

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 595 755**

51 Int. Cl.:

**C08B 37/00** (2006.01)

**A61K 31/728** (2006.01)

**C08G 81/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.08.2013 PCT/CZ2013/000091**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.02.2014 WO14023272**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.08.2013 E 13762380 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.08.2016 EP 2882779**

54 Título: **Derivado de ácido hialurónico, método de preparación del mismo, método de modificación del mismo y utilización del mismo**

30 Prioridad:

**08.08.2012 CZ 20120537**

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

**03.01.2017**

73 Titular/es:

**CONTIPRO A.S. (100.0%)  
Dolni Dobrouc 401  
56102 Dolni Dobrouc, CZ**

72 Inventor/es:

**BUFFA, RADOVAN;  
SEDOVA, PETRA;  
WOLFOVA, LUCIE;  
BASARABOVA, IVANA;  
POSPISIL, ROBERT;  
MORAVCOVA, MARTINA;  
NESPOROVA, KRISTINA y  
VELEBNY, VLADIMIR**

74 Agente/Representante:

**JIMÉNEZ URÍZAR, María**

ES 2 595 755 T3

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

## DESCRIPCIÓN

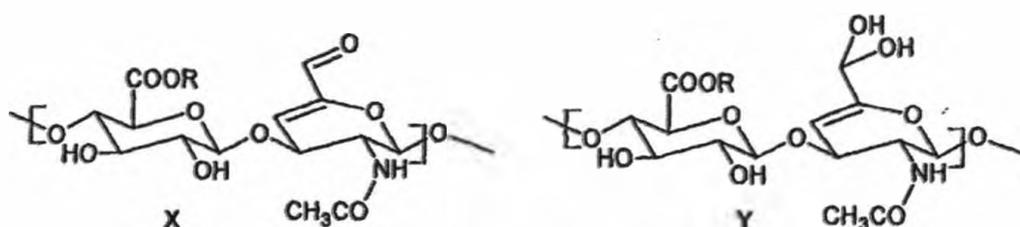
Derivado de ácido hialurónico, método de preparación del mismo, método de modificación del mismo y utilización del mismo

5

**Estado de la técnica**

[0001] La invención se refiere a la preparación y uso de un nuevo derivado de ácido hialurónico que tiene un doble enlace en las posiciones 4 y 5 de la parte de glucosamina del polisacárido y un grupo aldehído en la posición 6 de la parte de glucosamina de la cadena de polisacárido, de acuerdo con la fórmula X, o una forma hidratada del mismo con un diol geminal en la posición 6 de la parte de glucosamina del polisacárido y un doble enlace retenido en las posiciones 4 y 5 de la parte de glucosamina del polisacárido, de acuerdo con la fórmula Y

10



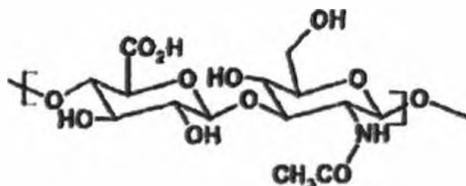
15 en el que R puede ser hidrógeno, cualquier catión metálico o catión orgánico.

[0002] Este derivado insaturado de aldehído de hialuronano es adecuado para la unión de compuestos que contengan un grupo amino, sobre todo en condiciones fisiológicas. En caso de que el compuesto unido contenga dos o más grupos amino, se pueden preparar materiales reticulados.

**Técnica anterior**

20

[0003] El ácido hialurónico es un glicosaminoglicano compuesto de dos unidades de repetición de  $\beta$ - (1,3) de ácido D-glucurónico y  $\beta$ - (1,4) -N-acetil-D-glucosamina.



25

Esquema 1. Ácido hialurónico

[0004] Se caracteriza por un alto peso molecular de  $5 \cdot 10^4$  a  $5 \cdot 10^6$  g.mol<sup>-1</sup>, que depende de la forma de aislamiento del mismo y del material de partida. Este polisacárido muy hidrófilo es soluble en agua en la forma de una sal dentro del intervalo total del pH. Es una parte del tejido conectivo, piel, fluido de articulación sinovial, desempeña un papel importante en un número de procesos biológicos tales como la hidratación, la organización de proteoglicanos, la diferenciación celular, la proliferación y la angiogénesis. Dado que este polímero es natural del cuerpo, y por lo tanto, biodegradable, se convierte en un sustrato adecuado para la ingeniería de tejidos o un portador de sustancias biológicamente activas.

30

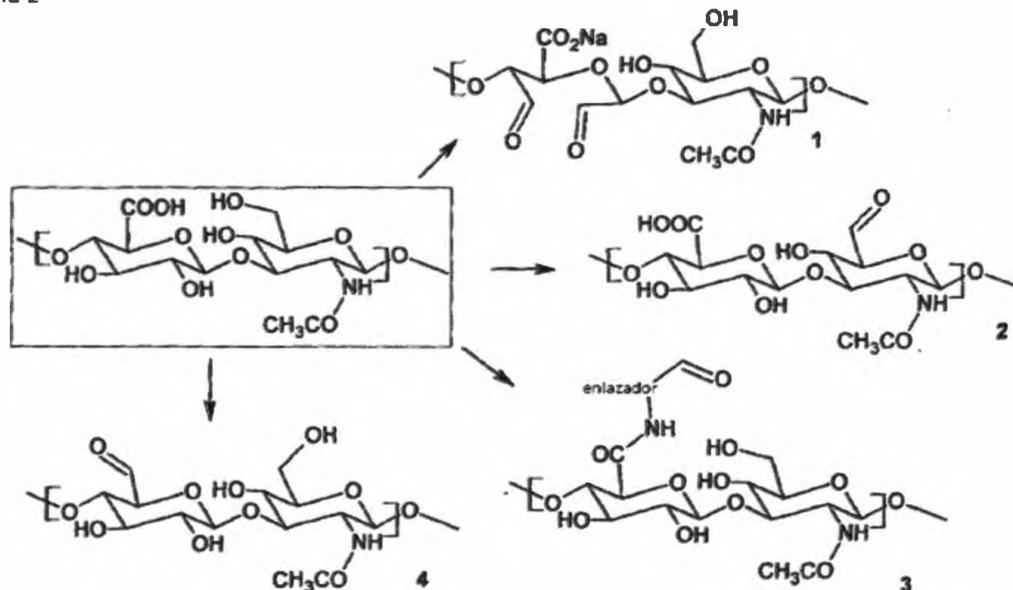
**Modificación de ácido hialurónico a HA-aldehído**

