

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 568 660**

51 Int. Cl.:

**C07D 251/46** (2006.01)

**A61K 47/48** (2006.01)

**C08B 37/08** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.04.2007** **E 07742990 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.01.2016** **EP 2024398**

54 Título: **Método de producción de derivados de ácido hialurónico**

30 Prioridad:

**01.05.2006 JP 2006127837**

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

**03.05.2016**

73 Titular/es:

**SEIKAGAKU CORPORATION (100.0%)  
6-1, MARUNOUCHI, 1-CHOME CHIYODA-KU  
TOKYO 100-0005, JP**

72 Inventor/es:

**YASUDA, YOUSUKE**

74 Agente/Representante:

**SUGRAÑES MOLINÉ, Pedro**

Observaciones :

**Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 568 660 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

Método de producción de derivados de ácido hialurónico

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un método de producción de derivados de polisacárido.

10 **Antecedentes de la técnica**

- 10 Existen polisacáridos diversos según los tipos de sus monosacáridos constituyentes. Los polisacáridos tienen diversos pesos moleculares, propiedades y funciones fisiológicas y son el objetivo popular de intensas investigaciones.
- 15 Tal como se conoce en la técnica, el acoplamiento de un compuesto que tiene un grupo funcional que puede condensarse con un grupo carboxilo con el de ácido hialurónico, que se conoce como polisacárido de alto peso molecular, disminuye la hidrofiliidad del derivado de ácido hialurónico resultante y provoca el problema de solubilidad escasa o incluso insolubilidad.
- 20 Una técnica conocida de manera convencional para el acoplamiento de grupo funcional nucleófilo, que puede unirse a carboxilo y grupo carboxilo de ácido hialurónico usa carbodiimida soluble en agua (CSA) para permitir que reaccione el ácido hialurónico con el grupo amino en un disolvente acuoso (documentos JP 2004-018750 y WO2005/085294). Esta técnica se denomina más adelante en el presente documento el método de CSA. El derivado de ácido hialurónico obtenido mediante el método de CSA tiene el problema de la solubilidad escasa o
- 25 insolubilidad. Según la descripción en el documento JP 2004-018750, cuando la tasa del compuesto introducido por unidad de disacárido de ácido hialurónico (grado de sustitución) es de no menos del 0,05%, el derivado de ácido hialurónico aislado puede ser insoluble en disolventes acuosos neutros. Cuando el grado de sustitución es de no menos del 5%, el derivado de ácido hialurónico aislado es insoluble en disolventes acuosos.
- 30 Para este problema de insolubilidad, el método de producción propuesto en el documento JP 2004-018750 añade una base a la disolución de reacción después de la reacción de condensación del ácido hialurónico. Este tratamiento alcalino permite que el compuesto obtenido mediante el método de CSA pueda disolverse en un disolvente acuoso neutro. El documento WO2005/085294 también adopta esta etapa de tratamiento alcalino del documento JP 2004-018750 para preparar una disolución acuosa neutra del derivado de ácido hialurónico resultante. Concretamente, los
- 35 documentos JP 2004-018750 y WO2005/085294 adoptan el procedimiento de preparación en dos etapas que incluye la etapa de reacción de condensación mediante el método de CSA y la etapa de tratamiento alcalino para preparar un derivado de ácido hialurónico que es soluble en un disolvente acuoso.
- 40 Tal como se describe en el documento JP 2004-018750, se espera que el derivado de ácido hialurónico preparado mediante el método de CSA convencional tenga un cambio en su estructura de orden superior, que puede observarse como el fenómeno de insolubilidad en el disolvente acuoso neutro. Las condiciones de condensación del método de CSA provocan que el derivado de ácido hialurónico sea insoluble en la disolución acuosa neutra. El tratamiento alcalino después del método de CSA tal como se describe en el documento JP 2004-018750 recupera la solubilidad del derivado de ácido hialurónico. La recuperación de la solubilidad en agua se le atribuye a un cambio
- 45 adicional o a la restauración de la estructura de orden superior que se ha cambiado por el método de CSA.
- La etapa de adición de base (tratamiento alcalino) descrita en el documento JP 2004-018750 cambia adicionalmente o restaura la estructura de orden superior que se ha cambiado en el transcurso de la reacción de condensación para recobrar la alta afinidad que se había perdido por el disolvente acuoso.
- 50 Un agente de condensación disponible comercialmente cloruro de 4-(4,6-dimetoxi-1,3,5-triazin-2-il)4-metilmorfolinio (DMT-MM) actúa para la condensación de un grupo carboxilo y un grupo funcional nucleófilo, que puede unirse a carboxilo y se usa principalmente para la síntesis de compuestos de amida mediante condensación de sustancias de bajo peso molecular. Según Tetrahedron 55 (1999) 13159, DMT-MM activa un grupo carboxilo en un disolvente
- 55 acuoso y ayuda a formar un enlace amida con un grupo amino a una alta tasa. El documento JP 2005-281372 describe la aplicación de DMT-MM para formar un enlace amida entre un grupo carboxilo de un derivado de ciclodextrina con introducción de grupo carboxilo y un grupo amino de quitosano. Sin embargo, este método de producción del documento JP 2005-281372 tiene como objetivo proporcionar un derivado insoluble. No ha habido ningún informe referente a la aplicación de DMT-MM para la reacción de condensación de un grupo carboxilo de un polisacárido de alto peso molecular (por ejemplo, ácido hialurónico) con un grupo funcional que puede unirse a
- 60 carboxilo de un compuesto orgánico con vistas a la preparación de un derivado soluble en agua. Tampoco ha habido ningún informe que describa las propiedades de una disolución acuosa del derivado resultante o el cambio de la estructura de orden superior del derivado resultante.

**Divulgación de la invención**

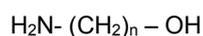
De manera convencional para la reacción de condensación, se ha usado un agente de condensación soluble en agua (carbodiimida soluble en agua) para formar un enlace químico entre un grupo carboxilo de un polisacárido y un grupo funcional de un compuesto orgánico que puede condensarse con el grupo carboxilo. Sin embargo, el derivado de polisacárido preparado no es soluble de manera homogénea en un disolvente acuoso neutro. Para aumentar la solubilidad del producto, se requiere una etapa extra de adición de una base a la disolución de reacción después de la reacción de condensación.

Existen altas demandas de desarrollo de un procedimiento sencillo que permita producir un producto altamente soluble mediante la reacción de acoplamiento de un polisacárido que tiene un grupo carboxilo y un compuesto orgánico que tiene un grupo funcional que puede condensarse con el grupo carboxilo.

