

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 635 087**

51 Int. Cl.:

**C08B 37/08** (2006.01)

**A61K 47/36** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.03.2012 PCT/JP2012/055421**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.09.2012 WO12118189**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.03.2012 E 12752403 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.07.2017 EP 2682409**

54 Título: **Derivado de ácido hialurónico modificado con ácido amino-carboxílico**

30 Prioridad:

**03.03.2011 JP 2011046749**

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

**02.10.2017**

73 Titular/es:

**CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA (100.0%)  
5-1, Ukima 5-chome Kita-ku  
Tokyo 115-8543, JP**

72 Inventor/es:

**YASUGI, TOMOKO;  
TAMPO, YOSHIHIRO;  
YASUGI, KENJI;  
HIRAKURA, TAI y  
SHIMOBOJI, TSUYOSHI**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

ES 2 635 087 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 modificado con ácido amino-carboxílico

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un derivado de ácido hialurónico modificado con alquilamina, o con un compuesto que tiene amino y carboxi (ácido amino-carboxílico), tal como aminoácido, o con un compuesto de amida del mismo (amida de ácido amino-carboxílico), un conjugado entre dicho derivado de ácido hialurónico y un fármaco, así como  
10 una composición farmacéutica que comprende dicho derivado de ácido hialurónico, en particular, un complejo entre dicho derivado de ácido hialurónico y un fármaco.

**Técnica anterior**

15 Los polietilenglicoles (en lo sucesivo también conocidos como "PEG") son compuestos que son inactivos en el cuerpo vivo. Se sabe que la estabilidad y las propiedades farmacocinéticas de las proteínas y los liposomas en el cuerpo vivo se pueden mejorar modificándolos con PEG. Las proteínas modificadas con PEG y los liposomas cuya permanencia en sangre se potencia recubriéndolos con PEG ya han entrado en la fase de comercialización como productos farmacéuticos. Sin embargo, se ha informado de que después de una inyección en bolo a largo plazo de  
20 proteínas PEGiladas en ensayos con animales se produjo acumulación de PEG en el riñón y cavitación renal. En términos concretos, el PEG no es un polímero biodegradable y todavía tiene varios problemas que se deben aclarar, incluyendo su acumulación y seguridad en el cuerpo después de la inyección a largo plazo a los seres humanos. Además, en los últimos años, han aparecido algunos informes sobre el fenómeno que provoca que los conjugados de PEG y los liposomas PEGilados se eliminen de manera inusualmente rápida después de su segunda dosis  
25 (fenómeno de aclaramiento sanguíneo acelerado) en lo sucesivo también conocido como "fenómeno ABC" (documentos no patente 1 y 2); por lo tanto, no se puede decir que se haya establecido completamente la seguridad y la eficacia de los productos farmacéuticos PEGilados.

Entre tanto, existe un polímero que ya se ha usado en situaciones clínicas, ácido hialurónico. El ácido hialurónico (en lo sucesivo también conocido como "HA" es un polisacárido aislado por primera vez del humor vítreo del ojo bovino por K. Meyer en 1934 y desde entonces se sabe que es un componente principal de la matriz extracelular. El HA es un tipo de glucosaminoglucano compuesto por unidades repetidas de disacáridos de ácido D-glucurónico y N-acetilglucosamina unida por enlaces  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) glucosídicos. El HA no tiene ninguna diferencia de especies en su estructura química o física y el sistema metabólico de HA existe incluso en los seres humanos. El ácido hialurónico  
30 es también conocido como un biomaterial muy seguro desde el punto de vista de la inmunidad o la toxicidad.

En los últimos años, el ácido hialurónico ha atraído la atención desde el punto de vista no solo de su seguridad, como se ha mencionado anteriormente, sino también los papeles que desempeña como sustancia fisiológicamente activa en la adhesión celular, el crecimiento celular y la inducción de la migración celular. En cuanto a su producción, se ha conseguido la producción en masa de ácido hialurónico de alto peso molecular usando microorganismos y se ha realizado una investigación intensiva sobre sistemas de administración de fármacos (en lo sucesivo también denominados "DDS") usando ácido hialurónico. Existen otros informes que indican que la conjugación de ácido hialurónico a un fármaco hace posible conseguir el direccionamiento del fármaco a los tejidos cancerosos (documento de patente 1), el direccionamiento del fármaco al hígado (documento de patente 2) y la reducción de la antigenicidad (documento de patente 3).  
45

El inconveniente del ácido hialurónico cuando se utiliza como un sustrato de DDS para el direccionamiento o extensión del tiempo de retención es su poca permanencia en sangre. Se cree que seis sacáridos consecutivos son el sitio del ácido hialurónico que es reconocido por el receptor y se han realizado varios intentos para prolongar el tiempo de retención del HA en la sangre modificando sus grupos carboxi (documentos de patente 4, 5 y 6).  
50

Se ha desarrollado un derivado de ácido hialurónico cuya permanencia en sangre se aumentó modificando considerablemente el carboxi en el resto de ácido glucurónico del ácido hialurónico, estando demostrada su utilidad (documento de patente 7). En general, la permanencia de un derivado de ácido hialurónico en sangre se prolonga aumentando el grado de modificación de carboxi en su resto de ácido glucurónico. Sin embargo, se ha descubierto que ambos factores no se correlacionan linealmente entre sí, pero la correlación cambia dramáticamente una vez que se supera el umbral particular.  
55

Los oligonucleótidos tales como ADN/ARN antisentido y ARNip, que se han estado desarrollando como fármacos de ácido nucleico en los últimos años, están sujetos a degradación por nucleasas dentro y fuera del cuerpo vivo, se degradan rápidamente cuando se inyectan por vía intravenosa (en lo sucesivo denominado también "i.v.") individualmente. Para que los fármacos de ácido nucleico muestren su eficacia es esencial liberar los ácidos nucleicos en el citoplasma o el núcleo. Una mayoría de productos farmacéuticos convencionales que comprenden proteínas o péptidos como ingrediente activo actúan sobre dianas extracelulares. Para desarrollar productos farmacéuticos más innovadores, se necesita un medio para permitir que las proteínas o péptidos actúen sobre dianas intracelulares. Para este propósito, existe la necesidad de desarrollar un proceso para liberar proteínas o  
60  
65

péptidos en el citoplasma, más específicamente un proceso mediante el cual, después de que un medicamento es captado por la célula a través de endocitosis, el ingrediente activo del medicamento se libera eficazmente desde el endosoma en el citoplasma.

5 Los polímeros catiónicos sintéticos hacen posible condensar electrostáticamente el gen cargado negativamente y liberar el gen al citoplasma y, por lo tanto, se han considerado tan eficaces como un portador de genes. Los polímeros catiónicos sintéticos que se han notificado incluyen poli-L-lisina (documento de patente 8, documento no de patente 3), polietilenimina (documento no de patente 4), un polímero sintético que tiene un grupo imidazolilo (documento no de patente 5), y un dendrímero de poliamidoamina (documento no de patente 6). En particular, se ha  
10 demostrado que la polietilenimina que tiene amina secundaria y el polímero sintético que tiene un grupo imidazolilo son captados al citoplasma con alta eficiencia de transferencia debido a su efecto de esponja de protones. Sin embargo, estos polímeros sintéticos son poliaminas que generalmente se cree que tienen una citotoxicidad alta y no se sabe completamente si son seguras. Había otro ejemplo de uso de quitosano, un polímero polisacárido catiónico (documento no de patente 7), pero esta técnica aún no se ha puesto en práctica debido a su baja eficacia de transferencia génica. Todavía se hizo otro informe sobre un intento de transferencia intracitoplásmica de ARNip usando un nanogel que se obtiene modificando carboxi en el ácido hialurónico con un compuesto que tiene un grupo mercapto (tiol) y reticulación ultrasónica del HA modificado (documento no de patente 17).

20 También hubo varios informes sobre transferencia intracitoplasmática de proteínas/péptidos. Los ejemplos incluyen los informes sobre los intentos de transferencia intracitoplasmática a través de la modificación de un péptido con un péptido penetrante de células (cpp) (documento no de patente 8) o a través de la formación de un complejo proteína/péptido que comprende un liposoma catiónico como un portador (documento no de patente 9), pero las eficiencias de transferencia de estas técnicas no fueron necesariamente altas.

25 Además, con el fin de reducir la citotoxicidad, se intentaron diversos enfoques, incluyendo la PEGilación de una poliamina o modificación de HA con una poliamina (documento no de patente 10) y modificación de una poliamina con un grupo funcional que se separa de una forma sensible al pH (por ejemplo, a pH bajo). Sin embargo, las poliaminas se utilizan de forma inherente incluso en estos enfoques, por lo que se necesitan trabajos y estudios adicionales sobre la toxicidad de estos componentes (documento no de patente 11).

30 También se han estudiado polímeros de ácido policarboxílico débilmente aniónicos. Dichos polímeros presentan solubilidad en agua en condiciones fisiológicas (pH 7,4) pero muestran hidrofobicidad en un intervalo débilmente ácido (pH 5-6,8) que corresponde al pH en el endosoma, y, por tanto, rompen la membrana endosómica, permitiendo de este modo la liberación de un gen/fármaco desde el endosoma hacia el citoplasma. Dichos polímeros aniónicos conocidos incluyen poli (ácido etilacrílico) (documento no de patente 12) y poli(ácido propil acrílico) (documento no de patente 13) y se demostró que un polímero de ácido policarboxílico que tiene un pKa de aproximadamente 5 es menos citotóxico y eficaz para la liberación de un ácido nucleico del endosoma. Otros informes indicaron que el poliglicidol succinilado (documento no de patente 14) y pseudo-péptidos preparados mediante la modificación de las cadenas laterales de poli (L-lisina iso-ftalamida) con L-fenilalanina (documento no de  
40 patente 15) son eficaces como polímeros aniónicos sensibles al pH en la liberación de genes/fármacos desde el endosoma, más específicamente captación de fármacos endocitados en el citoplasma.