[0005] Muy a menudo, HA-aldehído se prepara mediante una oxidación selectiva del ácido hialurónico nativo. La oxidación de polisacáridos es un proceso en el que se cambia el grado de oxidación de los grupos funcionales del polisacárido. En caso de formación de un aldehído el grado de oxidación aumenta formalmente en un grado. Se forman a menudo también grupos carboxílicos (oxidación en dos grados), que pueden ser un subproducto de la oxidación a un aldehído. En el caso de ácido hialurónico se conocen varios métodos para la preparación de hialuronano con un grupo aldehídico unido al mismo (HA-aldehído). Estos derivados de hialuronano son unos de los precursores más utilizados para la preparación de biomateriales a partir de un hialuronano modificado químicamente. La razón principal es que los grupos aldehídicos son muy estables en condiciones fisiológicas, pero al mismo tiempo son aún suficientemente reactivos para una reacción química rápida y eficaz, por ejemplo, con aminas.

40

Los principales métodos de preparación de HA-aldehdos se muestran en el siguiente esquema 2.

Esquema 2



5 **[0006]** Con mucho, el método mas frecuente de introducción de un grupo aldehídico en hialuronano es la oxidación por medio de  $\text{NaIO}_4$  en agua (Esquema 2, estructura 1) (Spiro Robert et al.: WO 99/01143, Daniel Aeschlimann, Bulpitt Pablo: WO2007/0149441). Esta modificación conduce a la apertura del ciclo de sacárido y formación de dos grupos aldehídicos.

10 **[0007]** Otro metodo es la oxidación del grupo hidroxilo primario en la posición 6 de la parte de glucosamina del polisacárido a un aldehído (Esquema 2, estructura 2) por medio del sistema  $\text{NaClO}$  / TEMPO en agua (Buffa R., Kettou S., Velebn»V. et al. WO 2011/069475) o por medio del periodinano de Dess-Martin en DMSO (Buffa R., Kettou S., Velebn »V. et al. WO 2011/069474). A diferencia de la estructura 1, el grupo aldehído en esta posición mantiene la rigidez de la cadena de polímero.

15 **[0008]** Un método interesante de introducción de un grupo aldehído en hialuronano es la posibilidad de unión de este grupo a través de un enlazador (Esquema 2, estructura 3). Existen varios enfoques posibles aquí, tales como la introducción de un diol vecinal en el grupo carboxilo del hialuronano a través de una amida y la posterior oxidación del diol por medio de  $\text{NaIO}_4$  lo que da lugar a un aldehído unido a través de un enlazador (Hilborn J. et al: WO 2010/138074). Esta estrategia puede ser ventajosa consistiendo en que el grupo aldehído es estéricamente más accesible para modificaciones adicionales opcionales.

25 **[0009]** Otra solicitud de patente (Aeschlimann Daniel y Pablo Bulpitt: WO 2007/0149441) menciona la posibilidad de preparar HA-aldehído por medio de la reducción del grupo carboxilo del hialuronano, utilizando el agente de 9-BBN (9-borabencilo [3,3,1] nonano). El resultado es hialuronano que tiene un grupo aldehído en la posición 6 de la parte glucurónica del polisacárido (Esquema 2, estructura 4).

*Condensación de HA-aldehído con N-nucleófilos*

30 **[0010]** La ventaja principal de la aplicación de la condensación de aldehdos con HA-N-nucleófilos (aminas) es que se puede llevar a cabo en condiciones fisiológicas. Generalmente, esta reacción se describe mediante el siguiente esquema 3:

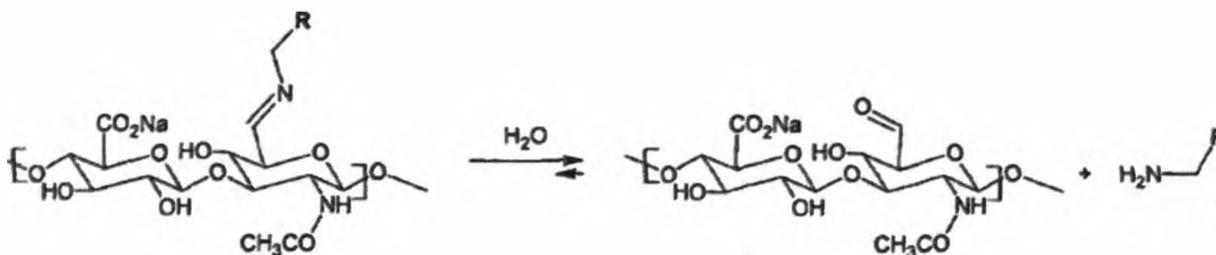
Esquema 3



[0011] La estabilidad hidrolítica del enlace imina resultante  $-CH = N-$  depende en gran medida de la naturaleza del grupo **X**. Siempre que **X** sea un átomo que no porte ningún par de electrones libres, como el grupo  $-CH_2-$ , se forma una imina hidrolíticamente inestable  $HA-CH = N-CH_2-$ . Siempre que **X** sea un átomo que porte un par de electrones libres, se forma un conjugado más estable hidrolíticamente (oxima  $HA-CH = N-O-$ , hidrazona  $HA-CH = N-NH-$ , semicarbazona  $HA-CH = N-NH-Co$  y similares) en el que el enlace imina  $-CH = N-$  se estabiliza mediante la conjugación con el par de electrones libre del átomo **X**. Se conocen muchas patentes que describen la unión de aminas que tienen la fórmula general  $NH_2-X-$ , en la que **X** es nitrógeno u oxígeno, a hialuronano oxidado a un aldehído, y donde los materiales finales se forman en condiciones fisiológicamente aceptables de manera que son aplicables a una amplia gama de aplicaciones de la biomedicina. Los recientes incluyen la patente (Bergman K., et al: WO 2009/108100) donde materiales a base de ácido hialurónico modificados por grupos electrófilos tales como aldehído, maleinimida, acrilato, acrilamida, metacrilato, metacrilamida, vinilsulfona y aziridina se reivindican en general. Grupos hidrazidas, semicarbazidas, tiosemicarbazidas, aminooxi, tiol y  $\beta$ -aminotiol se mencionan como nucleófilos de reticulación. Otra solicitud de patente (Hilborn J. et al: WO 2010/138074) es similar y da a conocer la unión de N, S o al mismo tiempo, nucleófilos N y S directamente a hialuronano oxidado a un aldehído por medio de oxidación con sodio peryodato.