Tal como se mencionó anteriormente, los derivados de polisacárido de la técnica anterior preparados mediante la reacción de ácido hialurónico u otro polisacárido que tiene un grupo carboxilo y un compuesto orgánico que tiene un grupo funcional que puede condensarse con el grupo carboxilo tienen cambios significativos en sus estructuras de orden superior y no son fácilmente solubles en disolventes acuosos neutros.

Los inventores han realizado intensos estudios para resolver este problema de la técnica anterior y diseñar un método sencillo y eficaz de producción de derivados de polisacárido. Como resultado de los intensos estudios, los inventores han encontrado que el uso de un agente de condensación específico, en lugar de la CSA como agente de condensación usada de manera convencional, produce rápida y eficazmente derivados de polisacárido útiles que tienen buena solubilidad en disolventes acuosos, y de ese modo completaron la presente invención.

Por tanto, la presente invención se refiere a un método sencillo y eficaz de producción de derivados de polisacárido de alto peso molecular. Es un objeto de la invención proporcionar un método de producción de un derivado de polisacárido que comprende un polisacárido que tiene un grupo carboxilo unido a un compuesto orgánico que tiene un grupo funcional que puede condensarse con el grupo carboxilo, que comprende permitir que reaccione el polisacárido con el compuesto orgánico mediante el uso de cloruro de 4-(4,6-dimetoxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metilmorfolinio, en el que el polisacárido que tiene un grupo carboxilo es un ácido hialurónico que tiene un peso molecular promedio en peso de 100.000 a 5.000.000, en el que el grado de sustitución del compuesto orgánico está en el intervalo del 5 al 20% tal como se determina a través de cálculos basados en la cantidad de ácido hialurónico determinada mediante la reacción de carbazol-ácido sulfúrico y la cantidad del compuesto orgánico tal como se determina mediante espectrofotometría, y en el que el compuesto orgánico es un compuesto obtenido mediante la unión covalente de un compuesto fotorreactivo o un fármaco antiinflamatorio no esteroideo (AINE) a una sustancia espaciadora, en el que la sustancia espaciadora tiene la siguiente fórmula:



en la que n representa un número entero de 2 a 18.

Es un objeto adicional de la invención proporcionar un método tal como se describió anteriormente, en el que n representa un número entero de 2 a 12.

Es un objeto adicional de la invención proporcionar un método tal como se describió anteriormente, en el que el compuesto fotorreactivo se selecciona de ácido cinámico o derivados de cinamato.

Es un objeto adicional de la invención proporcionar un método tal como se describió anteriormente, en el que el AINE es un diclofenaco.

Es un objeto adicional de la invención proporcionar un método tal como se describió anteriormente, en el que la sustancia espaciadora es aminopropanol.

Es un objeto adicional de la invención proporcionar un método tal como se describió anteriormente, en el que la sustancia espaciadora es aminoetanol.

**Descripción las realizaciones preferidas**

La presente invención se describe a continuación en detalle con referencia a algunas realizaciones.

A menos que se especifique de otro modo, un disolvente acuoso que va a usarse en la presente invención puede ser cualquiera de agua, disoluciones tampón que contienen agua, disoluciones acuosas y disoluciones tampón que contienen sales de metal farmacéuticamente aceptables y agentes de ajuste del pH. Los ejemplos típicos del disolvente acuoso incluyen agua destilada para inyección, solución salina tamponada con fosfato y solución salina normal. A menos que se especifique de otro modo, el peso molecular del polisacárido se expresa mediante el peso molecular promedio en peso en la presente invención.

La presente invención proporciona un método novedoso de producción de derivados de polisacárido, tal como se define en la reivindicación 1.

5 El polisacárido que va a usarse como material de partida en el método de la presente invención es un polisacárido que tiene un grupo carboxilo y es un polisacárido que tiene un grupo carboxilo y un peso molecular en el intervalo de 100.000 a 5.000.000. El polisacárido puede ser cualquiera de polisacáridos naturales que se extraen y se aíslan de, por ejemplo, animales, polisacáridos artificiales que se producen por microorganismos modificados genéticamente, y polisacáridos sintéticos que se producen mediante síntesis químicas, así como polisacáridos disponibles comercialmente. El polisacárido es un ácido hialurónico. También se describen derivados carboximetilados químicamente de un polímero de hidrato de carbono neutro, tal como carboximetilcelulosa. Los ejemplos específicos del ácido hialurónico incluyen hialuronato de sodio.

15 El efecto del método de producción de la invención, que se describe más tarde en detalle, la alta solubilidad del derivado de polisacárido resultante en un disolvente acuoso, es especialmente destacado en un polisacárido que tiene un alto peso molecular y un contenido relativamente bajo de un sustituyente tal como el grupo sulfato que potencia la solubilidad en agua del polisacárido. Un ácido hialurónico se aprovecha del efecto significativo.

20 El ácido hialurónico es un polímero que tiene una unidad de disacárido de ácido D-glucurónico y N-acetil-D-glucosamina. En la presente descripción, el ácido hialurónico puede ser un ácido hialurónico modificado que tiene una estructura de repetición de la unidad de disacárido y al menos un grupo carboxilo no modificado. El ácido hialurónico modificado que va a usarse como material de partida en el método de producción de la invención es cualquier ácido hialurónico modificado que se derive del ácido hialurónico y tenga al menos un grupo carboxilo no modificado. Un ejemplo típico es un ácido hialurónico modificado que tiene otro compuesto de bajo peso molecular (por ejemplo, un alcohol, una sustancia farmacológica, o derivados de cinamato) que se introduce en parte del grupo carboxilo del ácido hialurónico.

25 El ácido hialurónico que va a usarse como material de partida puede ser cualquiera de diversas sales farmacéuticamente aceptables de ácido hialurónico y ácido hialurónico modificado.

30 Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen sales de metal alcalino tales como sal de sodio y sal de potasio y sales de metal alcalinotérreo tales como sal de magnesio y sal de calcio. Se prefieren las sales de metal alcalino, y se prefiere particularmente la sal de sodio.

35 El peso molecular promedio en peso del ácido hialurónico que va a usarse como material de partida está en el intervalo de 100.000 a 5.000.000, que muestra ser característico de un polímero de polisacárido. El peso molecular promedio en peso del ácido hialurónico está más preferiblemente en un intervalo de 500.000 a 3.000.000.

40 El compuesto orgánico que tiene un grupo funcional que puede condensarse con un grupo carboxilo es un compuesto que dona o comparte un electrón a o con un átomo de baja densidad electrónica y, por consiguiente, puede condensarse con un grupo carboxilo. El grupo funcional es un grupo hidroxilo o un grupo amino. El compuesto orgánico que tiene un grupo funcional que puede condensarse con un grupo carboxilo es preferiblemente un compuesto que tiene al menos un grupo amino. El polisacárido que tiene un grupo carboxilo y el compuesto orgánico que tiene el grupo funcional que puede condensarse con el grupo carboxilo se unen preferiblemente entre sí mediante un enlace éster o enlace amida. Se prefiere especialmente la unión a través del enlace amida, que garantiza altos rendimientos de productos estables mediante reacciones en disolventes que contienen agua.