Ejemplos de las modificaciones de carboxi en ácido hialurónico con aminoácidos incluyen modificación con un éster etílico de glicina usando, como agente de condensación, 4-(4,6-dimetoxi-1,3,5-triazina)-4-metilmorfolinio (en lo sucesivo también conocido como DMT-MM) formado con 2-cloro-4,6-dimetoxi-1,3,5-triazina en presencia de N-metilmorfolina, pero el grado de esta modificación fue del 20 % como máximo (documento no de patente 16). Ejemplos de las modificaciones usando compuestos de triazina como agente de condensación, que se publicaron en los documentos divulgados después de la fecha de prioridad de la presente solicitud, incluyen ácido hialurónico introducido en alanina (documento no de patente 18); y también se han notificado las modificaciones con otros aminoácidos mediante los mismos procedimientos (documento no de patente 19, documento de patente 10). Se produjo aún otro informe que indicaba que el ácido hialurónico estaba modificado con clorhidrato de éster metílico de leucina, clorhidrato de éster metílico de valina, clorhidrato de éster metílico de isoleucina, clorhidrato de éster metílico de prolina, clorhidrato de éster metílico de fenilalanina, clorhidrato de éster metílico de arginina, o clorhidrato de éster metílico de histidina usando clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (en lo sucesivo también conocido como EDC) como agente de condensación, y el producto resultante se gelificó sin desproteger, de modo que se preparó una película biocompatible insoluble en agua, pero el grado de esta modificación era desconocido (documento de patente 9).

60 En cuanto a la modificación del ácido hialurónico mediante la amidación de grupos carboxilo en ácido hialurónico con una amina alifática o una amina arilalifática, se publicaron ejemplos donde se introdujeron bencilamina, octilamina, dodecilamina, y hexadecilamida usando 1,1-carbonildiimidazol en rendimientos del 60 %, 25 %, 15 % y 5 %, respectivamente, pero los grados de estas modificaciones fueron del 60 % como máximo (documento no de patente 11).

LISTA DE CITAS

DOCUMENTOS DE PATENTE

- 5 Documento de patente 1: publicación de patente internacional n.º WO 92/06714  
 Documento de patente 2: Publicación de la solicitud de patente japonesa sin examinar número JP 2001-81103  
 Documento de patente 3: Publicación de la solicitud de patente japonesa sin examinar número JP H02-273176  
 Documento de patente 4: Publicación de la solicitud de patente japonesa sin examinar número JP H05-85942  
 Documento de patente 5: publicación de patente internacional n.º WO 01/05434  
 10 Documento de patente 6: publicación de patente internacional n.º WO 01/60412  
 Documento de patente 7: publicación de patente internacional n.º WO 2006/028110  
 Documento de patente 8: publicación de patente internacional n.º WO 1999/029839  
 Documento de patente 9: publicación de patente internacional n.º WO 92/20349  
 Documento de patente 10: publicación de patente internacional n.º WO 2011/148116  
 15 Documento de patente 11: publicación de patente internacional n.º WO 2000/01733

DOCUMENTOS NO DE PATENTE

- documento no de patente 1: Int. J. Pharm., Vol. 255, p. 167-174, 2003  
 20 Documento no de patente 2: J. Control. Rel., Vol. 88, p. 35-42, 2003  
 Documento no de patente 3: J. Biol. Chem., Vol. 262, p. 4429-4432, 1987  
 Documento no de patente 4: J. Control. Rel., Vol. 60, p. 149-160, 1999  
 Documento no de patente 5: Bioconjugate Chem., Vol. 10, p. 406-411, 1999  
 Documento no de patente 6: Bioconjugate Chem., Vol. 4, p. 372-379, 1993  
 25 Documento no de patente 7: J. Control. Rel., Vol. 56, p. 259-272, 1998  
 Documento no de patente 8: J. Biol. Chem., Vol. 272, p. 16010-16017, 1997  
 Documento no de patente 9: J. Biol. Chem., Vol. 276, p. 35103-35110, 2001  
 Documento no de patente 10: Biopolymers, Vol. 89, p. 635-642, 2008  
 Documento no de patente 11: Bioconjugate Chem., Vol. 14, p. 51-57, 2003  
 30 Documento no de patente 12: Acc. Chem. Res., Vol. 25, p. 336-342, 1992  
 Documento no de patente 13: J. Control. Rel., Vol. 61, p. 137-143, 1999  
 Documento no de patente 14: Bioconjugate Chem., Vol. 19, p. 1040-1048, 2008  
 Documento no de patente 15: Biomaterials, Vol. 30, p. 1954-1961, 2009  
 Documento no de patente 16: Biomacromolecules, Vol. 8, p. 2190-2195, 2007  
 35 Documento no de patente 17: J. Control. Rel., Vol. 119, p. 245-252, 2007  
 Documento no de patente 18: CARBOHYDRATE Polymers, Vol. 86, p. 747-752, 2011  
 Documento no de patente 19: CARBOHYDRATE Polymers, Vol. 87, p. 2211-2216, 2012

**Sumario de la invención**

40 PROBLEMA TÉCNICO

Se ha encontrado que la permanencia en sangre de un derivado de ácido hialurónico se correlaciona con el grado de modificación de carboxi en su resto de ácido glucurónico y también que la correlación cambia dramáticamente una vez que se excede el umbral particular; Por lo que es difícil controlar la permanencia en sangre de un derivado de ácido hialurónico dentro de un intervalo deseable simplemente controlando el grado de modificación del carboxi. Por consiguiente, ha existido la necesidad de un proceso para controlar la permanencia en sangre de una manera más simple y más fiable. También se supone que a medida que el ácido hialurónico se vuelve menos reconocible por un receptor, es menos susceptible al metabolismo en el cuerpo vivo y su biodegradabilidad intrínseca es más difícil de exhibir. Por lo tanto, se ha necesitado un nuevo sustrato que se caracteriza tanto por su biodegradabilidad (seguridad) como por su permanencia en la sangre.

Aunque se han publicado diversos materiales que pueden utilizarse para la administración de un ingrediente activo médico endocitado en el citoplasma, también se ha necesitado un proceso para administrar un ingrediente activo de manera más eficaz y/o más segura.

Un problema que debe resolver la presente invención es proporcionar un derivado de ácido hialurónico caracterizado tanto por biodegradabilidad como por permanencia en sangre y/o un derivado de ácido hialurónico que puede administrar un gen o un fármaco en el citoplasma. Otro problema que se debe resolver mediante la presente invención es proporcionar un conjugado entre el derivado de ácido hialurónico y un fármaco y una composición farmacéutica que comprende el derivado de ácido hialurónico, en particular, un complejo entre el derivado de ácido hialurónico y el fármaco.

SOLUCIÓN AL PROBLEMA

65 Los presentes inventores tienen estudios intensivos para resolver los problemas citados anteriormente y, como

resultado, han descubierto que un derivado de ácido hialurónico, que se obtiene amidando el carboxi en el resto ácido glucurónico del ácido hialurónico o una sal del mismo a través de su reacción con una alquilamina particular, un ácido amino-carboxílico concreto o una amida de ácido amino-carboxílico concreta, se caracteriza por la biodegradabilidad y la permanencia en la sangre. Por lo tanto, los inventores han completado la presente invención.

5 Los inventores han descubierto también que un derivado de ácido hialurónico modificado con un ácido amino-carboxílico particular es eficaz para la liberación de un gen/fármaco desde el endosoma al citoplasma y, por lo tanto, los inventores han completado la invención.

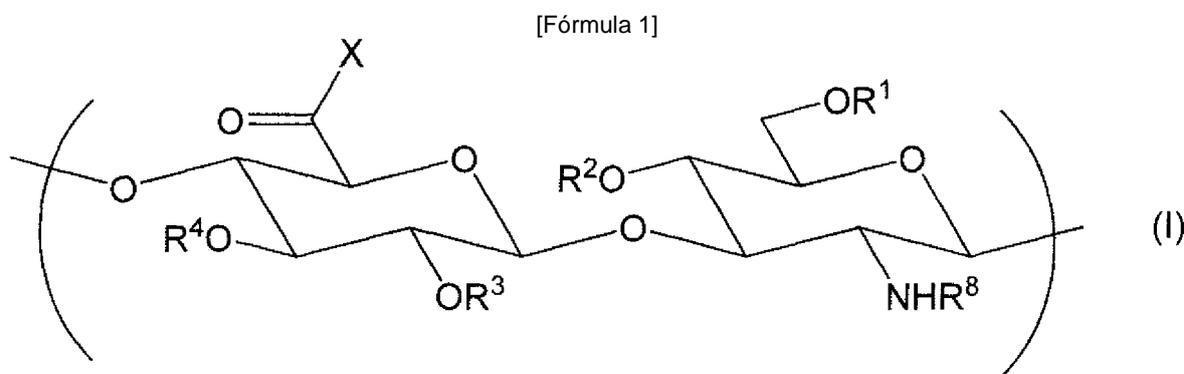
Más específicamente, la presente invención se refiere a un derivado de ácido hialurónico caracterizado tanto por biodegradabilidad como por permanencia en sangre, y a un derivado de ácido hialurónico que hace posible prevenir la degradación de un compuesto que tiene actividad farmacológica, en particular un fármaco de ácido nucleico, dentro del cuerpo vivo y liberar el compuesto en el citoplasma. Además, la presente invención se refiere a un proceso para preparar el derivado de ácido hialurónico, así como a una composición farmacéutica que comprende un fármaco y el derivado de ácido hialurónico, y a un proceso para preparar dicha composición.