[0012] En caso de que **X** sea un carbono alifático (Esquema 3), se sabe generalmente que las iminas resultantes no son hidrolíticamente estables (el enlace  $-C = N-$  no tiene ningún socio para la conjugación) y se convierten reversiblemente en el aldehído y amina original (Buffa R., Kettou S., Velebn»V. et al. WO 2011/069474). La situación se describe en el Esquema 4.

Esquema 4



[0013] Otra posibilidad de cómo estabilizar dichas iminas es extender la conjugación desde el otro lado, es decir, desde el lado aldehído, lo que significa proporcionar la imina resultante con la conjugación que tiene un enlace  $-C = C-$  múltiple. La reacción general se muestra en el Esquema 5.

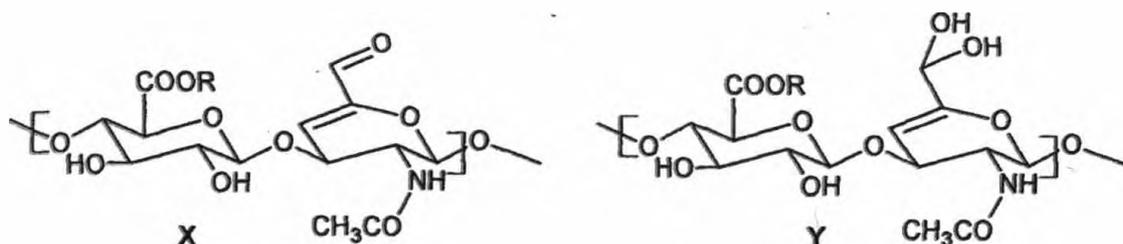
Esquema 5



[0014] Este enfoque se menciona muy raramente en la literatura, por ejemplo, para reacciones de aldehídos aromáticos con aminas, formando las denominadas bases Schiff, donde la estabilidad se soporta por la conjugación con un ciclo aromático  $Ar-CHO + H_2N-R \rightarrow Ar-CH = N-R$ . Sin embargo, en caso de polisacáridos o polímeros en general, ningún ejemplo análogo ha sido encontrado. En tal modificación de polímeros, sería necesario introducir un grupo aromático o, en general, cualquier enlace múltiple conjugado a través de un enlazador en el aldehído, que es una complicación tecnológica y la biocompatibilidad del material no está garantizada. Sin embargo, este método apunta a otra complicación potencial. En caso de presencia de un sistema aromático o más enlaces múltiples conjugados el material puede absorber en la región visible ya, por lo tanto, el compuesto será de color lo que generalmente no es deseable (una posible fotosensibilidad, complicaciones en ensayos analíticos e *in vitro*).

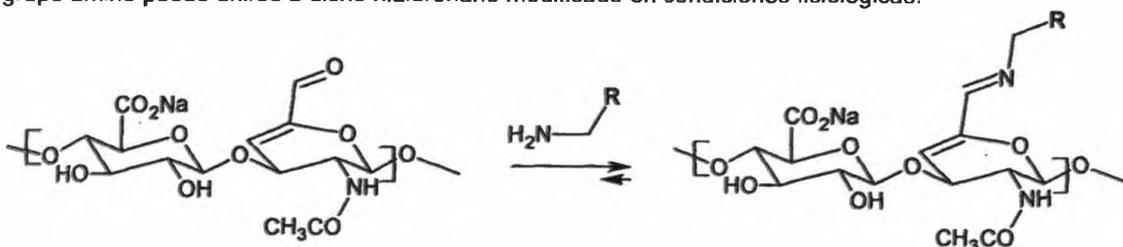
### Resumen de la invención

[0015] El objeto de la invención es ácido hialurónico de la fórmula estructural general **X** o **Y**, que tiene algunos de sus ciclos de glucosamina del polisacárido modificados con un doble enlace en las posiciones 4 y 5 y, al mismo tiempo está presente un grupo aldehídico, o diol geminal (estructura **Y**) en la posición 6 de la parte glucosamina del polisacárido



5 en donde R puede ser hidrógeno, cualquier catión metálico o catión orgánico. Preferiblemente, dicho derivado tiene el peso molecular dentro del intervalo de 1 a 500 kDa. R es un catión de sodio, potasio, calcio o un catión orgánico seleccionado del grupo que comprende tetra alquilamonio C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alquilamina protonizada C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, preferiblemente amonio de tetrabutilo o trietilamina protonizada.

[0016] Esta solución permite la estabilización de los conjugados de ácido hialurónico con compuestos amino por medio de un enlace múltiple desde el lado del aldehído, de modo que prácticamente cualquier compuesto que contenga un grupo amino puede unirse a dicho hialuronano modificado en condiciones fisiológicas.



10 [0017] Esta es una diferencia importante en comparación con los aldehídos saturados de hialuronano que son en condiciones fisiológicas capaces de unir fuertemente los compuestos de la fórmula general H<sub>2</sub>N-X-, en la que X es un átomo que lleva un par libre de electrones, por lo general oxígeno o nitrógeno. Dado que sólo muy pocas sustancias naturales contienen el grupo H<sub>2</sub>N-X-, la solución descrita en esta solicitud de patente trae consigo una gran ventaja no sólo como un portador prospectivo de sustancias biológicamente activas, sino también en la ingeniería de tejidos, donde muy a menudo se utilizan derivados de ácido hialurónico reticulados en condiciones fisiológicas con compuestos amino biológicamente aceptables.

20 [0018] Además, la invención se refiere al método de preparación del derivado de acuerdo con la fórmula estructural X o Y, donde primero el ácido hialurónico se oxida a un HA-aldehído en la posición 6 de la parte de glucosamina (en adelante denominado Paso 1), y, a continuación, HA-aldehído es deshidratado en solución o por un simple calentamiento en ausencia de disolventes, bases u otros aditivos (en lo sucesivo, paso 2). Estos dos pasos se explican en detalle a continuación:

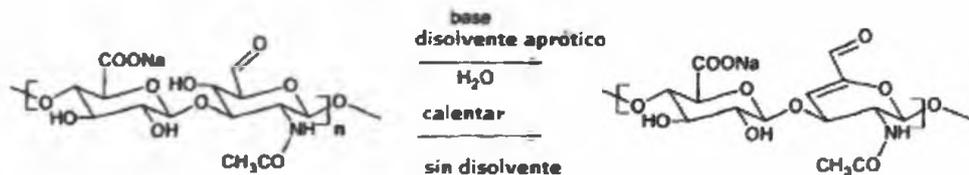
25 Paso 1: Oxidación selectiva del grupo hidroxilo primario del ácido hialurónico en la posición 6 de la parte de glucosamina del polisacárido a un aldehído. La reacción puede llevarse a cabo por medio de, por ejemplo, el sistema de oxidación 2,2,6,6 tetrametil-1-piperidiniloxilo radical R<sup>1</sup>-TEMPO / NaClO en agua, en el que R<sup>1</sup> es hidrógeno o el grupo N-acetilo:



30 Este paso se lleva a cabo preferiblemente en agua a la temperatura de -5 a 10 °C, la cantidad molar de NaClO está dentro del rango de 0,05 a 0,7 eq. y la cantidad molar de R<sup>1</sup>-TEMPO está dentro del intervalo de 0,005 a 0,2 eq. con respecto a un dímero de ácido hialurónico. El ácido hialurónico de partida puede tener el peso molecular dentro del rango de 10 kDa a 5 MDa.

Paso 2:

Variante 1: Deshidratación del HA-aldehído en un disolvente aprótico polar y agua a la temperatura de 30 a 80 °C, preferiblemente a 50 a 60 °C, o Variante 2: El calentamiento del HA-aldehído saturado puro en estado seco a temperatura de 50 a 100 °C, preferiblemente 70 a 80 °C.

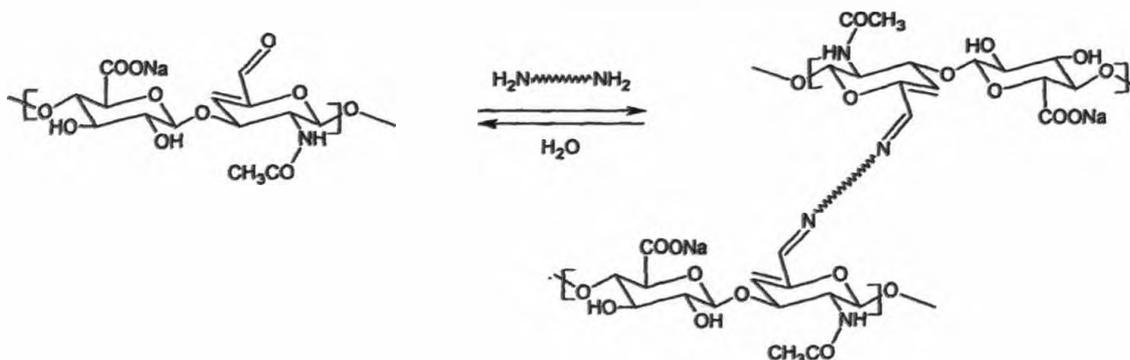


5 La primera variante es deshidratación en un medio acuoso-orgánico, en el que el disolvente orgánico es miscible en agua y la relación en volumen disolvente/agua está dentro del intervalo de 3/1 a 1/2. Preferiblemente, en este paso pueden usarse bases con propiedades nucleófilas limitadas, tales como bases orgánicas, por ejemplo, trietilamina o *N*-diisopropil-*N*-etilamina, o bases inorgánicas, por ejemplo,  $Ca(OH)_2$ . La cantidad de la base en la reacción es de 0,01 - 20 equivalentes con respecto a un dímero de ácido hialurónico, preferiblemente 5 - 10 equivalentes. La base puede soportar la eliminación por inclusión de un protón en posición alfa del aldehído (posición 5 del ciclo) y el carbanión resultante elimina el grupo hidroxilo en la posición 4, formando un enlace múltiple. Como disolventes orgánicos, pueden ser utilizados disolventes polares apróticos miscibles con agua, preferiblemente DMSO o sulfolano. La reacción se lleva a cabo preferiblemente durante 12 a 150 horas.

20 [0019] La segunda variante, tecnológicamente muy atractiva, de realizar el paso 2 es calentar el aldehído saturado de partida en su estado seco en ausencia de cualquier aditivo a una temperatura más elevada, preferiblemente a la temperatura de 70 a 80°C durante 12 horas a 10 días, preferiblemente de 4 a 5 días.

25 [0020] Además, la invención se refiere al uso del HA-aldehído insaturado para la unión de aminas. Más específicamente, la invención se refiere al método de la modificación del derivado de ácido hialurónico según la fórmula X o Y, donde el derivado reacciona con una amina de acuerdo con la fórmula general  $H_2N-R^2$ , donde  $R^2$  es un grupo alquilo, aromático, heteroaromático, de cadena lineal o ramificada  $C_1 - C_{30}$ , opcionalmente conteniendo átomos N, S u O. Dicha amina puede ser, por ejemplo, un aminoácido, péptido o polímero que contiene un grupo amino libre, en el que dicho polímero puede ser, por ejemplo, ácido hialurónico desacetilado, ácido hialurónico con un grupo amino unido a él a través de un enlazador, o gelatina, u otro polímero biológicamente aceptable. La cantidad de amina, aminoácido, péptido o grupos amino libres en el polímero está preferiblemente dentro del intervalo de 0,05 a 2 equivalentes con respecto a un dímero de hialuronano.

35 [0021] No se requieren condiciones específicas para la preparación de dichos conjugados. La reacción puede tener lugar en agua, en tampón fosfato o en el sistema agua-disolvente orgánico a la temperatura dentro de la gama de 20 a 60 °C durante 10 minutos a 150 horas. El disolvente orgánico puede ser seleccionado del grupo que incluye alcoholes miscibles en agua, especialmente isopropanol o etanol, y disolventes apróticos polares miscibles con agua, especialmente sulfóxido de dimetilo, en los que el contenido de agua en la mezcla es al menos 50% vol. La reacción se desarrolla sin problemas en condiciones fisiológicas, tales como en tampón de fosfato a pH = 7,4 y la temperatura de 37°C, con una amplia variedad de aminas, de aminoácidos simples a péptidos complicados. En estas condiciones también es posible unir hidrazinas, hidroxilaminas, hidrazidas, semicarbazidas o tio semicarbazidas sin ningún problema. En caso de unirse compuestos que contienen dos o más grupos amino, es posible preparar derivados reticulados insolubles que tienen una amplia variedad de propiedades viscoelásticas.