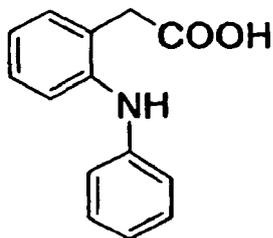
45 El compuesto orgánico que tiene un grupo funcional que puede condensarse con un grupo carboxilo se selecciona de manera apropiada de diversos compuestos orgánicos que tienen grupos funcionales que pueden condensarse con un grupo carboxilo según el fin y la aplicación de los derivados de polisacárido resultantes.

50 El compuesto orgánico que tiene un grupo funcional que puede condensarse con un grupo carboxilo es un compuesto obtenido mediante la unión covalente de un compuesto fotorreactivo o un AINE a una sustancia espaciadora definida anteriormente.

55 En el caso de preparación del derivado de polisacárido mediante condensación de un compuesto fotorreactivo o AINE y el polisacárido que tiene un grupo carboxilo, el compuesto orgánico que tiene un grupo funcional que puede condensarse con un grupo carboxilo se selecciona de manera apropiada según un efecto farmacéutico deseado o una actividad fisiológica deseada y la aplicación del derivado de polisacárido resultante.

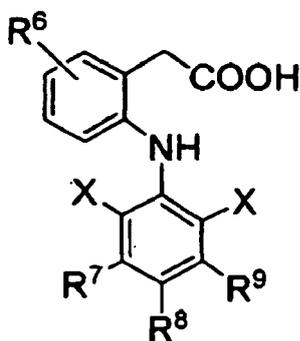
60 Existe una diversidad de AINE incluyendo AINE de salicilato, AINE de fenamato, AINE de ácido arilacético, AINE de ácido propiónico y AINE de oxicam, así como tiaramida, tolmetina, diflunisal, paracetamol, floctafenina y tinoridina. Se usan preferiblemente como sustancia farmacológica compuestos que tienen una estructura mostrada mediante la fórmula (2):

65



(2)

5 Se prefieren especialmente los compuestos mostrados mediante la fórmula general (3):



(3)

10 En la fórmula general (3), R<sup>6</sup> representa un átomo de hidrógeno o un sustituyente seleccionado de grupos alquilo inferior y grupos alcoxilo inferior.

R<sup>7</sup>, R<sup>8</sup> y R<sup>9</sup> representan independientemente un átomo de halógeno, un átomo de hidrógeno o un sustituyente seleccionado de grupos alquilo inferior, grupos alcoxilo inferior y grupos hidroxilo.

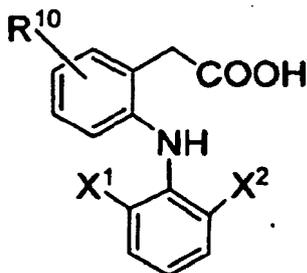
15 X representa independientemente un átomo de halógeno o un sustituyente seleccionado de grupos alquilo inferior y grupo trifluorometilo, y al menos uno de X es un átomo de halógeno.

20 Entre los grupos alquilo inferior y los grupos alcoxilo inferior, se prefieren grupos alquilo inferior y grupos alcoxilo inferior lineales o ramificados, cualquiera de los cuales tiene de 1 a 12 átomos de carbono, y se prefieren particularmente grupos alquilo inferior y grupos alcoxilo inferior lineales o ramificados, cualquiera de los cuales tiene de 1 a 6 átomos de carbono.

25 R<sup>6</sup> se une preferiblemente en la posición 5 del anillo de benceno que tiene un grupo carboximetilo en la posición 1 y un residuo amino en la posición 2.

El compuesto mostrado mediante la fórmula general (3) incluye, por ejemplo, un compuesto dado a conocer en el documento WO99/11605.

30 También se prefieren compuestos mostrados mediante la fórmula general (4):



(4)

En la fórmula general (4), R<sup>10</sup> representa un átomo de hidrógeno o un sustituyente seleccionado de grupos alquilo

inferior y grupos alcoxilo inferior. R<sup>10</sup> es preferiblemente un átomo de hidrógeno o un sustituyente seleccionado de grupos alquilo inferior lineales o ramificados que tienen de 1 a 12 átomos de carbono, y es más específicamente un átomo de hidrógeno o un sustituyente seleccionado de grupos alquilo inferior que tiene de 1 a 4 átomos de carbono.

5 X<sup>1</sup> y X<sup>2</sup> representan independientemente un átomo de halógeno o un sustituyente seleccionado de grupos alquilo inferior y grupo trifluorometilo, y al menos uno de X<sup>1</sup> y X<sup>2</sup> es un átomo de halógeno. Ambos de X<sup>1</sup> y X<sup>2</sup> son preferiblemente un átomo de halógeno y son más preferiblemente o bien un átomo de flúor o bien un átomo de cloro.

10 Un ejemplo típico del compuesto mostrado mediante la fórmula general (4) es diclofenaco que tiene un átomo de hidrógeno para R<sup>10</sup> y átomos de cloro para ambos de X<sup>1</sup> y X<sup>2</sup>.

15 El compuesto orgánico que tiene el grupo funcional que puede condensarse con un grupo carboxilo se obtiene mediante la unión covalente de un compuesto fotorreactivo, tal como un ácido cinámico o un derivado de cinamato, o un AINE a una sustancia espaciadora que tiene al menos dos grupos funcionales tal como se definieron anteriormente.

20 La sustancia espaciadora que tiene al menos dos grupos funcionales tiene al menos un primer grupo funcional que puede condensarse con un grupo carboxilo (el grupo amino o grupo hidroxilo) y un segundo grupo funcional que puede condensarse con un grupo funcional del compuesto fotorreactivo o AINE, y por consiguiente el segundo grupo funcional de la sustancia espaciadora se condensa con el grupo funcional del compuesto fotorreactivo o AINE mediante un enlace covalente para preparar un compuesto orgánico que tiene un grupo funcional (el primer grupo funcional) que puede condensarse con un grupo carboxilo.

25 Por ejemplo, la sustancia espaciadora que tiene al menos dos grupos funcionales se une con el compuesto fotorreactivo o AINE que tiene el grupo funcional mediante un enlace éster o enlace amida.

30 Incluso cuando el compuesto fotorreactivo o AINE no tiene originariamente un grupo funcional que puede condensarse con un grupo carboxilo, la unión covalente del segundo grupo funcional de la sustancia espaciadora al grupo funcional del compuesto fotorreactivo o AINE produce un compuesto fotorreactivo o AINE que tiene el grupo funcional (el primer grupo funcional) que puede condensarse con un grupo carboxilo.