15

Se proporcionan derivados de ácido hialurónicos como se citan más adelante en (1) a (17).

(1) Un derivado de ácido hialurónico que comprende unidades de disacárido representadas cada una de ellas por la Fórmula (I):

20



[donde

25

$R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ , y  $R^4$  se seleccionan cada uno independientemente de entre un átomo de hidrógeno, alquilo  $C_{1-6}$ , formilo y alquilcarbonilo  $C_{1-6}$ ;

$R^8$  es un átomo de hidrógeno, formilo o alquilcarbonilo  $C_{1-6}$ ;

X es un grupo representado por  $-NR^x-A-B-Z$ ;

30

A se selecciona de entre  $-CR^aR^b-$  y cicloalquileo  $C_{3-8}$ , B es un enlace directo y Z es  $-COOR^y$  o  $-CONR^{ya}R^{yb}$ ; o  $-A-B-Z$  representa alquilo  $C_{1-6}$ ; o

A es  $-CH_2-$  o  $-CH_2-CH_2-$ , B se selecciona de entre fenileno (donde el fenileno puede estar sustituido por uno o más grupos seleccionados de entre los átomos de hidroxilo y de halógeno), cicloalquileo  $C_{3-8}$  y fenilmetano-1,1-diilo, y Z es  $-COOR^y$ ;

35

$R^x$  y  $R^y$  se seleccionan cada uno independientemente de entre un átomo de hidrógeno y alquilo  $C_{1-6}$ ;

$R^a$  se selecciona de entre un átomo de hidrógeno y alquilo  $C_{1-6}$ ;

$R^b$  se selecciona de entre un átomo de hidrógeno, alquilo  $C_{1-6}$  (donde el alquilo  $C_{1-6}$  puede estar sustituido por uno o más grupos seleccionados de entre hidroxilo, carboxilo, cicloalquilo  $C_{3-8}$ , arilo y carbamoilo, donde el arilo puede estar sustituido con hidroxilo), cicloalquilo  $C_{3-8}$ , y arilo (donde el arilo puede estar sustituido por hidroxilo);

40

$R^{ya}$  y  $R^{yb}$  se selecciona cada uno independientemente de entre un átomo de hidrógeno, alquilo  $C_{1-6}$ , formilo y alquilcarbonilo  $C_{1-6}$ ], donde, cuando A en la Fórmula (I) es  $-CR^aR^b-$  o cicloalquileo  $C_{3-8}$ , la proporción de las unidades de disacárido de Fórmula (I) con respecto a las unidades de disacárido presentes es al menos 70 %.

45

(2) El derivado de ácido hialurónico como se cita en (1), donde X es  $-NHCH_3$ ,  $-NH(CH_2)_2CH_3$ , o  $-NR^x-A-Z$ ; y A es  $-CR^aR^b-$  o cicloalquileo  $C_{3-8}$ .

(3) El derivado de ácido hialurónico como se cita en (1), donde

50

A es cicloalquileo  $C_{3-8}$ , y B es un enlace directo;

A es  $-CH_2-$  o  $-CH_2-CH_2-$ , y B se selecciona de entre fenileno (donde el fenileno puede estar sustituido por uno o más grupos seleccionados de entre los átomos de hidroxilo y de halógeno), cicloalquileo  $C_{3-8}$  y fenilmetano-1,1-diilo; o A se selecciona de entre 2-ciclohexilmetano-1,1-diilo, 2-(2-naftil)etano-1,1-diilo, 3-fenilpropano-1,1-diilo, ciclohexilmetano-1,1-diilo y

4-hidroxifenilmetano-1,1-diilo y B es un enlace directo.

(4) El derivado de ácido hialurónico como se cita en (1) o (3), donde

A es  $-\text{CH}_2-$ , y B se selecciona de entre ciclohexano-1,1-diílo, benceno-1,4-diílo, benceno-1,3-diílo, 2-clorobenceno-1,4-diílo y fenilmetano-1,1-diílo;

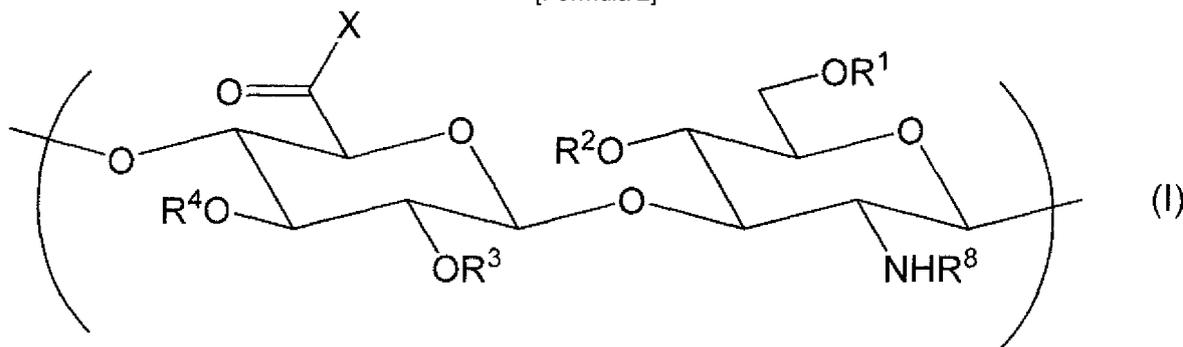
5 A es  $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ , y B es benceno-1,4-diílo; o

A se selecciona de entre 2-ciclohexiletano-1,1-diílo, 2-(2-naftil)etano-1,1-diílo y 3-fenilpropano-1,1-diílo; y B es un enlace directo.

(5) El derivado de ácido hialurónico como se cita en uno cualquiera de (1) a (4), donde Z es  $-\text{COOR}^y$ .

10 (6) Un derivado de ácido hialurónico que comprende unidades de disacárido representadas por la Fórmula (I):

[Fórmula 2]



15 [donde

$R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$  y  $R^4$  se seleccionan cada uno independientemente de entre un átomo de hidrógeno, alquilo  $\text{C}_{1-6}$ , formilo y alquilcarbonilo  $\text{C}_{1-6}$ ;

$R^8$  es un átomo de hidrógeno, formilo o alquilcarbonilo  $\text{C}_{1-6}$ ;

20 X es un grupo representado por  $-\text{NHCH}_3$ ,  $-\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$ ,  $-\text{NR}^x-\text{A}-\text{B}-\text{COOR}^y$  o  $-\text{NR}^x-\text{CHR}^c-\text{CONR}^{ya}\text{R}^{yb}$ ;

$R^x$  y  $R^y$  se seleccionan cada uno independientemente de entre un átomo de hidrógeno y alquilo  $\text{C}_{1-6}$ ;

A se selecciona de entre  $-\text{CR}^a\text{R}^b$ , cicloalquileo  $\text{C}_{3-8}$ , 2-ciclohexiletano-1,1-diílo, 2-(2-naftil)etano-1,1-diílo, 3-fenilpropano-1,1-diílo, ciclohexilmetano-1,1-diílo y 4-hidroxifenilmetano-1,1-diílo, y B es un enlace directo; o

25 A es  $-\text{CH}_2-$  o  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ , y B se selecciona de entre fenileno (donde el fenileno puede estar sustituido por uno o más grupos seleccionados de entre los átomos de hidroxilo y de halógeno), cicloalquileo  $\text{C}_{3-8}$  y fenilmetano-1,1-diílo;

$R^a$  se selecciona de entre un átomo de hidrógeno y alquilo  $\text{C}_{1-6}$ ;

$R^b$  se selecciona de entre un átomo de hidrógeno y alquilo  $\text{C}_{1-6}$  (donde el alquilo  $\text{C}_{1-6}$  puede estar sustituido por uno o más grupos seleccionados de entre hidroxilo, carboxi y carbamoilo);

30  $R^c$  representa alquilo  $\text{C}_{1-6}$  que puede estar sustituido por carbamoilo;

$R^{ya}$  y  $R^{yb}$  se seleccionan cada uno independientemente de entre un átomo de hidrógeno, alquilo  $\text{C}_{1-6}$ , formilo y alquilcarbonilo  $\text{C}_{1-6}$ ] donde, cuando A en la Fórmula (I) es  $-\text{CR}^a\text{R}^b$  o cicloalquileo  $\text{C}_{3-8}$ , la proporción de las unidades de disacárido de Fórmula (I) con respecto a las unidades de disacárido presentes es al menos 70 %.

35 (7) El derivado de ácido hialurónico como se cita en (6), donde X es  $-\text{NHCH}_3$ ,  $-\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$  o  $-\text{NR}^x-\text{CHR}^c-\text{CONR}^{ya}\text{R}^{yb}$ , o A es  $-\text{CR}^a\text{R}^b$  o cicloalquileo  $\text{C}_{3-8}$ .