**[0022]** La mayor estabilidad del enlace de amina y HA-aldehído insaturado, en comparación con el análogo saturado del mismo, permite la preparación de biomateriales insolubles más estables y mejor reticulados basados en hialuronano. Esta afirmación se describe con mayor detalle en la parte Ejemplos, Ejemplo 21, en el que un derivado saturado y uno insaturado de HA-aldehído que tienen un grado de sustitución y peso molecular similares se comparan en términos de propiedades reológicas finales para la reticulación con ácido hialurónico desacetilado.

**[0023]** En comparación con los análogos mencionados en la parte "Técnica Anterior", el método sugerido de modificación es más ventajoso ya que permite la unión más fuerte de una escala considerablemente más amplia de compuestos que contienen grupos amino a ácido hialurónico en condiciones fisiológicas. Este hecho es una gran ventaja para su aplicación especialmente en la ingeniería de tejidos, donde muchos amino-enlazadores de reticulación biocompatible pueden ser utilizados en condiciones fisiológicas, incluso en presencia de células vivas. Los derivados modificados se pueden utilizar, por ejemplo, para la preparación de materiales e hidrogeles reticulados, para la preparación de materiales para la ingeniería de tejidos o para aplicaciones biomédicas. Para la reticulación, también pueden ser utilizados polisacáridos o grupos amino que contienen polímeros en general. Preferiblemente, dicha invención puede ser también utilizada en el campo de portadores de sustancias biológicamente activas. El método concebido permite la inmovilización de una gama más amplia de aminas biológicamente activas (por ejemplo, péptidos) en hialuronano, que puede entonces ser liberado de forma natural en forma nativa (activa) de los mismos. Se ha descubierto que a un pH más bajo el enlace amina-HA-aldehído insaturado es hidrolíticamente menos estable y por lo tanto los conjugados preparados pueden utilizarse como materiales de sensibilidad al pH también (portadores, geles ...). Se ha demostrado que el HA-aldehído insaturado por sí solo no es citotóxico, y, por lo tanto, los conjugados del mismo son un candidato adecuado para diversas aplicaciones biomédicas. Aunque una persona experta en la técnica podría esperar que la conjugación por la parte de aldehído con el enlace múltiple  $-C=C-$  daría lugar a una mayor toxicidad debido a, por ejemplo, acroleína  $CH_2=CH-CHO$  es una sustancia altamente tóxica e irritativa, no es así. El derivado de acuerdo con la invención tiene un doble enlace dentro de la estructura del polímero (sin enlazador) y el sustrato final no ha mostrado propiedades tóxicas. Los derivados según la fórmula X o Y se pueden usar para la preparación de materiales que tienen un efecto contra el cáncer, como portadores de sustancias biológicamente activas en cosmética y farmacia o como portadores de sustancias biológicamente activas con liberación controlada mediante cambio del valor de pH.

**[0024]** La realización de la solución descrita en esta aplicación no es tecnológicamente complicada y no requiere el uso de costosos productos químicos, disolventes o procedimientos de aislamiento.

#### **Breve descripción de los dibujos**

**[0025]** La figura 1 representa el material elástico preparado según el Ejemplo 20.

#### **Descripción de las realizaciones preferidas**

**[0026]**

$DS = \text{grado de sustitución} = 100\% * (\text{cantidad molar del sustituyente ligado o dímero modificado}) / (\text{cantidad molar de todos los dímeros polisacáridos})$

**[0027]** El término equivalente (eq) como se usa en la presente memoria significa un dímero de ácido hialurónico, si no se indica lo contrario. Los porcentajes son porcentajes en peso, si no se indica lo contrario.

**[0028]** El peso molecular del ácido hialurónico inicial (fuente: CPN spol s r.o., Dolni Dobrouč CZ) es el peso medio y se determinó por medio de la SEC-MALLS.

*Ejemplo 1 Preparación de HA-aldehído oxidado en la posición 6 de la parte de glucosamina. Oxidación de ácido hialurónico*

**[0029]** Solución acuosa de NaClO (0,5 eq) se añadió gradualmente a una solución acuosa al 1 por ciento de ácido hialurónico (1 g, 200 kDa) que contiene NaCl 1%, KBr 1%, TEMPO (0,01 eq) y  $NaHCO_3$  (20 eq.), en atmósfera de nitrógeno. La mezcla se agitó durante 12 horas a la temperatura de  $-5^\circ C$ , luego se añadió 0,1 g de etanol y la mezcla se agitó durante otra 1 hora. Después, la solución resultante se diluyó con agua destilada a 0,2% y se dializó contra la mezcla (0,1% NaCl, 0,1%  $NaHCO_3$ ) 3 veces 5 litros (una vez al día) y contra agua destilada 7 veces 5 litros (dos veces al día). Después de eso, la solución final se evaporó y se analizó.  
DS 10% (determinado por RMN)

$^1H$  NMR ( $D_2O$ )  $\delta$  5.26 (s, 1H, polímero- $CH(OH)_2$ )  
HSQC ( $D_2O$ ) señal cruzada 5.26 ppm( $^1H$ ) - 90ppm( $^{13}C$ ) (polímero- $CH(OH)_2$ )

*Ejemplo 2 Deshidratación de HA-aldehído*

**[0030]** Se añadieron 6,7 ml de DMSO y DIPEA base (5 eq) a una solución de tres por ciento de HA-aldehído (0,1 g, grado de oxidación DS = 10%, Ejemplo 1) en agua. La mezcla se agitó durante 72 horas a la temperatura de 40°C. La solución final se precipitó por medio de la mezcla de isopropanol / hexano y la fracción sólida se secó en vacío.

DS 6% (determinado por RMN), Mw = 110 kDa (determinado por SEC MALLS)

<sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O) δ 9.24 (s, 1H, -CH=O), 6.32 (m, 1H, -CH=C-CH=O)  
UV-Vis (D<sub>2</sub>O) 252nm, π-π\* transición de α, β - aldehído insaturado

#### *Ejemplo 3 Deshidratación de HA-aldehído*

**[0031]** Se añadieron 7,5 ml de DMSO y DIPEA base (5 eq) a una solución de cuatro por ciento de HA-aldehído (0,1 g, grado oxidación DS = 10%, Ejemplo 1) en agua. La mezcla se agitó durante 72 horas a la temperatura de 50°C. La solución final se precipitó por medio de la mezcla de isopropanol / hexano y la fracción sólida se secó en vacío.