35 La sustancia espaciadora que tiene al menos dos grupos funcionales se selecciona de manera apropiada según el fin y la aplicación del derivado de polisacárido resultante que va a obtenerse mediante el método de producción de la invención.

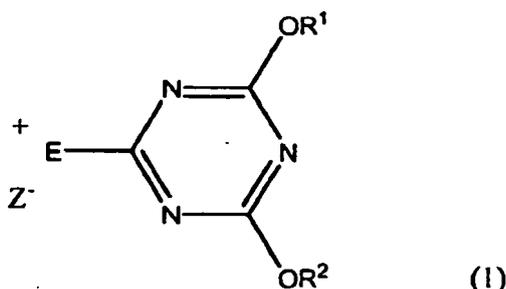
La sustancia espaciadora que tiene al menos dos grupos funcionales puede seleccionarse de manera correspondiente al grupo funcional del AINE descrito anteriormente para formar un compuesto covalente.

40 El primer grupo funcional de la sustancia espaciadora es un grupo funcional que puede condensarse con un grupo carboxilo del polisacárido. Una sustancia espaciadora que tiene un grupo carboxilo como segundo grupo funcional podría unirse a un grupo hidroxilo del AINE o el FARME mediante un enlace éster. Una sustancia espaciadora de la invención que tiene un grupo hidroxilo como segundo grupo funcional o una sustancia espaciadora que tiene un grupo amino como segundo grupo funcional es aplicable para unirse al grupo carboxilo del AINE mediante un enlace éster o mediante un enlace amida, respectivamente. El enlace de la sustancia espaciadora con la sustancia farmacológica se selecciona de manera apropiada según el fin y la aplicación del producto final que va a obtenerse mediante el método de producción de la invención. El enlace éster se selecciona preferiblemente para la fácil descomposición del compuesto resultante en un organismo vivo.

50 El compuesto espaciador que tiene al menos dos grupos funcionales que van a unirse al AINE mencionado anteriormente es un aminoalcohol mostrado mediante la fórmula de H<sub>2</sub>N - (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub> - OH (n representa un número entero de 2 a 18 o más preferiblemente un número entero de 2 a 12). Ejemplos preferidos son aminoalquil-alcoholes sustituidos o no sustituidos que tienen de 2 a 12 átomos de carbono. Los ejemplos específicos incluyen aminoalquil-alcoholes lineales sustituidos y no sustituidos que tienen de 2 a 5 átomos de carbono.

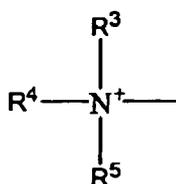
55 El aminoalcohol también puede usarse como sustancia espaciadora que va a unirse al compuesto fotorreactivo, tal como ácido cinámico o derivado de cinamato.

60 El agente de condensación usado en el método de producción de la presente invención es un compuesto mostrado mediante la fórmula general (1):



Específicamente, cloruro de 4-(4,6-dimetoxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metilmorfolinio (DMT-M M).

- 5 R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> representan independientemente un sustituyente seleccionado de grupos alquilo de 1 a 4 átomos de carbono y grupos arilo de 6 a 8 átomos de carbono; Z<sup>-</sup> representa un contraanión; y E<sup>+</sup> representa un grupo orgánico mostrado como:



- 10 R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> representan independientemente un grupo orgánico que tiene al menos un átomo de carbono unido directamente a un átomo de nitrógeno cuaternario y dos cualesquiera o todos de R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> pueden unirse entre sí para formar una estructura cíclica.

- 15 En el compuesto mostrado mediante la fórmula general (1), cada uno de R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> representa un grupo metilo, E<sup>+</sup> representa un grupo N-metilmorfolinio y Z<sup>-</sup> representa un anión de cloro.

20 El compuesto mostrado mediante la fórmula general (1) es, por ejemplo, una sal de amonio cuaternario dada a conocer en el documento WO00/53544.

25 En el método de producción de la presente invención, el agente de condensación que va a usarse para la reacción de condensación no es necesariamente una sustancia aislada, sino que puede formarse en el sistema de reacción de condensación. Concretamente, el agente de condensación que va a usarse en el método de producción de la invención puede ser una sustancia (material de reacción) que forma el compuesto mostrado mediante la fórmula general (1) en el sistema de reacción de condensación.

30 Las condiciones de reacción en el método de producción de la invención se describen a continuación, aunque pueden seleccionarse de manera apropiada por un experto en la técnica para obtener los derivados de polisacárido deseados.

35 La cantidad del agente de condensación que va a usarse para la reacción de condensación está preferiblemente en un intervalo de 0,0005 a 0,4 equivalentes, más preferiblemente en un intervalo de 0,001 a 0,3 equivalentes, o todavía más preferiblemente en un intervalo de 0,003 a 0,25 equivalentes con respecto a un mol del grupo carboxilo del polisacárido como material de partida. Cuando se desconoce la pureza del agente de condensación, por ejemplo, debido a la presencia de agua de hidratación, se calcula la pureza del agente de condensación como el factor de actividad de condensación a partir del rendimiento de condensación de un ácido carboxílico de bajo peso molecular y una amina de bajo peso molecular, y se usa la pureza calculada para la estimación del número de moles del agente de condensación por peso unitario.

40 La cantidad del compuesto orgánico que tiene un grupo funcional que puede condensarse con un grupo carboxilo no está particularmente limitada siempre que la cantidad no sea menor que la cantidad del agente de condensación que va a usarse. Cuando el compuesto orgánico se une al polisacárido por medio de un enlace amida, la cantidad molar del compuesto orgánico es preferiblemente igual a la cantidad molar del agente de condensación para una mejor eficacia de purificación.

45 La temperatura de reacción está en un intervalo de 0°C a 60°C, preferiblemente en un intervalo de 4°C a 50°C y más preferiblemente en un intervalo de 15°C a 40°C.

50 El tiempo de reacción depende de la temperatura de reacción y la reactividad del grupo funcional que puede condensarse con un grupo carboxilo. El tiempo de reacción no está particularmente limitado pero puede ser, por ejemplo, de 3 a 24 horas.

Los ejemplos disponibles del disolvente para la disolución de reacción incluyen agua, disolventes orgánicos miscibles en agua y mezclas de disolventes de los mismos. Se usa etanol como disolvente orgánico miscible en agua preferible, debido a su baja toxicidad para el cuerpo humano y su aplicabilidad frente a diversas regulaciones. Los disolventes y su razón de mezclado se determinan de manera apropiada según la solubilidad del polisacárido que tiene un grupo carboxilo, tal como ácido hialurónico, la eficacia de reacción y la eficacia de purificación. En algunos casos, los disolventes orgánicos no pueden usarse para la disolución de reacción.