(8) El derivado de ácido hialurónico como se cita en (6), donde

40 A es cicloalquileo  $\text{C}_{3-8}$ , y B es un enlace directo;

A es  $-\text{CH}_2-$  o  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ , y B se selecciona de entre fenileno (donde el fenileno puede estar sustituido por uno o más grupos seleccionados de entre los átomos de hidroxilo y de halógeno), cicloalquileo  $\text{C}_{3-8}$  y fenilmetano-1,1-diílo; o A se selecciona de entre 2-ciclohexiletano-1,1-diílo, 2-(2-naftil)etano-1,1-diílo, 3-fenilpropano-1,1-diílo,

45 ciclohexilmetano-1,1-diílo y

4-hidroxifenilmetano-1,1-diílo y B es un enlace directo.

(9) El derivado de ácido hialurónico como se cita en (6) o (8), donde

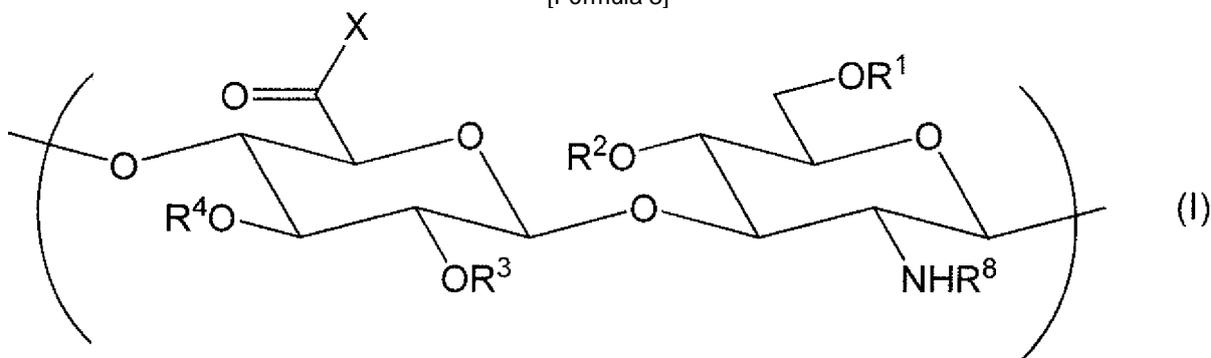
50 A es  $-\text{CH}_2-$ , y B se selecciona de entre ciclohexano-1,1-diílo, benceno-1,4-diílo, benceno-1,3-diílo, 2-clorobenceno-1,4-diílo y fenilmetano-1,1-diílo;

A es  $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ , y B es benceno-1,4-diílo; o

A se selecciona de entre 2-ciclohexiletano-1,1-diílo, 2-(2-naftil)etano-1,1-diílo y 3-fenilpropano-1,1-diílo; y B es un enlace directo.

(10) Un derivado de ácido hialurónico que comprende unidades de disacárido representadas por la Fórmula (I):

[Fórmula 3]



5

[donde

R<sup>1</sup> R<sup>2</sup> R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup> se seleccionan cada uno independientemente de entre un átomo de hidrógeno, alquilo C<sub>1-6</sub>, formilo y alquilcarbonilo C<sub>1-6</sub>;

10 R<sup>8</sup> es un átomo de hidrógeno, formilo o alquilcarbonilo C<sub>1-6</sub>;

X es un grupo representado por -NR<sup>x</sup>-A-B-COOR<sup>y</sup>;

R<sup>x</sup> y R<sup>y</sup> se seleccionan cada uno independientemente de entre un átomo de hidrógeno y alquilo C<sub>1-6</sub>;

A se selecciona de entre -CR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>-, cicloalquileo C<sub>3-8</sub>, 2-ciclohexiletano-1,1-diílo, 2-(2-naftil)etano-1,1-diílo, y 3-fenilpropano-1,1-diílo, y B es un enlace directo; o

15 A es -CH<sub>2</sub>-, y B se selecciona de entre fenileno y cicloalquileo C<sub>3-8</sub>;

R<sup>a</sup> se selecciona de entre un átomo de hidrógeno y alquilo C<sub>1-6</sub>;

R<sup>b</sup> se selecciona de entre un átomo de hidrógeno y alquilo C<sub>1-6</sub> (donde el alquilo C<sub>1-6</sub> puede estar sustituido por uno o más grupos seleccionados de entre hidroxilo y carboxi,]

20 donde, cuando A en la Fórmula (I) es -CR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>- o cicloalquileo C<sub>3-8</sub>, la proporción de las unidades de disacárido de Fórmula (I) con respecto a las unidades de disacárido presentes es al menos 70 %.

(11) El derivado de ácido hialurónico como se cita en (10), donde A es -CR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>- o cicloalquileo C<sub>3-8</sub>

(12) El derivado de ácido hialurónico como se cita en (10), donde

25 A es cicloalquileo C<sub>3-8</sub>, y B es un enlace directo;

A es -CH<sub>2</sub>-, y B se selecciona de entre fenileno y cicloalquileo C<sub>3-8</sub>; o

A se selecciona de entre 2-ciclohexiletano-1,1-diílo, 2-(2-naftil)etano-1,1-diílo y 3-fenilpropano-1,1-diílo, y B es un enlace directo.

30 (13) El derivado de ácido hialurónico como se cita en (10) o (12), donde

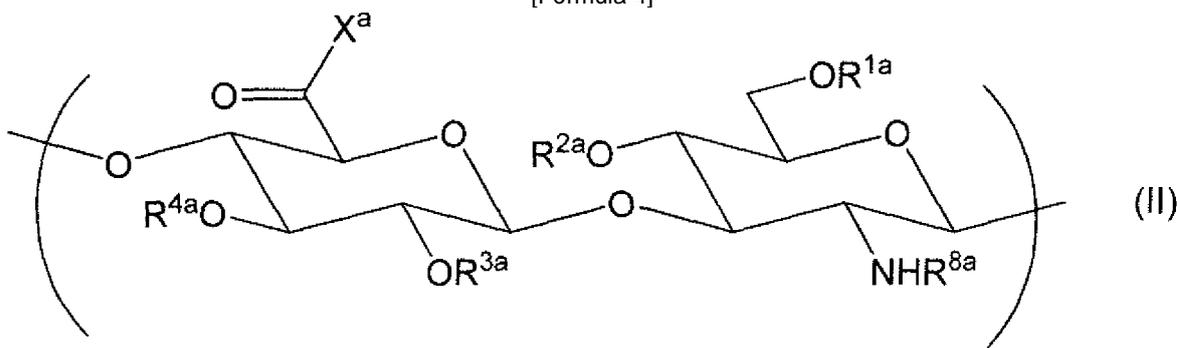
A es -CH<sub>2</sub>- y B se selecciona de entre ciclohexano-1,1-diílo y benceno-1,4-diílo; o

A se selecciona de entre 2-ciclohexiletano-1,1-diílo, 2-(2-naftil)etano-1,1-diílo y 3-fenilpropano-1,1-diílo, y B es un enlace directo.

35

(14) El derivado de ácido hialurónico como se cita en uno cualquiera de (1) a (13), que además comprende unidades de disacárido representadas por la fórmula (II):

[Fórmula 4]



40

[donde

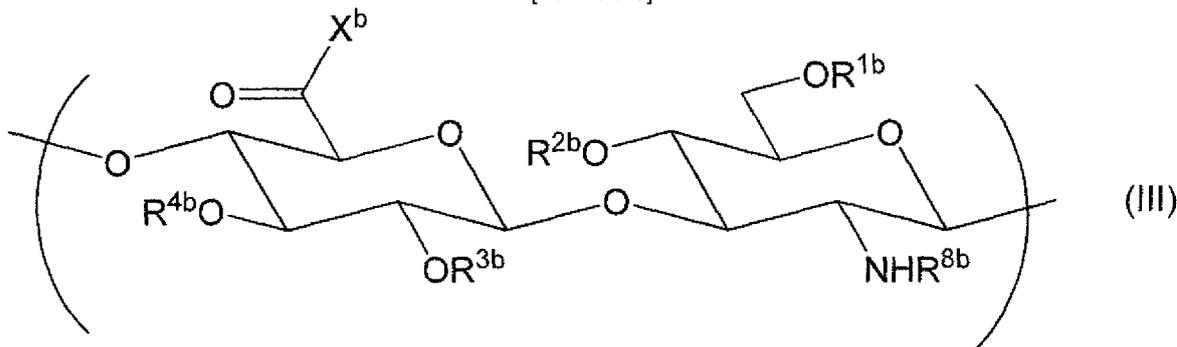
$R^{1a}$ ,  $R^{2a}$ ,  $R^{3a}$ , y  $R^{4a}$  se seleccionan cada uno independientemente de entre un átomo de hidrógeno, alquilo  $C_{1-6}$ , formilo y alquilcarbonilo  $C_{1-6}$ ;

$R^{8a}$  es un átomo de hidrógeno, formilo o alquilcarbonilo  $C_{1-6}$ ;

$X^a$  se selecciona de entre hidroxi y  $-O^+Q^+$ , donde  $Q^+$  representa a contracción].