DS 5% (determinado por RMN, más detalles en el Ejemplo 2)

#### *Ejemplo 4 Deshidratación de HA-aldehído*

**[0032]** Se añadieron 2,5 ml de DMSO y DIPEA base (5 eq) a una solución de dos por ciento de HA-aldehído (0,1 g, grado oxidación DS = 10%, Ejemplo 1) en agua. La mezcla se agitó durante 72 horas a la temperatura de 50 ° C. La solución final se precipitó por medio de la mezcla de isopropanol / hexano y la fracción sólida se secó en vacío.

DS 2% (determinado por RMN, más detalles en el Ejemplo 2)

#### *Ejemplo 5 Deshidratación de HA-aldehído*

**[0033]** Se añadieron 6,7 ml de sulfolano a una solución de tres por ciento de HA-aldehído (0,1 g, grado de oxidación DS = 10%, Ejemplo 1) en agua. La mezcla se agitó durante 72 horas a la temperatura de 60°C. La solución final era entonces precipitada por medio de la mezcla de isopropanol / hexano y la fracción sólida se secó en vacío.

DS 1% (determinado por RMN, más detalles en el Ejemplo 2)

#### *Ejemplo 6 Deshidratación de HA-aldehído*

**[0034]** Se añadieron 6,7 ml de sulfolano y Et<sub>3</sub>N base (5 eq) a una solución de tres por ciento de HA-aldehído (0,1 g, grado de oxidación DS = 10%, Ejemplo 1) en agua. La mezcla se agitó durante 72 horas a la temperatura de 50°C. La solución final se precipitó por medio de la mezcla de isopropanol / hexano y la fracción sólida se secó en vacío.

DS 5% (determinado por RMN, más detalles en el Ejemplo 2)

#### *Ejemplo 7 Deshidratación de HA-aldehído*

**[0035]** Se añadieron 6,7 ml de sulfolano y DIPEA base (2 eq) a una solución de tres por ciento de HA-aldehído (0,1 g, grado de oxidación, Ejemplo 1) en agua. La mezcla se agitó durante 12 horas a la temperatura de 80°C. A continuación, la solución final se precipita por medio de la mezcla de isopropanol / hexano y la fracción sólida se secó en vacío.

DS 2% (determinado por RMN, más detalles en el Ejemplo 2)

#### *Ejemplo 8 Deshidratación de HA-aldehído*

**[0036]** 6,7 ml de sulfolano y la base de Ca (OH)<sub>2</sub> (1 eq) se añadieron a una solución de tres por ciento de HA-aldehído (0,1 g, grado de oxidación, Ejemplo 1) en agua. La mezcla se agitó durante 150 horas a la temperatura de 30°C. La solución final se precipitó por medio de la mezcla de isopropanol / hexano y la fracción sólida se secó en vacío.

DS 2% (determinado por RMN, más detalles en el Ejemplo 2)

#### *Ejemplo 9 Deshidratación de HA-aldehído*

**[0037]** HA-aldehído (0,1 g, grado de oxidación DS = 10%, Ejemplo 1) se calentó en su estado sólido durante 5 días a 80°C. A continuación, se analizó por medio de RMN.

DS 3% (determinado por RMN, más detalles en el Ejemplo 2)

*Ejemplo 10 Deshidratación de HA-aldehído*

[0038] HA-aldehído (0,1 g, grado de oxidación DS = 10%, Ejemplo 1) se calentó en su estado sólido durante 12 horas a 100°. A continuación, se analizó por medio de RMN.

DS 2% (determinado por RMN, más detalles en el Ejemplo 2)

*Ejemplo 11 Deshidratación de HA-aldehído*

[0039] HA-aldehído (0,1 g, grado de oxidación DS = 10%, Ejemplo 1) se calentó en su estado sólido durante 10 días a 50°C. A continuación, se analizó por medio de RMN.

DS 2% (determinado por RMN, más detalles en el Ejemplo 2)

*Ejemplo 12 Unión de aminas a  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturado HA-aldehído*

[0040] n-butilamina (2 eq) se añadió a una solución del uno por ciento del HA-aldehído insaturado (0,1 g, grado de sustitución DS = 6%, Ejemplo 2) en tampón de fosfato acuoso 0,1 M a pH de 7,4. La mezcla se agitó durante 5 horas a la temperatura de 37°C. A continuación, la solución final se precipitó por medio de la mezcla de isopropanol / hexano y la fracción sólida se secó en vacío.

DS 5% (determinado por RMN)

<sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O)  $\delta$  7.74 (s, 1H, -CH=N-Bu), 5.68 (m, 1H, -CH=C-CH=N-Bu)  
 HSQC (D<sub>2</sub>O) señal cruzada 7.74 ppm(<sup>1</sup>H) - 158ppm(<sup>13</sup>C) -CH=N-Bu señal cruzada 5.68 ppm(<sup>1</sup>H) - 112ppm(<sup>13</sup>C)-CH=C-CH=N-Bu

*Ejemplo 13 Unión de aminas a  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturado HA-aldehído*

[0041] n-butilamina (0,05 eq) se añadió a una solución del uno por ciento de HA-aldehído insaturado (0,1 g, grado de sustitución DS = 6%, Ejemplo 2) en tampón de fosfato acuoso 0,1 M a pH de 7,4. La mezcla se agitó durante 150 horas a la temperatura de 20°C. A continuación, la solución final se precipitó por medio de la mezcla de isopropanol / hexano y la fracción sólida se secó en vacío.

DS 2% (determinado por RMN, más detalles en el Ejemplo 12)

*Ejemplo 14 Unión de aminas a  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturado HA-aldehído*

[0042] n-butilamina (0,3 eq) se añadió a una solución del uno por ciento de HA-aldehído insaturado (0,1 g, grado de sustitución DS = 6%, Ejemplo 2) en agua. La mezcla se agitó durante 10 minutos a la temperatura de 60°C. A continuación, la solución final se precipitó por medio de la mezcla de isopropanol / hexano y la fracción sólida se secó en vacío.

DS 5% (determinado por RMN, más detalles en el Ejemplo 12)

*Ejemplo 15 Unión de lisina a HA-aldehído  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturado*

[0043] Se añadió lisina (0,3 eq) a una solución del uno por ciento de HA-aldehído insaturado (0,1 g, grado de sustitución DS = 6%, Ejemplo 2) en tampón de fosfato acuoso 0,1 M a pH de 7,4. La mezcla se agitó durante 24 horas a temperatura de 20°C. A continuación, la solución final se precipitó por medio de la mezcla de isopropanol / hexano y la fracción sólida se secó en vacío.