El método de CSA convencional usa generalmente 1,4-dioxano y tetrahidrofurano como disolventes orgánicos para la disolución de reacción. El método de producción de la presente invención no usa tales disolventes orgánicos tóxicos y, por tanto, reduce la toxicidad del disolvente de la disolución de reacción.

El derivado de polisacárido preparado mediante el método de producción de la presente invención puede purificarse mediante cualquiera de las técnicas conocidas de manera convencional que pueden aplicarse para la purificación de polisacáridos. Se aplican preferiblemente el método de precipitación con disolvente orgánico que usa etanol y la cromatografía en columna de filtración en gel para la purificación.

El derivado de polisacárido obtenido mediante el método de producción de la presente invención tiene alta solubilidad en disolventes acuosos neutros.

El derivado de ácido hialurónico producido mediante el método de producción de la presente invención se compara con el derivado de ácido hialurónico producido mediante el método de CSA convencional. Estos derivados de ácido hialurónico tienen estructuras químicas similares mediante condensación de ácido hialurónico que tiene un grupo carboxilo y el compuesto orgánico que tiene un grupo funcional que puede condensarse con un grupo carboxilo, pero tienen solubilidades en agua significativamente diferentes. Este hecho sugiere una diferencia notable en las estructuras de orden superior de estos derivados de ácido hialurónico. En condiciones de un grado de sustitución idéntico de compuesto orgánico, el derivado de ácido hialurónico preparado mediante el método de producción de la presente invención es altamente soluble en un disolvente acuoso y produce una disolución transparente y viscosa sin ninguna sustancia sólida visible, mientras que el derivado de ácido hialurónico preparado mediante el método de CSA convencional no es soluble en agua destilada y produce una suspensión de materias insolubles. Tal diferencia entre el derivado de ácido hialurónico mediante el método de producción de la presente invención y el derivado de ácido hialurónico mediante el método de CSA se encuentra al menos en derivados de ácido hialurónico que tienen un grado de sustitución del compuesto orgánico en el intervalo del 5% al 20%, aunque la diferencia puede verse afectada por la hidrofobicidad del compuesto orgánico introducido.

El documento JP2004-18750 da a conocer la etapa extra de adición de una base a la disolución de reacción, además del procedimiento de producción del derivado de ácido hialurónico mediante el método de CSA convencional. Según este documento, el derivado de ácido hialurónico resultante tiene una alta dispersión molecular en agua. Sin embargo, la dispersión molecular de este derivado de ácido hialurónico en agua se disminuye una vez en el transcurso de o después de la reacción de condensación mediante el método de CSA. La dispersión molecular disminuida sugiere un cambio en la estructura de orden superior del derivado de ácido hialurónico resultante. La adición de la base puede recuperar la dispersión molecular que había disminuido. Pero esto no significa que el derivado de ácido hialurónico resultante recupere su estructura de orden superior original del ácido hialurónico.

Por otra parte, el método de producción de la presente invención produce el derivado de ácido hialurónico sin dañar la estructura de orden superior original del ácido hialurónico.

La técnica de la técnica anterior dada a conocer en el documento JP2004-18750 requiere esencialmente la etapa extra de adición de una base para cambiar o restaurar la estructura de orden superior del ácido hialurónico y recuperar la solubilidad que había disminuido del derivado de ácido hialurónico en el disolvente acuoso. Por tanto, se requiere una selección cuidadosa de las condiciones apropiadas de tratamiento alcalino para impedir la alteración del derivado de ácido hialurónico en condiciones básicas. Se recomienda el uso de una cantidad adecuada de una base inorgánica débil en el método del documento JP2004-18750. Por otra parte, el método de producción de la presente invención no requiere tal selección cuidadosa de las condiciones de reacción con el fin de impedir la alteración del derivado de ácido hialurónico, siempre que transcurra en las condiciones de reacción mencionadas anteriormente.

En el método de producción de la presente invención, también puede realizarse una etapa extra de adición de una base a la disolución de reacción tal como se da a conocer en el documento JP2004-18750 después de la reacción de condensación con el fin de conferir mayor solubilidad en agua al derivado de polisacárido resultante. En la etapa extra de adición de base, puede añadirse una disolución acuosa de hidrogenocarbonato de sodio a la disolución de reacción del derivado de polisacárido. En lugar de hidrogenocarbonato de sodio, también puede usarse cualquier otra base adecuada dada a conocer en el documento JP2004-18750. Por ejemplo, puede usarse una base inorgánica, carbonato de sodio, para hacer que la disolución de reacción sea levemente alcalina.

El derivado de ácido hialurónico y los demás derivados de polisacárido producidos mediante el método de la

presente invención tienen preferiblemente las características tal como se describen a continuación.

La permeabilidad a través de un filtro poroso es un índice típico de la dispersión molecular o la solubilidad del derivado de polisacárido en agua. Por ejemplo, se prepara una disolución acuosa neutra al 1,0% (p/v) del derivado de ácido hialurónico resultante y se hace pasar a través de un filtro poroso. La concentración de la disolución acuosa del derivado de ácido hialurónico se mide antes y después de la filtración. Una disminución pequeña o ausente en la concentración del derivado de ácido hialurónico indica la alta solubilidad en agua del derivado de ácido hialurónico. El derivado de polisacárido obtenido mediante el método de producción de la presente invención no se adsorbe ni se retira mediante filtración de su disolución acuosa al 1,0% (p/v) a través de un filtro poroso (que tiene un diámetro de poro de 5  $\mu\text{m}$  o 0,45  $\mu\text{m}$ ) y no tiene un cambio significativo en la concentración antes y después de la filtración. Tal como se describe más adelante en los ejemplos, cuando el grado de sustitución del compuesto orgánico no es mayor de aproximadamente el 14%, el derivado de ácido hialurónico resultante tiene una permeabilidad extremadamente alta a través de un filtro de 0,22  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro que se usa generalmente para la esterilización por filtración.

Una disolución, en la que un soluto se dispersa y disuelve suficientemente en un disolvente, pasa generalmente a través de un filtro sin un aumento significativo en la concentración. Además de la dispersión molecular y la solubilidad del derivado de polisacárido, existen otros factores que afectan a la permeabilidad en filtro. Por ejemplo, cuando el compuesto orgánico que va a unirse al polisacárido tiene alta hidrofobicidad, la adsorción inespecífica de la parte hidrófoba del material de filtro puede disminuir la permeabilidad en filtro con un aumento en el grado de sustitución del compuesto orgánico.