(15) El derivado de ácido hialurónico como se cita en uno cualquiera de (1) a (14), que además comprende unidades de disacárido representadas por la fórmula (III):

[Fórmula 5]



[donde

$R^{1b}$ ,  $R^{2b}$ ,  $R^{3b}$ , y  $R^{4b}$  se seleccionan cada uno independientemente de entre un átomo de hidrógeno, alquilo  $C_{1-6}$ , formilo y alquilcarbonilo  $C_{1-6}$ ;

$R^{8b}$  es un átomo de hidrógeno, formilo o alquilcarbonilo  $C_{1-6}$ ;

$X^b$  es un grupo representado por  $-NR^e-Y^b-R^d$ ; donde

$R^e$  es un átomo de hidrógeno o alquilo  $C_{1-6}$ ;

$R^d$  es un átomo de hidrógeno, alquilo  $C_{1-6}$ ,  $-\text{CO}-\text{C}(R^7)=\text{CH}_2$ , o  $-\text{CO}-\text{G}^4-\text{X}^c$ ;

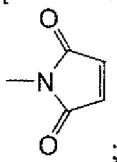
$R^7$  es un átomo de hidrógeno o metilo;

$G^4$  se selecciona de entre fenileno, cicloalquileo  $C_{3-8}$  y  $-\text{G}^5-(\text{alquileo } C_{1-10})-\text{G}^6$ , donde el resto de alquileo  $C_{1-10}$  puede tener de uno a tres fenilenos o cicloalquilenos  $C_{3-8}$  insertados en e mismo;

$G^5$  y  $G^6$  se seleccionan cada uno independientemente de entre un enlace directo, fenileno y cicloalquileo  $C_{3-8}$ ;

$X^c$  es mercapto, un átomo de halógeno o un grupo representado por

[Fórmula 6]



$Y^b$  es  $-\text{CH}_2-(\text{CHR}^5)_{1-2}-\text{CH}_2-\text{NH}-$ ,  $-\text{CH}_2-(\text{CHR}^6)_{p-2}-\text{CH}_2-\text{O}-$ ,  $-(\text{CH}_2)_j-\text{S}-$ , o  $-(\text{CH}_2)_a-(Y^1-(\text{CH}_2)_b)_c-\text{G}-$ ;

1, p y j son cada uno independientemente un número entero seleccionado de entre 2 y 10, y  $R^5$  y  $R^6$  son cada uno independientemente un átomo de hidrógeno o hidroxi;

a es un número entero seleccionado de entre 2 y 10;

cada b es independientemente un número entero seleccionado de entre 2 y 10;

c es un número entero seleccionado de entre 1 y 200;

$Y^1$  es un átomo de oxígeno o  $-\text{NR}^n-$ ;

G es un átomo de oxígeno, un átomo de azufre o  $-\text{NH}-$ ;

$R^n$  es un átomo de hidrógeno, alquilo  $C_{1-6}$ ,  $-\text{CO}-(\text{CH}_2)_d-\text{R}^o$ ,  $-(\text{CH}_2)_e-\text{R}^p$ , o  $-(\text{CH}_2)_r(Y^2-(\text{CH}_2)_g)_h-\text{R}^q$ ;

cada g es independientemente un número entero seleccionado de entre 2 y 10;

d, e, f y h son cada uno independientemente un número entero seleccionado de entre 2 y 10;

$R^o$ ,  $R^p$  y  $R^q$  se seleccionan cada uno independientemente de entre un átomo de hidrógeno, hidroxi, carboxi o  $-\text{NHR}^f$ ;

$Y^2$  es un átomo de oxígeno o  $-\text{NH}-$ ;

$R^f$  es un átomo de hidrógeno, formilo o alquilcarbonilo  $C_{1-6}$ ].

(16) El derivado de ácido hialurónico como se cita en uno cualquiera de (1) a (15), que se prepara usando ácido hialurónico compuesto exclusivamente por las unidades de disacárido representadas cada una por la Fórmula (II)

como se cita en (14), donde, cuando  $R^{1a}$ ,  $R^{2a}$ ,  $R^{3a}$ , y  $R^{4a}$  son todos átomos de hidrógeno,  $R^{8a}$  es acetilo, y  $X^a$  es  $-O^-Na^+$ , el peso molecular promedio en peso está en el intervalo de 20-120 kilodalton.

(17) El derivado de ácido hialurónico como se cita en uno cualquiera de (1) a (15), donde un ácido hialurónico no derivatizado correspondiente al derivado de ácido hialurónico en términos de la estructura principal tiene un peso molecular promedio en peso de 20-120 kilodalton, donde el ácido hialurónico no derivatizado es ácido hialurónico compuesto exclusivamente por unidades de disacárido de fórmula (II) donde  $R^{1a}$ ,  $R^{2a}$ ,  $R^{3a}$  y  $R^{4a}$  son átomos de hidrógeno,  $R^{8a}$  es acetilo y  $X^a$  es  $-O^-Na^+$ .

En otro aspecto proporcionado es una composición farmacéutica que comprende el derivado de ácido hialurónico como se cita en uno cualquiera de (1) a (17) como transportador.

En otro aspecto más también, se proporciona un derivado/conjugado de fármaco de ácido hialurónico donde uno o más fármacos se conjugan con el derivado de ácido hialurónico como se cita en uno cualquiera de (1) a (17).

En aún otro aspecto también, se proporciona un transportador de fármaco biodegradable que comprende el derivado de ácido hialurónico como se cita en uno cualquiera de (1) a (17).

En aún otro también, se proporciona un transportador para la transferencia intracitoplasmática de un fármaco, que comprende el derivado de ácido hialurónico como se cita en uno cualquiera de (1) a (17).

Además, en otro aspecto, se proporciona un transportador de fármaco biodegradable que comprende el derivado de ácido hialurónico como se cita en uno cualquiera de (1), (2), (5) a (7), (10), (11), y (14) a (17).

En aún otro aspecto se proporciona un transportador para la transferencia intracitoplasmática de un fármaco, que comprende el derivado de ácido hialurónico como se cita en uno cualquiera de (1), (3) a (6), (8) a (10), y (12) a (17).

Además, en otro aspecto, se proporciona un método para administrar un fármaco, que comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un fármaco junto con el derivado de ácido hialurónico como se cita en uno cualquiera de (1) a (17).

En aún otro aspecto, se proporciona un método de transferencia intracitoplasmática de un fármaco, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un fármaco junto con el derivado de ácido hialurónico como se cita en uno cualquiera de (1) a (17).

Además, en otro aspecto, se proporciona un método para administrar un fármaco, que comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un fármaco junto con el derivado de ácido hialurónico como se cita en uno cualquiera de (1), (2), (5) a (7), (10), (11), y (14) a (17).

En aún otro aspecto, se proporciona un proceso para la transferencia intracitoplasmática de un fármaco, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un fármaco junto con el derivado de ácido hialurónico como se cita en uno cualquiera de (1), (3) a (6), (8) a (10), y (12) a (17).

### Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra un ejemplo del espectro de RMN de  $^1H$  de HA-TBA preparado en el Ejemplo 1-2.

La figura 2 muestra un ejemplo del espectro de RMN de  $^1H$  de HA-FL/TBA preparado en el Ejemplo 1-3.

La figura 3-1 muestra un ejemplo del espectro de RMN de  $^1H$  de HA-Ala/FL preparado en el Ejemplo 1-4-1.

La figura 3-2 muestra ejemplos de los espectros de RMN de  $^1H$  de HA-Ser/FL y HA-Ser-OEt/FL preparados en el Ejemplo 1-4-2.

La figura 3-3 muestra un ejemplo del espectro de RMN de  $^1H$  de HA-Glu/FL preparado en el Ejemplo 1-4-3.

La figura 3-4 muestra ejemplos de los espectros de RMN de  $^1H$  de HA-Gly/FL y HA-Gly-OEt/FL preparados en el Ejemplo 1-4-4.

La figura 3-5 muestra un ejemplo del espectro de RMN de  $^1H$  de HA-Val/FL preparado en el Ejemplo 1-4-5.

La figura 3-6 muestra un ejemplo del espectro de RMN de  $^1H$  de HA-Leu/FL preparado en el Ejemplo 1-4-6.

La figura 3-7 muestra un ejemplo del espectro de RMN de  $^1H$  de HA-Ile/FL preparado en el Ejemplo 1-4-7.

La figura 3-8 muestra un ejemplo del espectro de RMN de  $^1H$  de HA-Thr/FL preparado en el Ejemplo 1-4-8.

La figura 3-9 muestra un ejemplo del espectro de RMN de  $^1H$  de HA-Asp/FL preparado en el Ejemplo 1-4-9.

La figura 3-10 muestra un ejemplo del espectro de RMN de  $^1H$  de HA-cACHCA/FL preparado en el Ejemplo 1-4-10.

La figura 3-11 muestra un ejemplo del espectro de RMN de  $^1H$  de HA-tACHCA-OEt/FL preparado en el Ejemplo 1-4-11.

La figura 3-12 muestra un ejemplo del espectro de RMN de  $^1H$  de HA-Aib/FL preparado en el Ejemplo 1-4-12.

La figura 3-13 muestra un ejemplo del espectro de RMN de  $^1H$  de HA-ACBuCA-OEt/FL preparado en el Ejemplo 1-4-13.

La figura 3-14 muestra un ejemplo del espectro de RMN de  $^1H$  de HA-Asn/FL preparado en el Ejemplo 1-4-14.

