 2008 (WO2006/010066).
- 15 5. Tan, H.; Chu, C. R.; Payne, K. A.; Marra, K. G., *Injectable in situ forming biodegradable chitosan-hyaluronic acid based hydrogels for cartilage tissue engineering*. Biomaterials 2009, 30 (13), pp. 2499-2506.
6. Darr, A.; Calabro, A., *Synthesis and characterization of tyramine-based hyaluronan hydrogels*. Journal of Materials Science: Materials in Medicine 2009, 20 (1), pp. 33-44.
- 20 7. Kurisawa, M.; Lee, F.; Chung, J. E. *Formation of Hydrogel in the Presence of Peroxidase and Low Concentration of Hydrogen Peroxide* 2009 (WO2009/148405).
8. Lee, F.; Chung, J. E.; Kurisawa, M., *An injectable enzymatically crosslinked hyaluronic acid-tyramine hydrogel system with independent tuning of mechanical strength and gelation rate*. Soft Matter 2008, 4, pp. 880-887.

9. Akkara, J. A.; Senecal, K. J.; Kaplan, D. L., *Synthesis and characterization of polymers produced by horseradish peroxidase in dioxane*. Journal of Polymer Science Parte A: Polymer Chemistry 1991, 29 (1 1), pp. 1561-1574.
10. Shutava, T.; Zheng, Z.; John, V.; Lvov, Y., *Microcapsule modification with peroxidase-catalyzed phenol polymerization*. Biomacromolecules 2004, 5 (3), pp. 914-21.
- 5 11. Ghan, R.; Shutava, T.; Patel, A.; John, V. T.; Lvov, Y., *Enzyme-Catalyzed Polymerization of Phenols within Polyelectrolyte Microcapsules*. Macromolecules 2004, 37 (12), pp. 4519-4524.
12. Higashimura, H.; Kobayashi, S., *Oxidative Polymerization*. John Wiley & Sons, Inc.: 2002.
13. Veitch, N. C., *Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme*. Phytochemistry 2004, 65 (3), pp. 249-259.
- 10 14. Gilabert, M. A.; Phenoll, L. G.; Garcia-Molina, F.; Garcia-Ruiz, P. A.; Tudela, J.; Garcia-Canovas, F.; Rodriguez-Lopez, J. N., *Stereospecificity of horseradish peroxidase*. Biol Chem 2004, 385 (12), pp. 1177-84.
15. Uyama, H.; Kobayashi, S., *Enzymatic Synthesis of Polyphenols*. Current Organic Chemistry 2003, 7, p. 1387.
16. Gilabert, M. A.; Phenoll, L. G.; Garcia-Molina, F.; Tudela, J.; Garcia-Canovas, F.; Rodriguez-Lopez, J. N., *Kinetic characterization of phenol and aniline derivatives as substrates of peroxidase*. Biol Chem 2004, 385 (9), pp. 795-800.
- 15 17. Gilabert, M. A.; Hiner, A. N.; Garcia-Ruiz, P. A.; Tudela, J.; Garcia-Molina, F.; Acosta, M.; Garcia-Canovas, F.; Rodriguez-Lopez, J. N., *Differential substrate behaviour of phenol and aniline derivatives during oxidation by horseradish peroxidase: kinetic evidence for a two-step mechanism*. Biochim Biophys Acta 2004, 1699 (1-2), pp. 235-43.
- 20 18. Hewson, W. D.; Dunford, H. B., *Oxidation of p-cresol by horseradish peroxidase compound I*. J Biol Chem 1976, 251 (19), pp. 6036-42.
19. Burner, U.; Obinger, C., *Transient-state and steady-state kinetics of the oxidation of aliphatic and aromatic thiols by horseradish peroxidase*. FEBS Letters 1997, 411 (2-3), pp. 269-274.
20. Patel, P. K.; Mondal, M. S.; Modi, S.; Behere, D. V., *Kinetic studies on the oxidation of phenols by the horseradish peroxidase compound II*. Biochim Biophys Acta 1997, 1339 (1), pp. 79-87.
- 25 21. Hewson, W. D.; Dunford, H. B., *Stoichiometry of the reaction between horseradish peroxidase and p-cresol*. J Biol Chem 1976, 251 (19), pp. 6043-52.
22. Job, D.; Dunford, H. B., *Substituent effect on the oxidation of phenols and aromatic amines by horseradish peroxidase compound I*. Eur J Biochem 1976, 66 (3), pp. 607-14.
- 30 23. Dunford, H. B.; Cotton, M. L., *Kinetics of the oxidation of p-aminobenzoic acid catalyzed by horseradish peroxidase compounds I and II*. J Biol Chem 1975, 250 (8), pp. 2920-32.
24. Kalyanaraman, B.; Felix, C. C.; Sealy, R. C., *Peroxidatic oxidation of catecholamines. A kinetic electron spin resonance investigation using the spin stabilization approach*. Journal of Biological Chemistry 1984, 259 (12), pp. 7584-7589.
- 35 25. Won, K.; Kim, Y. H.; An, E. S.; Lee, Y. S.; Song, B. K., *Horseradish Peroxidase-Catalyzed Polymerization of Cardanol in the Presence of Redox Mediators*. Biomacromolecules 2003, 5 (1), pp. 1-4.
26. Xu, Y.-P.; Huang, G.-L.; Yu, Y.-T., *Kinetics of phenolic polymerization catalyzed by peroxidase in organic media*. Biotechnology and Bioengineering 1995, 47 (1), pp. 117-119.
27. Tonelli, A. E., *Effects of crosslink density and length on the number of intramolecular crosslinks (defects) introduced into a rubbery network*. Polymer 1974, 15 (4), pp. 194-196.
- 40 28. Jin, R.; Hiemstra, C.; Zhong, Z.; Feijen, J., *Enzyme-mediated fast in situ formation of hydrogels from dextran-tyramine conjugates*. Biomaterials 2007, 28 (18), pp. 2791 -2800.
29. Park, K.-D.; Joung, Y.-K.; Park, K.-M. *In situ Forming Hydrogel and Biomedical Use Thereof* 2011 (WO2011/028031).