El método de producción de la presente invención puede producir el derivado de polisacárido mientras que se mantiene la alta hidrofiliidad a lo largo de todo el procedimiento de producción. Concretamente, el derivado de ácido hialurónico que va a producirse mediante el método de producción de la presente invención mantiene la estructura de orden superior original del ácido hialurónico y las características derivadas de la estructura de orden superior. El método de producción de la presente invención produce un derivado de ácido hialurónico u otro derivado de polisacárido que tiene no sólo las características originales de un polisacárido que tiene un grupo carboxilo sino también las características de un compuesto orgánico que va a unirse al grupo carboxilo. Cuando una sustancia fisiológicamente activa, una sustancia farmacológica, o la sustancia fisiológicamente activa o la sustancia farmacológica que se une con un compuesto espaciador, tal como un alcohol inferior o aminoácido, de manera que puede descomponerse en condiciones fisiológicas, se usa como compuesto orgánico que tiene un grupo funcional para la síntesis del derivado de polisacárido, el derivado de polisacárido resultante se usa como fármaco de liberación sostenida excelente sin perder las características del polisacárido.

Por ejemplo, para producir un derivado de polisacárido que es aplicable para tratar la inflamación y el dolor acompañados por artropatía, una sustancia unida covalentemente de un AINE como fármaco antiinflamatorio y un aminoalquil-alcohol (compuesto espaciador) tal como aminoetanol o aminopropanol mediante un enlace éster del grupo carboxilo del AINE con el grupo hidroxilo del aminoalquil-alcohol se selecciona como compuesto orgánico que tiene el grupo funcional que puede condensarse con un grupo carboxilo. Por otro lado, ácido hialurónico, que se aplica generalmente para el tratamiento de artropatía, se selecciona como polisacárido que tiene un grupo carboxilo. Entonces, el grupo amino del aminoalquil-alcohol se condensa con el grupo carboxilo de ácido hialurónico en el método de producción de la presente invención. El derivado de ácido hialurónico obtenido mantiene la alta solubilidad en agua y es fácilmente aplicable a un fármaco eficaz para inyección u otra aplicación local. El derivado de ácido hialurónico tiene un enlace éster que se descompone en un organismo vivo y, por consiguiente, logra las propiedades de liberación sostenida del AINE.

### Ejemplos

La presente invención se describe a continuación en detalle basándose en ejemplos. Sin embargo, el alcance de la presente invención no se limita a estos ejemplos.

En todos los ejemplos, se adquirió hialuronato de sodio de Seikagaku Corporation, y se adquirió cloruro de 4-(4,6-dimetoxi-1,3,5-triazin-2-il)4-metilmorfolinio (DMT-MM) de Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (lote EWRO0514). Se preparó clorhidrato de aminopropanol-diclofenaco mediante el procedimiento descrito en el ejemplo de referencia 5 y el ejemplo 38 del documento WO2005/066214. Se preparó clorhidrato de cinamato de aminopropanol (clorhidrato de cinamato de 3-aminopropilo) mediante el procedimiento descrito en el ejemplo 1 de la patente japonesa n.º 3343181 y el ejemplo 1 de la patente estadounidense n.º 6.025.444.

#### <Medición>

##### Medición del grado de sustitución

En los experimentos a continuación, se midió el grado de sustitución mediante espectrofotometría, a menos que se especifique de otro modo. Específicamente, se determinó la cantidad de ácido hialurónico en cada disolución de muestra mediante la reacción de carbazol-ácido sulfúrico, y se determinó la cantidad de cada compuesto introducido

mediante espectrofotometría, y luego se calculó el grado de sustitución a partir de los dos valores cuantitativos.

Como para la medición del grupo aminoetanol-diclofenaco, se disolvió cada disolución de muestra en agua destilada y se determinó la cantidad de diclofenaco a partir de la absorbancia basada en diclofenaco a aproximadamente 280 nm mediante espectrofotometría.

Como para la medición del grupo cinamato de aminopropanol, se disolvió cada disolución de muestra en disolución acuosa de hidróxido de sodio 0,1 mol/l y se determinó la cantidad del grupo cinamato grupo a partir de la absorbancia basada en grupo cinamato a aproximadamente 269 nm mediante espectrofotometría.

<Ejemplo de referencia 1>

Síntesis de hialuronato de sodio con introducción de aminoetanol-diclofenaco

En 22,5 ml de agua/22,5 ml de dioxano, se disolvieron 200 mg de hialuronato de sodio que tenía un peso molecular promedio en peso de 800.000, y luego se añadieron de manera secuencial 0,450 ml de disolución acuosa de N-hidroxisuccinimida (HOSu) 1 mol/l, 0,450 ml de disolución acuosa de clorhidrato de carbodiimida soluble en agua (WSCl·HCl) 0,5 mol/l y 2,25 ml de disolución de clorhidrato de aminopropanol-diclofenaco 0,1 mol/l (agua: dioxano = 1:1) y se agitó durante la noche. Se dividió la disolución de reacción en dos porciones iguales, y se usó una de las dos porciones para el ejemplo de referencia 1 y se usó la otra porción para el ejemplo de referencia 2. Después de la adición y disolución de 0,5 g de cloruro de sodio en la primera porción de la disolución de reacción, se precipitó la mezcla añadiendo 100 ml de etanol. Se lavó el precipitado de manera secuencial con etanol al 85% dos veces, con etanol dos veces y con dietil éter una vez y se secó durante la noche a presión reducida a temperatura ambiente para dar una porción de 113,3 mg de un sólido blanco.

<Ejemplo de referencia 2>

Síntesis de hialuronato de sodio con introducción de aminoetanol-diclofenaco

A la otra porción de la disolución de reacción preparada en el ejemplo de referencia 1, se le añadieron 1,5 ml de disolución acuosa de hidrogenocarbonato de sodio al 5%, seguido por agitación durante 3,5 horas. Después de neutralizar la disolución de reacción añadiendo ácido acético al 50%, se le añadieron 0,5 g de cloruro de sodio. Se precipitó la mezcla añadiendo 100 ml de etanol. Se lavó el precipitado de manera secuencial con etanol al 85% dos veces, con etanol dos veces y con dietil éter una vez y se secó durante la noche a presión reducida a temperatura ambiente para dar una porción de 111,5 mg de un sólido blanco. El grado de sustitución era del 20,6%.

<Ejemplo de referencia 3>

Síntesis de hialuronato de sodio con introducción de aminoetanol-diclofenaco

En 15,7 ml de agua/15,7 ml de dioxano, se disolvieron 133 mg de hialuronato de sodio que tenía un peso molecular promedio en peso de 800.000, y luego se añadieron de manera secuencial 0,267 ml de disolución acuosa de HOSu 1 mol/l, 0,267 ml de disolución acuosa de WSCl·HCl 0,5 mol/l y 0,933 ml de disolución de clorhidrato de aminopropanol-diclofenaco 0,143 mol/l (agua: dioxano = 1:1), y se agitó durante la noche. A la disolución de reacción, se le añadieron 4 ml de disolución acuosa de hidrogenocarbonato de sodio al 5%, y se agitó durante 3 horas. Después de neutralizar la disolución de reacción añadiendo ácido acético al 50%, se le añadieron 0,67 g de cloruro de sodio. Se precipitó la mezcla añadiendo 133 ml de etanol. Se lavó el precipitado de manera secuencial con etanol al 85% dos veces, con etanol dos veces y con dietil éter una vez y se secó durante la noche a presión reducida a temperatura ambiente para dar una porción de 124,0 mg de un sólido blanco. El grado de sustitución era del 14,3%.