La figura 3-15 muestra un ejemplo del espectro de RMN de  $^1H$  de HA-Ala-NH<sub>2</sub>/Rh preparado en el Ejemplo 1-4-

15.  
La figura 3-16 muestra un ejemplo del espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de HA-Val-NH<sub>2</sub>/Rh preparado en el Ejemplo 1-4-16.
- 5 La figura 3-17 muestra un ejemplo del espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de HA-Asn-NH<sub>2</sub>/Rh preparado en el Ejemplo 1-4-17.
- La figura 3-18 muestra ejemplos de los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  de HA-Me y HA-Me/FL preparados en el Ejemplo 1-4-18.
- La figura 3-19 muestra ejemplos de los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  de HA-Pr y HA-Pr/FL preparados en el Ejemplo 1-4-19.
- 10 La figura 4-1 muestra un ejemplo del espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de HA-AMCHCA preparado en el Ejemplo 1-5-1.  
La figura 4-2 muestra un ejemplo del espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de HA-pcACHCA preparado en el Ejemplo 1-5-2.  
La figura 4-3 muestra un ejemplo del espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de HA-Nal preparado en el Ejemplo 1-5-3.  
La figura 4-4 muestra un ejemplo del espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de HA-APBA preparado en el Ejemplo 1-5-4.  
La figura 4-5 muestra un ejemplo del espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de HA-Cha preparado en el Ejemplo 1-5-5.
- 15 La figura 4-6 muestra un ejemplo del espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de HA-AMBA preparado en el Ejemplo 1-5-6.  
La figura 4-7 muestra un ejemplo del espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de HA-3AMB preparado en el Ejemplo 1-5-7.  
La figura 4-8 muestra un ejemplo del espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de HA-APhPA preparado en el Ejemplo 1-5-8.  
La figura 4-9 muestra un ejemplo del espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de HA-AEBA preparado en el Ejemplo 1-5-9.  
La figura 4-10 muestra un ejemplo del espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de HA-AMCIBA preparado en el Ejemplo 1-5-10.
- 20 La figura 4-11 muestra un ejemplo del espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de HA-AMSA preparado en el Ejemplo 1-5-11.  
La figura 4-12 muestra un ejemplo del espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de HA-4AMCHCA preparado en el Ejemplo 1-5-12.  
La figura 4-13 muestra un ejemplo del espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de HA-Chg preparado en el Ejemplo 1-5-13.  
La figura 4-14 muestra un ejemplo del espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de HA-pHPHg preparado en el Ejemplo 1-5-14.
- 25 La figura 5-1 muestra ejemplos de los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  de HA-FL y HA-EDOBEA con un grado de modificación bajo, que se prepararon en el Ejemplo comparativo 1-1-1.  
La figura 5-2 muestra ejemplos de los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  de HA-EDOBEA-Ac/FL y HA-EDOBEA con un grado de modificación alto, que se prepararon en el Ejemplo comparativo 1-1-2.  
La figura 5-3 muestra un ejemplo del espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de HA-Phe/FL preparado en el Ejemplo comparativo 1-1-3.
- 30 La figura 5-4 muestra un ejemplo del espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de HA-Tyr/FL preparado en el Ejemplo comparativo 1-1-4.  
La figura 5-5 muestra un ejemplo del espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de HA-MePhe/FL preparado en el Ejemplo comparativo 1-1-5.
- 35 La figura 5-6 muestra un ejemplo del espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de HA-Pro-OMe/FL preparado en el Ejemplo comparativo 1-1-6.  
La figura 5-7 muestra un ejemplo del espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de HA-Gly-NH<sub>2</sub>/Rh preparado en el Ejemplo comparativo 1-1-7.  
La figura 5-8 muestra un ejemplo del espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de HA-Ser-NH<sub>2</sub>/Rh preparado en el Ejemplo comparativo 1-1-8.
- 40 La figura 5-9 muestra un ejemplo del espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de HA-Leu-NH<sub>2</sub>/Rh preparado en el Ejemplo comparativo 1-1-9.  
La figura 5-10 muestra un ejemplo del espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de HA-Ile-NH<sub>2</sub>/Rh preparado en el Ejemplo comparativo 1-1-10.
- 45 La figura 5-11 muestra un ejemplo del espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de HA-Thr-NH<sub>2</sub>/Rh preparado en el Ejemplo comparativo 1-1-11.  
La figura 5-12 muestra un ejemplo del espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de HA-Gln-NH<sub>2</sub>/Rh preparado en el Ejemplo comparativo 1-1-12.
- 50 La figura 6-1 muestra un ejemplo del espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de HA-NIe preparado en el Ejemplo comparativo 1-2-1.  
La figura 6-2 muestra un ejemplo del espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de HA-tLeu preparado en el Ejemplo comparativo 1-2-2.  
La figura 6-3 muestra un ejemplo del espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de HA-pFPhe preparado en el Ejemplo comparativo 1-2-3.
- 55 La figura 6-4 muestra un ejemplo del espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de HA-Phg preparado en el Ejemplo comparativo 1-2-4.  
La figura 7 muestra un ejemplo del espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de PEG-FL preparado en el Ejemplo comparativo 1-3.  
La figura 8 muestra los promedios del grupo para los cursos de tiempo de las concentraciones de la muestra en plasma de rata según se calculó en el Ejemplo 3-2-2.
- 60 La figura 9-1 muestra los gráficos que representan los promedios del grupo para los cursos de tiempo de las concentraciones de la muestra en plasma de rata según se calculó en el Ejemplo 3-2-2.  
La figura 9-2 muestra los gráficos que representan los promedios del grupo para los cursos de tiempo de las concentraciones de la muestra en plasma de rata según se calculó en el Ejemplo 3-2-2.
- 65 La figura 10-1 muestra los cromatogramas obtenidos realizando cromatografía de exclusión por tamaño en las muestras de orina de las ratas tratadas con HA-Ala/FL preparadas en el Ejemplo 1-4-1.  
La figura 10-2 muestra los cromatogramas obtenidos realizando cromatografía de exclusión por tamaño en las