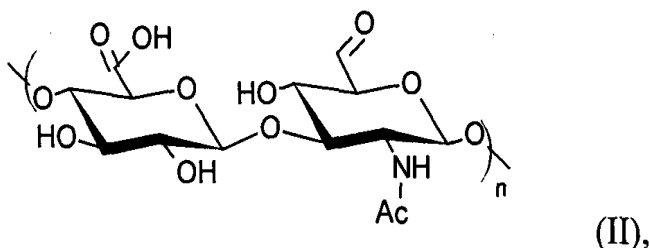
REIVINDICACIONES

1. Derivado basado en ácido hialurónico según la fórmula general (I)



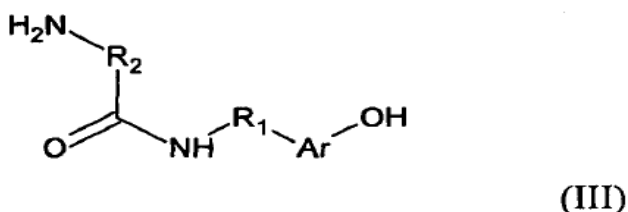
5 donde Ar es fenilo y R<sub>1</sub> es etileno, o Ar es indolo y R<sub>1</sub> es etileno, o Ar es indolo y R<sub>1</sub> es carboxietileno, y donde R<sub>2</sub> es un alquilo que tiene de 3 to 7 átomos de carbono, y donde n está dentro del intervalo de 1 a 7.500.

2. Un método de preparación del derivado definido por la fórmula general (I), caracterizado porque primero se prepara un derivado aldehídico de ácido hialurónico, según la fórmula (II),

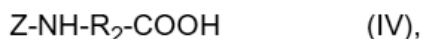


10 donde el derivado de aldehído se prepara usando el sistema de oxidación 4-acetamido-TEMPO/NaClO en un medio prótico y tiene el grado de sustitución de 5 - 15% y el peso molecular dentro del intervalo 10.000 g/mol a 2.000.000 g/mol,

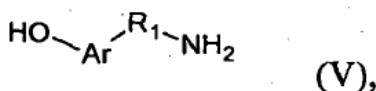
a continuación, se prepara el compuesto de forma separada según la fórmula general (III)



15 donde Ar es fenilo y R<sub>1</sub> es etileno, o Ar es indolo y R<sub>1</sub> es etileno, o Ar es indolo y R<sub>1</sub> es carboxietileno, y donde R<sub>2</sub> es un alquilo que tiene de 3 a 7 átomos de carbono, y donde n está dentro del intervalo de 1 a 7.500, en donde el compuesto según la fórmula general (III) se prepara por la reacción de un precursor espaciador según la fórmula (IV)

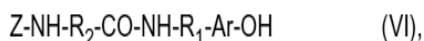


donde Z es un grupo protector que se usa comúnmente para la protección de un grupo amino primario, siendo el ligando según la fórmula (V)



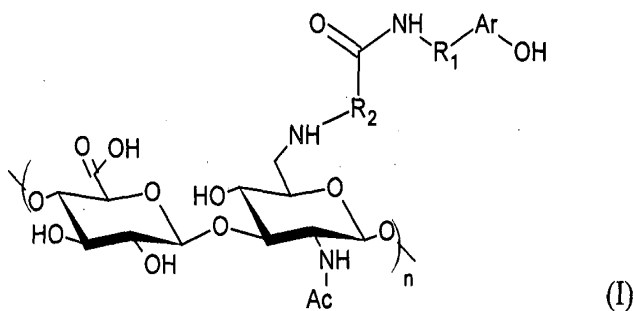
20 en un medio aprótico a una temperatura en el intervalo de 40°C a 150°C, durante 1 a 24 horas, en presencia de un agente que activa los grupos funcionales carboxilo,

dando lugar al compuesto según la fórmula general (VI)



a partir del cual se prepara el compuesto según la fórmula general (III) retirando el grupo protector Z, y a continuación se hace reaccionar el derivado aldehídico de ácido hialurónico según la fórmula (II) con el compuesto según la fórmula general (III) a un pH dentro del intervalo de 3 a 8, a temperatura ambiente durante 1 a 72 horas, en presencia del complejo picolin-borano dando lugar al derivado según la fórmula (I).