DS 5% (determinado por RMN)

<sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O)  $\delta$  7.76 (s, 1H, -CH=N-lisina), 5.65 (m, 1H, -CH=C-CH=N-lisina)

*Ejemplo 16 Unión de pentapéptido pal-KTTKS (palmitoil-Lys-Thr-Thr-Lys-Ser) a  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturado HA-aldehído*

[0044] Se añadieron 5 ml de IPA y después la solución de pentapéptido sustituido pal-KTTKS (0,1 eq) en 5 ml de alcohol isopropílico a una solución del uno por ciento de HA-aldehído insaturado (0,1 g, grado de sustitución DS = 6%, Ejemplo 2) en tampón fosfato 0,1 M acuoso a pH de 7,4. La mezcla se agitó durante 72 horas a la temperatura de 20°C. La solución final se evaporó en un evaporador de vacío rotatorio a un tercio del volumen y luego se precipitó por medio de la mezcla de isopropanol / hexano y la fracción sólida se secó en vacío.

DS 1% (determinado por RMN)

<sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O)  $\delta$  7.75 (s, 1H, -CH=N-peptido), 5.66 (m, 1H, -CH=C-CH=N-peptido)

*Ejemplo 17 Reticulación de HA-aldehído  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturado por lisina*

[0045] Solución de lisina al uno por ciento en agua (0,1 eq) se añadió a una solución al cinco por ciento de HA-aldehído insaturado (0,1 g, grado de sustitución DS = 6%, Ejemplo 2) en tampón de fosfato acuoso 0,1 M a pH de 7,4. La mezcla se agitó durante 24 horas a la temperatura de 20°C. Se observó un aumento de la viscosidad de la solución final.

5 *Ejemplo 18 Reticulación de HA-aldehído  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturado por adipato de dihidrazida*

[0046] Solución de adipato de dihidrazida al uno por ciento en agua (0,1 eq) se añadió a una solución de cinco por ciento de HA-aldehído insaturado (0,015 g, grado de sustitución DS = 6%, Ejemplo 2) en tampón de fosfato acuoso 0,1 M a pH de 7,4. La mezcla se agitó durante 24 horas a la temperatura de 20°C. Se observó un aumento de la viscosidad de la solución final.

10 *Ejemplo 19 Preparación de ácido hialurónico desacetilado*

[0047] Se añadieron 65 ml de sulfolano a una solución de tres por ciento de hialuronano (1 g, 830kDa) en hidrato de hidracina que contiene 30 g de sulfato de hidrazina y la mezcla se calentó durante 48 horas a 70°C. La solución final se diluye por agua destilada a 0,2% y se dializó contra la mezcla (0,1% NaCl, 0,1% NaHCO<sub>3</sub>) 3 veces 5 litros (una vez al día) y contra agua destilada 7 veces 5 litros (dos veces al día). A continuación, la solución final se evaporó y se analizó. DS 32% (determinado por RMN), Mw 37 kDa (determinado por SEC-MALLS)

<sup>1</sup>H NMR (1% NaOD en D<sub>2</sub>O)  $\delta$  2.75 (s, 1H, -CH-NH<sub>2</sub>)

15 *Ejemplo 20 Reticulación de HA-aldehído  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturado por medio de ácido hialurónico desacetilado*

[0048] Una solución de ácido hialurónico desacetilado al tres por ciento (0,015 g, Ejemplo 19) en tampón de fosfato acuoso 0,1 M a pH de 7,4 (0,1 eq) se añadió a una solución al tres por ciento de HA-aldehído insaturado (0,025 g, grado de sustitución DS = 6%, Ejemplo 2) en tampón de fosfato acuoso 0,1 M a pH de 7,4. La mezcla se agitó durante 24 horas a temperatura de 20°C. Se observó un aumento de la viscosidad de la solución final.

20 *Ejemplo 21 Comparación de las propiedades mecánicas y visco-elásticas de hidrogeles basados en el HA-aldehído  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturado reticulado y el HA-aldehído saturado reticulado.*

[0049]

- reticulación por hialuronano desacetilado

**Material 1:** HA-aldehído Insaturado (0,06 g, DS = 6%, Mw = 110 kDa, Ejemplo 2) solución al 3% en PBS pH 7,4 + hialuronano desacetilado (0,02 g, Ejemplo 19) solución al 3% en PBS pH 7,4.

**Material 2:** HA-aldehído saturado (0,06 g, DS = 7%, Mw = 100 kDa) solución al 3% en PBS pH 7,4 + hialuronano desacetilado (0,02 g, Ejemplo 19) solución al 3% en PBS pH 7,4.

[0050] Muestras de hidrogel se prepararon a partir de los materiales anteriores mediante la mezcla y una homogeneización a fondo de ambos componentes de los mismos (solución al 3% de HA- aldehído insaturado en solución PBS / 3% de HA-aldehído saturado y solución de 3% de hialuronano desacetilado en PBS). Las muestras siempre se dejaron madurar durante 240 minutos a temperatura ambiente, a partir de entonces se forma un gel transparente homogéneo. Todas las muestras eran de las mismas proporciones y se midieron a condiciones de laboratorio constantes (temperatura, presión, humedad).

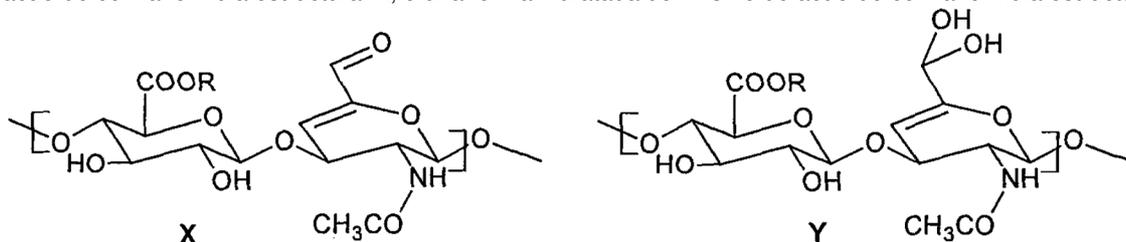
[0051] Se determinaron las propiedades mecánicas de las muestras. Más específicamente, el módulo de Young a Compresión que indica la dureza / elasticidad del material, el Módulo de Tenacidad que indica la resistencia de la muestra y qué energía es capaz de absorber el material sin ocurrir ninguna deformación permanente. Además, la tensión de compresión a rotura que indica la carga máxima que el material es capaz de absorber sin ocurrir ninguna deformación permanente, y, en el marco de las propiedades viscoelásticas, el módulo de almacenamiento en ángulo de pérdida de corte.