- muestras de orina de las ratas tratadas con HA-Ser/FL preparadas en el Ejemplo 1-4-2.
- La figura 10-3 muestra los cromatogramas obtenidos realizando cromatografía de exclusión por tamaño en las muestras de orina de las ratas tratadas con HA-Glu/FL preparadas en el Ejemplo 1-4-3.
- La figura 10-4 muestra los cromatogramas obtenidos realizando cromatografía de exclusión por tamaño en las muestras de orina de las ratas tratadas con HA-Gly/FL preparadas en el Ejemplo 1-4-4.
- La figura 10-5 muestra los cromatogramas obtenidos realizando cromatografía de exclusión por tamaño en las muestras de orina de las ratas tratadas con HA-Val/FL preparadas en el Ejemplo 1-4-5.
- La figura 10-6 muestra los cromatogramas obtenidos realizando cromatografía de exclusión por tamaño en las muestras de orina de las ratas tratadas con HA-Leu/FL preparadas en el Ejemplo 1-4-6.
- La figura 10-7 muestra los cromatogramas obtenidos realizando cromatografía de exclusión por tamaño en las muestras de orina de las ratas tratadas con HA-Ile/FL preparadas en el Ejemplo 1-4-7.
- La figura 10-8 muestra los cromatogramas obtenidos realizando cromatografía de exclusión por tamaño en las muestras de orina de las ratas tratadas con HA-Thr/FL preparadas en el Ejemplo 1-4-8.
- La figura 10-9 muestra los cromatogramas obtenidos realizando cromatografía de exclusión por tamaño en las muestras de orina de las ratas tratadas con HA-Asp/FL preparadas en el Ejemplo 1-4-9.
- La figura 10-10 muestra los cromatogramas obtenidos realizando cromatografía de exclusión por tamaño en las muestras de orina de las ratas tratadas con HA-cACHCA/FL preparadas en el Ejemplo 1-4-10.
- La figura 10-11 muestra los cromatogramas obtenidos realizando cromatografía de exclusión por tamaño en las muestras de orina de las ratas tratadas con HA-tACHCA-OEt/FL preparadas en el Ejemplo 1-4-11.
- La figura 10-12 muestra los cromatogramas obtenidos realizando cromatografía de exclusión por tamaño en las muestras de orina de las ratas tratadas con HA-Aib/FL preparadas en el Ejemplo 1-4-12.
- La figura 10-13 muestra los cromatogramas obtenidos realizando cromatografía de exclusión por tamaño en las muestras de orina de las ratas tratadas con HA-ACBuCA-OEt/FL preparadas en el Ejemplo 1-4-13.
- La figura 10-14 muestra los cromatogramas obtenidos realizando cromatografía de exclusión por tamaño en las muestras de orina de las ratas tratadas con HA-Asn/Rh preparadas en el Ejemplo 1-4-14.
- La figura 10-15 muestra los cromatogramas obtenidos realizando cromatografía de exclusión por tamaño en las muestras de orina de las ratas tratadas con HA-Ala-NH<sub>2</sub>/Rh preparadas en el Ejemplo 1-4-15.
- La figura 10-16 muestra los cromatogramas obtenidos realizando cromatografía de exclusión por tamaño en las muestras de orina de las ratas tratadas con HA-Val-NH<sub>2</sub>/Rh preparadas en el Ejemplo 1-4-16.
- La figura 10-17 muestra los cromatogramas obtenidos realizando cromatografía de exclusión por tamaño en las muestras de orina de las ratas tratadas con HA-Asn-NH<sub>2</sub>/Rh preparadas en el Ejemplo 1-4-17.
- La figura 10-18 muestra los cromatogramas obtenidos realizando cromatografía de exclusión por tamaño en las muestras de orina de las ratas tratadas con HA-Me/FL preparadas en el Ejemplo 1-4-18.
- La figura 10-19 muestra los cromatogramas obtenidos realizando cromatografía de exclusión por tamaño en las muestras de orina de las ratas tratadas con HA-Pr/FL preparadas en el Ejemplo 1-4-19.
- La figura 10-20 muestra los cromatogramas obtenidos realizando cromatografía de exclusión por tamaño en las muestras de orina de las ratas tratadas con HA-FL preparadas en el Ejemplo 1-1-1.
- La figura 10-21 muestra los cromatogramas obtenidos realizando cromatografía de exclusión por tamaño en las muestras de orina de las ratas tratadas con HA-EDOBEA-Ac/FL preparadas en el Ejemplo 1-1-2.
- La figura 10-22 muestra los cromatogramas obtenidos realizando cromatografía de exclusión por tamaño en las muestras de orina de las ratas tratadas con HA-Phe/FL preparadas en el Ejemplo 1-1-3.
- La figura 10-23 muestra los cromatogramas obtenidos realizando cromatografía de exclusión por tamaño en las muestras de orina de las ratas tratadas con HA-Tyr/FL preparadas en el Ejemplo 1-1-4.
- La figura 10-24 muestra los cromatogramas obtenidos realizando cromatografía de exclusión por tamaño en las muestras de orina de las ratas tratadas con HA-MePhe/FL preparadas en el Ejemplo 1-1-5.
- La figura 10-25 muestra los cromatogramas obtenidos realizando cromatografía de exclusión por tamaño en las muestras de orina de las ratas tratadas con HA-Pro-OMe/FL preparadas en el Ejemplo 1-1-6.
- La figura 10-26 muestra los cromatogramas obtenidos realizando cromatografía de exclusión por tamaño en las muestras de orina de las ratas tratadas con HA-Gly-NH<sub>2</sub>/Rh preparadas en el Ejemplo 1-1-7.
- La figura 10-27 muestra los cromatogramas obtenidos realizando cromatografía de exclusión por tamaño en las muestras de orina de las ratas tratadas con HA-Ser-NP<sub>2</sub>/Rh preparadas en el Ejemplo 1-1-8.
- La figura 10-28 muestra los cromatogramas obtenidos realizando cromatografía de exclusión por tamaño en las muestras de orina de las ratas tratadas con HA-Leu-NH<sub>2</sub>/Rh preparadas en el Ejemplo 1-1-9.
- La figura 10-29 muestra los cromatogramas obtenidos realizando cromatografía de exclusión por tamaño en las muestras de orina de las ratas tratadas con HA-Ile-NH<sub>2</sub>/Rh preparadas en el Ejemplo 1-1-10.
- La figura 10-30 muestra los cromatogramas obtenidos realizando cromatografía de exclusión por tamaño en las muestras de orina de las ratas tratadas con HA-Thr-NH<sub>2</sub>/Rh preparadas en el Ejemplo 1-1-11.
- La figura 10-31 muestra los cromatogramas obtenidos realizando cromatografía de exclusión por tamaño en las muestras de orina de las ratas tratadas con HA-Gln-NH<sub>2</sub>/Rh preparadas en el Ejemplo 1-1-12.
- La figura 11 es una tabla que muestra los grados de degradación de los liposomas de los derivados de HA de acuerdo con la presente invención según se evaluó en el Ejemplo 4-2.
- La figura 12-1 muestra ejemplos de los espectros de RMN de <sup>1</sup>H de la muestra para calcular los grados de modificación con alanina y HA-Ala-TBA, que se prepararon en el Ejemplo 5-1.
- La figura 12-2 muestra un ejemplo del espectro de RMN de <sup>1</sup>H de HA-Ala-EDOBEA preparado en el Ejemplo 5-2.
- La figura 12-3 muestra un ejemplo del espectro de RMN de <sup>1</sup>H de HA-Ala-EDOBEA-Rh preparado en el Ejemplo 5-3.

La figura 13 muestra los promedios del grupo para los cursos de tiempo de las concentraciones de la muestra en plasma de rata según se calculó en el Ejemplo 6-2-2.

La figura 14 muestra el gráfico que representa los promedios del grupo para los cursos de tiempo de las concentraciones de la muestra en plasma de rata según se calculó en el Ejemplo 6-2-2.

5 La figura 15 muestra los cromatogramas obtenidos realizando cromatografía de exclusión por tamaño en las muestras de orina de las ratas tratadas con HA-Ala-PTH/Rh preparadas en el Ejemplo 5-5.

### Descripción de realizaciones

10 El derivado de ácido hialurónico de la presente invención no está particularmente limitado, siempre y cuando sea un derivado de ácido hialurónico que comprende una o más unidades de disacárido representadas por la Fórmula (I). En una realización de la presente invención, la proporción de las unidades de disacárido de Fórmula (I) con respecto a las unidades de repetición de disacárido presentes en el derivado de ácido hialurónico de la presente invención es, por ejemplo, de al menos 70 %, preferentemente de al menos 75 % y, más preferentemente, de al menos 90 %. El  
15 límite superior de dicha proporción puede ser cualquier valor no superior al 100 %. En una realización de la presente invención, se proporciona un derivado de ácido hialurónico que comprende una o más unidades de disacárido representadas por la Fórmula (I) y una o más unidades de disacárido representadas por la Fórmula (II) y/o (III).

20 En una realización de la presente invención, el derivado de ácido hialurónico está compuesto sustancialmente por unidades de disacárido de Fórmulas (I) y (II). En el derivado de ácido hialurónico, por ejemplo al menos un 80 %, preferentemente al menos un 90 % y, más preferentemente, al menos un 95 % de sus unidades de repetición de disacárido constitutivas compuestas por ácido D-glucurónico y N-acetilglucosamina están ocupadas por las unidades de disacárido de Fórmula (I) o (II). En una realización de la presente invención, el derivado de ácido hialurónico está compuesto exclusivamente por unidades de disacárido representadas por las Fórmulas (I) y (II).

25 En una realización de la presente invención, el derivado de ácido hialurónico está compuesto sustancialmente por unidades de disacárido de Fórmulas (I), (II) y (III). En el derivado de ácido hialurónico, por ejemplo al menos un 80 %, preferentemente al menos un 90 % y, más preferentemente, al menos un 95 % de sus unidades de repetición de disacárido constitutivas compuestas por ácido D-glucurónico y N-acetilglucosamina están ocupadas por las unidades de disacárido de Fórmula (I), (II) o (III). En una realización de la presente invención, el derivado de ácido hialurónico está compuesto exclusivamente por unidades de disacárido representadas por las Fórmulas (I), (II) y (III).

30 La proporción de unidades de disacárido particulares con respecto a las unidades de repetición de disacárido presentes en el derivado de ácido hialurónico de la presente invención significa, preferentemente, la proporción de unidades de disacárido particulares con respecto a todas las unidades de disacárido presentes en una cierta cantidad del derivado de ácido hialurónico de la presente invención que es un polisacárido compuesto por unidades de repetición de un disacárido.

35 En la Fórmula (I) que representa una unidad de disacárido presente en el derivado de ácido hialurónico de la presente invención,  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$  y  $R^4$  son todos, preferentemente, átomos de hidrógeno.  $R^8$  es, preferentemente, un átomo de hidrógeno o alquilcarbonilo  $C_{1-6}$ , más preferentemente, un átomo de hidrógeno o acetilo, e, incluso más preferentemente, acetilo. En las fórmulas (II) y (III) que representan unidades de disacárido presentes en el derivado de ácido hialurónico de la presente invención,  $R^{1a}$ ,  $R^{2a}$ ,  $R^{3a}$  y  $R^{4a}$ , así como  $R^{1b}$ ,  $R^{2b}$ ,  $R^{3b}$  y  $R^{4b}$  son todos, preferentemente, átomos de hidrógeno.  $R^{8a}$  y  $R^{8b}$  son cada uno, preferentemente, un átomo de hidrógeno o alquilcarbonilo  $C_{1-6}$ , más preferentemente, un átomo de hidrógeno o acetilo, e, incluso más preferentemente, acetilo.

45 En la Fórmula (I), cuando -A-B-Z es alquilo  $C_{1-6}$ , alquilo  $C_{1-3}$  es preferente, y metilo o n-propilo es particularmente preferente.

50 En la Fórmula (I),  $R^x$  es un átomo de hidrógeno, o alquilo  $C_{1-6}$ , tal como metilo y etilo, y es, preferentemente, un átomo de hidrógeno.  $R^y$  es un átomo de hidrógeno, o alquilo  $C_{1-6}$ , tal como metilo y etilo, y es, preferentemente, un átomo de hidrógeno, metilo o etilo.