<Ejemplo de referencia 4>

Síntesis de hialuronato de sodio con introducción de aminoetanol-diclofenaco

En el ejemplo de referencia 4, se obtuvieron 124,0 mg de una sustancia sólida blanca como producto resultante mediante el mismo procedimiento que el del ejemplo de referencia 3 excepto porque se cambió el tiempo de agitación de 3 horas a 1 hora después de la adición de hidrogenocarbonato de sodio acuoso al 5% a la disolución de reacción.

<Ejemplo 1>

Síntesis de hialuronato de sodio con introducción de aminoetanol-diclofenaco

En 10 ml de agua/10 ml de etanol, se disolvieron 100 mg de hialuronato de sodio que tenía un peso molecular promedio en peso de 800.000 y luego se añadieron de manera secuencial 0,556 ml de disolución de clorhidrato de

aminopropanol-diclofenaco 0,0676 mol/l (agua: etanol=1:1) y 0,800 ml de disolución de DMT-MM 16,8 mg/ml (agua: etanol = 1:1), y se agitó durante la noche. Después de la adición de 0,5 g de cloruro de sodio a la disolución de reacción, se precipitó la mezcla añadiendo 100 ml de etanol. Se lavó el precipitado de manera secuencial con etanol al 85% dos veces, con etanol dos veces y con dietil éter una vez y se secó durante la noche a presión reducida a temperatura ambiente para dar una porción de 87,6 mg de un sólido blanco. El grado de sustitución era del 13,8%.

<Ejemplo 2>

Síntesis de hialuronato de sodio con introducción de aminoetanol-diclofenaco

En el ejemplo 2, se obtuvieron 103,5 mg de una sustancia sólida blanca como producto resultante mediante el mismo procedimiento que el del ejemplo de trabajo 1 excepto porque se añadieron 0,800 ml de disolución de clorhidrato de aminopropanol-diclofenaco 0,05 mol/l (agua: etanol = 1:1) y 0,800 ml de disolución de DMT-MM 22,4 mg/ml (agua: etanol = 1:1) a la disolución de hialuronato. El grado de sustitución era del 19,7%.

<Ejemplo 3>

Síntesis de hialuronato de sodio con introducción de aminoetanol-diclofenaco

En 30 ml de agua/30 ml de etanol, se disolvieron 300 mg de hialuronato de sodio que tenía un peso molecular promedio en peso de 80.000, y luego se añadieron de manera secuencial 1,50 ml disolución de de clorhidrato de aminopropanol-diclofenaco 0,0805 mol/l (agua: etanol = 1:1) y 1,50 ml de disolución de DMT-MM 35,9 mg/ml (agua: etanol = 1:1), y se agitó durante la noche. A la disolución de reacción, se le añadieron 4,5 ml de disolución acuosa de hidrogenocarbonato de sodio al 5% y se agitó durante 3,5 horas. Después de neutralizar la disolución de reacción añadiendo ácido acético al 50%, se precipitó la mezcla añadiendo 300 ml de etanol. Se lavó el precipitado de manera secuencial con etanol al 85% dos veces, con etanol dos veces y con dietil éter dos veces y se secó durante la noche a presión reducida a temperatura ambiente para dar una porción de 294,8 mg de un sólido blanco. El grado de sustitución era del 18,7%.

<Ejemplo 4>

Síntesis de hialuronato de sodio con introducción de cinamato de aminopropanol

En 20 ml de agua/20 ml de etanol, se disolvieron 200 mg de hialuronato de sodio que tenía un peso molecular promedio en peso de 80.000, y luego se añadieron de manera secuencial 1,0 ml de disolución de clorhidrato de cinamato de aminopropanol 0,101 mol/l (agua: etanol = 1:1) y 1,0 ml de disolución DMT-MM de 45,0 mg/ml (agua: etanol = 1:1), y se agitó durante la noche. Se precipitó la mezcla añadiendo 200 ml de etanol. Se lavó el precipitado de manera secuencial con etanol al 85% dos veces, con etanol dos veces y con dietil éter una vez y se secó durante la noche a presión reducida a temperatura ambiente para dar una porción de 197,7 mg de un sólido blanco. El grado de sustitución era del 16,3%.

<Ejemplo 5>

Síntesis de hialuronato de sodio con introducción de cinamato de aminopropanol

En 10 ml de agua/10 ml de etanol, se disolvieron 100 mg de hialuronato de sodio que tenía un peso molecular promedio en peso de 800.000, y luego se añadieron de manera secuencial 0,286 ml de disolución de clorhidrato de cinamato de aminopropanol 0,132 mol/l (agua: etanol = 1:1) y 0,286 ml de 59,0 mg/ml DMT-MM disolución (agua: etanol = 1:1), y se agitó durante la noche. A la disolución de reacción, se le añadieron 1,5 ml de disolución acuosa de hidrogenocarbonato de sodio al 5%, y se agitó durante 2 horas. Después de neutralizar la disolución de reacción añadiendo ácido acético al 50%, se precipitó la mezcla añadiendo 100 ml de etanol. Se lavó el precipitado de manera secuencial con etanol al 85% dos veces, con etanol dos veces y con dietil éter una vez y se secó durante la noche a presión reducida a temperatura ambiente para dar una porción de 90,4 mg de un sólido blanco. El grado de sustitución era del 12,3%.

<Ejemplo de referencia 6>

Síntesis de hialuronato de sodio con introducción de *n*-amilamina

En 40 ml de agua/40 ml de etanol, se disolvieron 400 mg de hialuronato de sodio que tenía un peso molecular promedio en peso de 80.000, y luego se añadieron de manera secuencial 1,8 g de disolución (agua: etanol = 1:1) de clorhidrato de *n*-amilamina 0,167 mmol/g (fabricado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) y 3,0 ml de disolución de DMT-MM 45,0 mg/ml (agua: etanol = 1:1), y se agitó durante la noche. Se dividió la disolución de reacción en dos porciones iguales, y se usó una de las dos porciones para el ejemplo 6 y se usó la otra porción para el ejemplo 7. Después de la adición y disolución de 1 g de cloruro de sodio en la primera porción de la disolución de reacción, se precipitó la mezcla añadiendo 200 ml de etanol. Se lavó el precipitado de manera secuencial con etanol al 85% diez

veces, con etanol dos veces y con dietil éter una vez y se secó durante la noche a presión reducida a temperatura ambiente para dar una porción de 188,7 mg de un sólido blanco.