Número Material	Módulo Young a Compresión (kPa)	Tensión de Compresión a Rotura (kPa)	Módulo de Tenacidad (J/m <sup>3</sup> )	Módulo de Almacenamiento	Angulo pérdida corte $\delta$ (°)
1	0,844	382,06	29690	160	2,36
2	0,482	309,29	19488	55	10,3

**[0052]** Los resultados obtenidos en este Ejemplo demuestran la ventaja del uso de HA-aldehído insaturado en comparación con el HA-aldehído saturado con respecto a la preparación de materiales más rígidos y más tenaces (mejor reticulados) adecuados para la ingeniería de tejidos.

## Reivindicaciones

- 5 1. Derivado de ácido hialurónico modificado por un doble enlace en las posiciones 4 y 5 de la parte de glucosamina del polisacárido y al mismo tiempo oxidada a un aldehído en la posición 6 de la parte glucosamina del polisacárido, de acuerdo con la fórmula estructural X, o una forma hidratada del mismo de acuerdo con la fórmula estructural Y



en la que R es hidrógeno, cualquier catión metálico o un catión orgánico.

- 10 2. El derivado de ácido hialurónico según la reivindicación 1, **caracterizado porque** tiene el peso molecular en el rango de 1 a  $5 \cdot 10^5$  g.mol<sup>-1</sup> y R es un catión de potasio, calcio, sodio o un catión orgánico que se selecciona del grupo que comprende tetraalquilamonio C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alquilamina C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> protonizada, preferiblemente de tetrabutilamonio o trietilamina protonizada.
- 15 3. Un método de preparación del derivado de ácido hialurónico definido en la reivindicación 1 o 2 **caracterizado porque** el ácido hialurónico oxidado a un aldehído en la posición 6 de la parte de glucosamina está deshidratada en las posiciones 4 y 5 de la parte de glucosamina en la mezcla de agua / disolvente polar aprótico, a la temperatura de 30 a 80°C, preferiblemente a la temperatura de 50 a 60°C.
- 20 4. El método de preparación según la reivindicación 3 **caracterizado porque** la mezcla contiene, además, una base en la cantidad de 0,01 a 20 equivalentes, preferiblemente 5 a 10 equivalentes, con respecto a un dímero de ácido hialurónico, en donde la base se selecciona de entre el grupo que comprende bases orgánicas, por ejemplo, trietilamina o diisopropiletilamina, o bases inorgánicas, por ejemplo, Ca (OH)<sub>2</sub>.
- 25 5. El método de preparación según la reivindicación 3 **caracterizado porque** el disolvente aprótico es miscible en agua e incluye, por ejemplo, DMSO o sulfolano, y la relación de volumen disolvente / agua está dentro del rango de 3/1 a 1/2.
- 30 6. El método de la preparación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, **caracterizado porque** la reacción continúa durante 12 a 150 horas.
- 35 7. Un método de preparación del derivado de ácido hialurónico definido en la reivindicación 1 o 2 **caracterizado porque** el ácido hialurónico oxidado a un aldehído en la posición 6 de la parte de glucosamina se deshidrata en las posiciones 4 y 5 de la parte de glucosamina en fase sólida, sin el uso de disolventes u otros aditivos, por calentamiento a la temperatura de 50 a 100°C, preferiblemente de 70 a 80°C durante 12 horas a 10 días, preferiblemente de 4 a 5 días.
- 40 8. El método de la preparación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 a 7 **caracterizado porque** el ácido hialurónico inicial tiene el peso molecular dentro del intervalo de  $1 \cdot 10^4$  g.mol<sup>-1</sup> a  $5 \cdot 10^6$  g.mol<sup>-1</sup>.
- 45 9. Un método de modificación del derivado de ácido hialurónico que se define en la reivindicación 1 o 2 **caracterizado porque** el derivado reacciona con una amina de la fórmula general H<sub>2</sub>N-R<sup>2</sup> en donde R<sup>2</sup> es un alquilo C<sub>1</sub> - C<sub>30</sub>, aromático, heteroaromático, de cadena lineal o ramificada, que opcionalmente contiene átomos N, S u O.
10. Un método de modificación del derivado de ácido hialurónico según la reivindicación 9 **caracterizado porque** el derivado reacciona con un aminoácido o un péptido.
11. El método de modificación del derivado de ácido hialurónico según la reivindicación 9 **caracterizado porque** el derivado reacciona con un polímero que contiene un grupo amino libre.
- 50 12. El método de modificación del derivado de ácido hialurónico de acuerdo con la reivindicación 11 **caracterizado porque** el polímero es, por ejemplo, ácido hialurónico desacetilado, ácido hialurónico con un grupo amino unido a él a través de un enlazador, o gelatina, u otro polímero biológicamente aceptable.
- 55 13. El método de modificación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12 **caracterizado porque** la cantidad de amina, aminoácido, péptido o grupos amino libres del polímero está dentro del intervalo de 0,05 a 2 equivalentes con respecto a un dímero de ácido hialurónico.

- 5
14. El método de modificación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 13, **caracterizado porque** la reacción con la amina, aminoácido, péptido o polímero que contiene un grupo amino libre se lleva a cabo en agua, en tampón de fosfato o en un sistema disolvente orgánico-agua a la temperatura dentro del intervalo de 20 a 60°C durante 10 minutos a 150 horas.
- 10
15. El método de modificación según la reivindicación 14 **caracterizado porque** el disolvente orgánico se selecciona del grupo que comprende alcoholes miscibles en agua, especialmente isopropanol o etanol, y disolventes apróticos polares miscibles en agua, especialmente sulfóxido de dimetilo, en el que el contenido de agua en la mezcla es al menos 50% en volumen.
- 15
16. Un uso de los derivados definidos en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 para la preparación de materiales que tienen un efecto contra el cáncer.
- 20
17. Un uso de los derivados definidos en cualquiera de las reivindicaciones 1-2 como portadores de sustancias biológicamente activas en cosmética y farmacia o como portadores de sustancias biológicamente activas con liberación controlada mediante el cambio del valor de pH.
18. Un uso de los derivados preparados por el método definido en cualquiera de las reivindicaciones 9 a 17 para la preparación de materiales e hidrogeles reticulados, para la preparación de materiales para la ingeniería de tejidos o para aplicaciones biomédicas.



**Figura 1**