- 5 **3.** El método de preparación según la reivindicación 2, caracterizado porque el ligando según la fórmula general (V) se selecciona del grupo que comprende tiramina, serotonina y 5-hidroxitriptofano.
- 10 **4.** El método de preparación según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 3, caracterizado porque el compuesto según la fórmula general (IV), es decir, el precursor espaciador, se selecciona del grupo de aminoácidos que comprende los derivados de ácidos  $\omega$ -[(terc-butoxicarbonil) amino] carboxílicos, donde  $R_2$  es un alquilo que tiene de 3 to 7 átomos de carbono.
- 5.** El método de preparación según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, caracterizado porque la reacción del precursor espaciador con el ligando tiene lugar en un medio de THF o DMF, a la temperatura de 50°C, durante 2 a 6 horas, en presencia de 1,1', -carbodiimidazol.
- 15 **6.** El método de preparación según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, caracterizado porque la retirada del grupo protector Z se realiza por medio de ácido trifluoroacético o ácido clorhídrico.
- 7.** Hidrogel basado en el derivado reticulado según la fórmula general (I)



donde Ar es fenilo y  $R_1$  es etileno, o Ar es indolo y  $R_1$  es etileno, o Ar es indolo y  $R_1$  es carboxietileno, y donde  $R_2$  es un alquilo que tiene de 3 to 7 átomos de carbono, y donde n está dentro del intervalo de 1 a 7.500.

- 20 **8.** Un método de producción del hidrogel definido en la reivindicación 7, caracterizado porque el derivado según la fórmula general (I) se trata con un generador de radicales fenoxi reactivos a un pH en el intervalo de 4 a 10.
- 25 **9.** El método de producción según la reivindicación 8, caracterizado porque el generador de radicales fenoxi reactivos se selecciona del grupo que comprende el sistema de peroxidasa de rábano picante y la fuente de radicales hidroxilo, donde la fuente de radicales hidroxilo puede ser una disolución de peróxido de hidrógeno en agua, o el sistema de oxidasa-oxígeno-sustrato, por ejemplo, galactosa oxidasa - galactosa o glucosa oxidasa - glucosa.
- 10.** Un uso del hidrogel definido en la reivindicación 7 para la producción de preparaciones para cosméticos, medicina o medicina regenerativa.
- 30 **11.** El uso según la reivindicación 10 donde las preparaciones comprenden apósitos para curar heridas, barreras biodegradable que impiden la formación de coalescencias post-cirugía, preparaciones para el aumento de tejidos blandos, rellenos de defectos de tejido, matrices para la ingeniería de tejidos.
- 12.** El uso según la reivindicación 10, donde las preparaciones comprenden matrices sembradas o no sembradas para el tratamiento de defectos de cartílago articular y defectos de huesos.



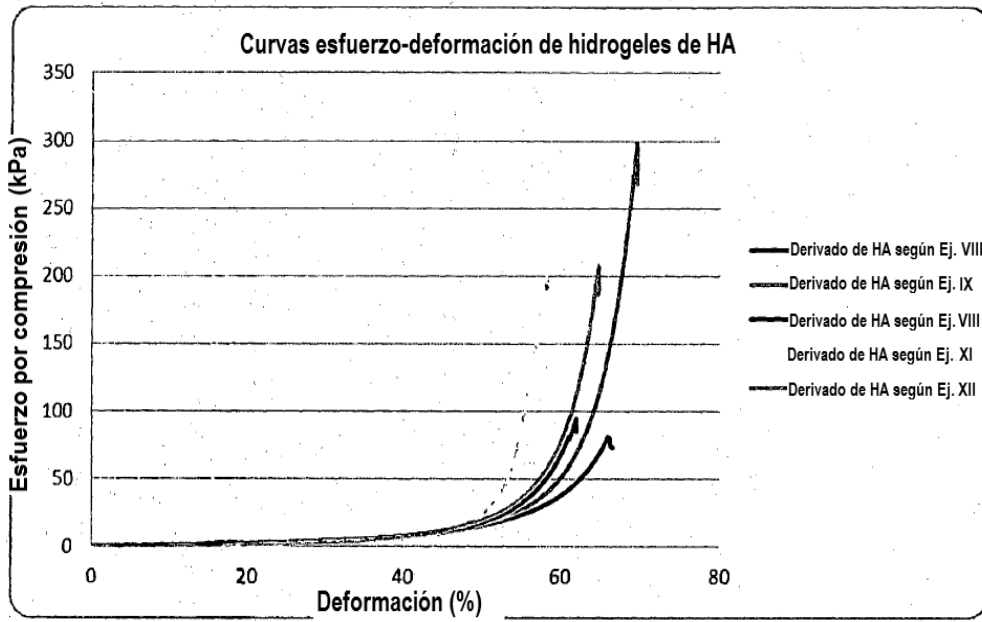


Fig. 1