<Ejemplo de referencia 7>

5

Síntesis de hialuronato de sodio con introducción de *n*-amilamina

10 A la otra porción de la disolución de reacción preparada en el ejemplo 6, se le añadieron 3,0 ml de disolución acuosa de hidrogenocarbonato de sodio al 5%, y se agitó durante 3 horas. Después de neutralizar la disolución de reacción añadiendo ácido acético al 50% y la adición y disolución de 1 g de cloruro de sodio a la disolución de reacción, se precipitó la mezcla añadiendo 200 ml de etanol. Se lavó el precipitado de manera secuencial con etanol al 85% diez veces, con etanol dos veces y con dietil éter una vez y se secó durante la noche a presión reducida a temperatura ambiente para dar una porción de 185,5 mg de un sólido blanco. El grado de sustitución medido mediante <sup>1</sup>H-RMN (D<sub>2</sub>O) era del 22%.

15

<Ejemplo de prueba 1>

20 Al hialuronato de sodio con introducción de aminoetanol-diclofenaco preparado en los ejemplos 2 y 3, el hialuronato de sodio con introducción de cinamato de aminopropanol preparado en los ejemplos 4 y 5 y el hialuronato de sodio con introducción de *n*-amilamina preparado en los ejemplos 6 y 7 se les añadió respectivamente agua destilada de modo que la concentración de cada uno de los derivados de ácido hialurónico fuese del 1,0% en los frascos graduados, seguido por agitación a 220 rpm durante la noche a temperatura ambiente. Se sometieron a prueba los hialuronatos de sodio con introducción de aminoetanol-diclofenaco preparados en los ejemplos de referencia 1 y 2 mediante el mismo procedimiento. Se disolvieron de manera homogénea todos los derivados de los ejemplos 2, 3, 4, 5, 6 y 7 y el derivado del ejemplo de referencia 2 en agua destilada y produjeron disoluciones acuosas transparentes y viscosas. El hialuronato de sodio con introducción de aminoetanol-diclofenaco del ejemplo de referencia 1 no se disolvió en agua destilada sino que produjo una suspensión blanca.

25

30 <Ejemplo de prueba 2>

35 Se mezclaron los hialuronatos de sodio con introducción de aminoetanol-diclofenaco preparados en el ejemplo 1 y los ejemplos de referencia 3 y 4 respectivamente con agua destilada de modo que la concentración de cada uno de los derivados fuese del 1,0% (p/v) en los frascos sellados, seguido por agitación a 220 rpm durante la noche a temperatura ambiente. Se inyectó cada una de las disoluciones acuosas (disoluciones de prueba) en la parte trasera de una jeringa (1 ml en volumen: fabricada por TERUMO Corporation) equipada con un filtro poroso (Millex-GV de 0,22 µm de diámetro de poro: fabricado por Millipore Corporation) y se expulsó por presión con un pistón a temperatura ambiente para que pasara a través del filtro poroso.

35

40 Se midió la absorbancia basada en diclofenaco (parte superior del pico) a aproximadamente 280 nm para cada una de las disoluciones de prueba antes y después del paso por el filtro de al menos 0,5 ml. Se expresó el coeficiente de paso por el filtro de cada disolución de prueba mediante la concentración del contenido en diclofenaco en la disolución de prueba antes y después del paso por el filtro que se calculó a partir del cambio en la absorbancia medida.

45

50 Los coeficientes de paso por el filtro de la disolución acuosa del ejemplo 1 y la disolución acuosa del ejemplo de referencia 3 fueron respectivamente del 95,3% y el 96,9%. Concretamente, las dos disoluciones acuosas del ejemplo 1 y el ejemplo de referencia 3 pasaron casi completamente a través del filtro poroso. El coeficiente de paso por el filtro de la disolución acuosa del ejemplo de referencia 4 sólo fue del 11,0%. Este bajo coeficiente de paso por el filtro puede atribuirse al tiempo de agitación más corto y al tratamiento insuficiente resultante después de la adición de la disolución acuosa de hidrogenocarbonato de sodio al 5% en el ejemplo de referencia 4, en comparación con el ejemplo de referencia 3.

50

55 Se sometió a prueba el hialuronato de sodio con introducción de cinamato de aminopropanol preparado en el ejemplo 5 mediante el mismo procedimiento. El coeficiente de paso por el filtro de esta disolución acuosa fue del 81,6%.

55

#### Aplicabilidad industrial

60 El método de producción de la presente invención permite la producción fácil y eficaz de un derivado de un polisacárido que tiene un grupo carboxílico, tal como hialuronato de sodio, y se aplica eficazmente para la producción a escala de tales derivados de polisacárido. Los derivados de polisacárido obtenidos mediante el método de producción de la presente invención tienen significativamente mayor solubilidad en disolventes acuosos, en comparación con derivados de polisacárido obtenidos mediante los métodos de producción de la técnica anterior.

65

## REIVINDICACIONES

1. Método de producción de un derivado de polisacárido que comprende un polisacárido que tiene un grupo carboxilo unido a un compuesto orgánico que tiene un grupo funcional que puede condensarse con el grupo carboxilo, que comprende permitir que reaccione el polisacárido con el compuesto orgánico mediante el uso de cloruro de 4-(4,6-dimetoxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metilmorfolinio, en el que el polisacárido que tiene un grupo carboxilo es un ácido hialurónico que tiene un peso molecular promedio en peso de 100.000 a 5.000.000 en el que el grado de sustitución del compuesto orgánico está en el intervalo del 5 al 20% tal como se determina a través de cálculos basados en la cantidad de ácido hialurónico determinada mediante la reacción de carbazol-ácido sulfúrico y la cantidad del compuesto orgánico tal como se determina mediante espectrofotometría, y en el que el compuesto orgánico es un compuesto obtenido mediante la unión covalente de un compuesto fotorreactivo o un fármaco antiinflamatorio no esteroideo (AINE) a una sustancia espaciadora, en el que la sustancia espaciadora tiene la siguiente fórmula:



en la que n representa un número entero de 2 a 18.

2. Método según la reivindicación 1, en el que n representa un número entero de 2 a 12.
3. Método según la reivindicación 1 o 2, en el que el compuesto fotorreactivo se selecciona de ácido cinámico o derivados de cinamato.
4. Método según la reivindicación 1 o 2, en el que el AINE es un diclofenaco.
5. Método según la reivindicación 3, en el que la sustancia espaciadora es aminopropanol.
6. Método según la reivindicación 4, en el que la sustancia espaciadora es aminoetanol.