55 En la Fórmula (I), cuando A o B es cicloalquileno  $C_{3-8}$ , ejemplos del cicloalquileno  $C_{3-8}$  incluyen 1,1-ciclohexileno, 1,2-ciclohexileno, 1,3-ciclohexileno, 1,4-ciclohexileno, 1,1-ciclopentileno, 1,2-ciclopentileno, 1,3-ciclopentileno, 1,1-ciclobutileno, 1,2-ciclobutileno, y 1,3-ciclobutileno. Entre los ejemplos preferentes se incluyen 1,1-ciclohexileno, 1,2-ciclohexileno, 1,4-ciclohexileno, y 1,1-ciclobutileno. Desde el punto de vista de la provisión tanto de biodegradabilidad como de permanencia en la sangre, el cicloalquileno  $C_{3-8}$  es, preferentemente, 1,1-ciclohexileno, 1,2-ciclohexileno, o 1,1-ciclobutileno, y desde el punto de vista de la administración de un gen o un fármaco en el citoplasma, el cicloalquileno  $C_{3-8}$  es, preferentemente, 1,4-ciclohexileno.

60 En la Fórmula (I), cuando B es fenileno, ejemplos del fenileno incluyen 1,2-fenileno, 1,3-fenileno y 1,4-fenileno. Entre los ejemplos preferentes se incluyen 1,4-fenileno y 1,3-fenileno. Asimismo, cuando B es fenileno, entre los ejemplos particularmente preferentes se incluye 1,4-fenileno.

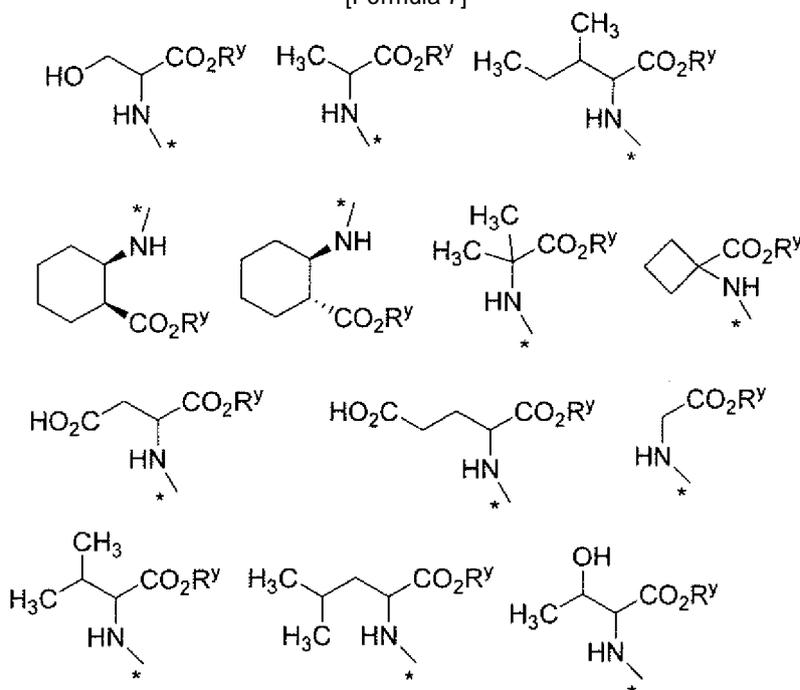
65 El fenileno puede estar sustituido por uno o más grupos seleccionados de entre hidroxilo y átomos de halógeno. Entre

los ejemplos específicos del fenileno sustituido se incluyen 2-hidroxi-1,4-fenileno, 3-hidroxi-1,4-fenileno, 2,3-dihidroxi-1,4-fenileno, 3,5-dihidroxi-1,4-fenileno, 5-hidroxi-1,3-fenileno, 3-hidroxi-1,2-fenileno, y 4-hidroxi-1,2-fenileno; 2-cloro-1,4-fenileno, 2-yodo-1,4-fenileno, 1-bromo-1,4-fenileno, 2,6-difluoro-1,4-fenileno, 3,5-dicloro-1,4-fenileno, 5-cloro-1,3-fenileno, 3-bromo-1,2-fenileno, y 4-cloro-1,2-fenileno; 6-fluoro-2-hidroxi-1,4-fenileno, 5-cloro-3-yodo-1,4-fenileno, 2-bromo-3-hidroxi-1,4-fenileno, 5-bromo-3-cloro-1,4-fenileno, 5-hidroxi-6-yodo-1,3-fenileno, 3-cloro-4-hidroxi-1,2-fenileno, y 4-bromo-3-cloro-1,2-fenileno, y, preferentemente, incluyen 3-hidroxi-1,4-fenileno y 2-cloro-1,4-fenileno.

R<sup>c</sup> es alquilo C<sub>1-6</sub> que puede estar sustituido por carbamoilo (-CONH<sub>2</sub>) y es, preferentemente, metilo, isopropilo o carbamoilmetilo, y es, más preferentemente, isopropilo o carbamoilmetilo.

R<sup>ya</sup> y R<sup>yb</sup> se seleccionan cada uno independientemente de entre un átomo de hidrógeno, alquilo C<sub>1-6</sub>, formilo y alquilcarbonilo C<sub>1-6</sub>; preferentemente, ambos son átomos de hidrógeno o uno de ellos es un átomo de hidrógeno y el otro es alquilo C<sub>1-6</sub>, o uno de ellos es un átomo de hidrógeno y el otro es alquilcarbonilo C<sub>1-6</sub>, más preferentemente, ambos son átomos de hidrógeno o uno de ellos es un átomo de hidrógeno y el otro es metilo o uno de ellos es un átomo de hidrógeno y el otro es etilo; e incluso más preferentemente, ambos son átomos de hidrógeno. En la Fórmula (I), X se ilustra con los siguientes grupos:

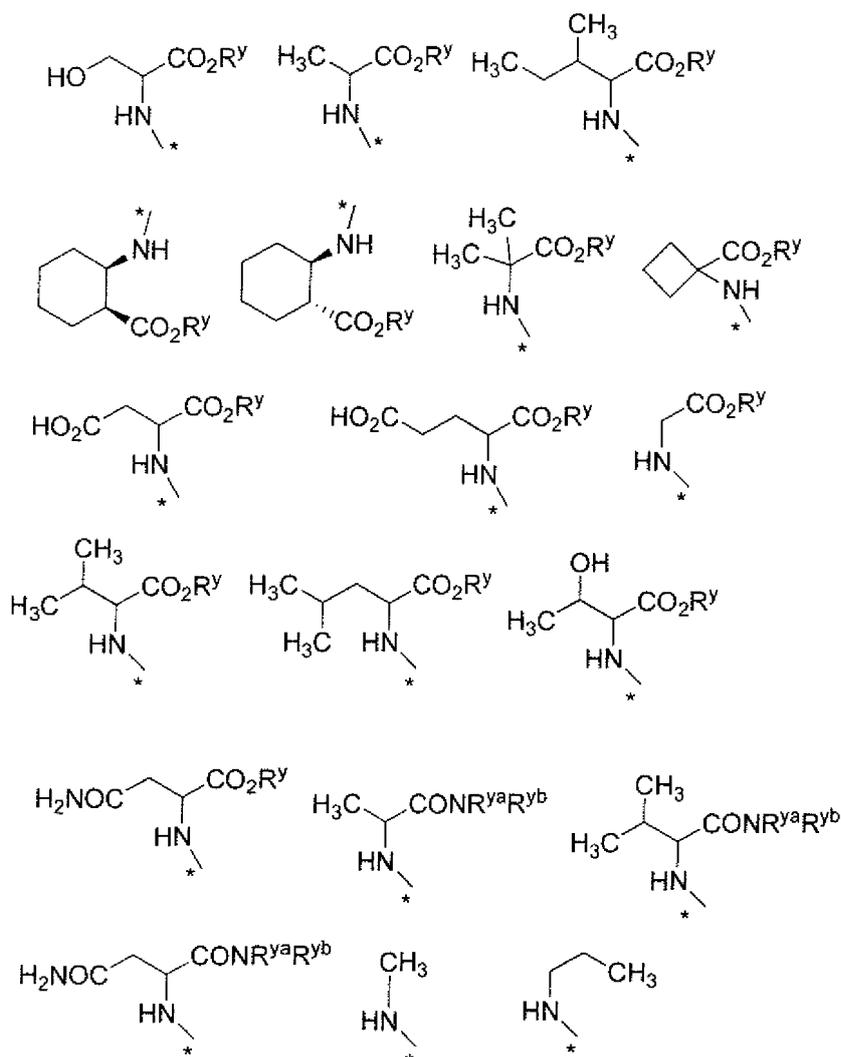
[Fórmula 7]



[donde R<sup>y</sup> es como se define en el presente documento].

Los grupos de ejemplo son preferentes desde el punto de vista de la provisión tanto de biodegradabilidad como de permanencia en la sangre.

Además, X en la Fórmula (I) se ilustra mediante los siguientes grupos:



[donde  $R^y$ ,  $R^{ya}$  y  $R^{yb}$  son como se definen en el presente documento].

- 5 En las fórmulas anteriores, "\*" representa una posición de unión a carboxi en el derivado de ácido hialurónico (lo mismo se aplica más adelante en el presente documento).

10 En una realización de la presente invención, desde el punto de vista de la provisión tanto de biodegradabilidad como de permanencia en la sangre se prefiere que, como se define en la Fórmula (I), A sea  $-CR^aR^b$ - (donde  $R^a$  es como se ha definido anteriormente, y  $R^b$  se selecciona de entre un átomo de hidrógeno y alquilo  $C_{1-6}$  (donde el alquilo  $C_{1-6}$  puede estar sustituido por un grupo seleccionado de entre hidroxilo y carboxilo)), y B sea un enlace directo; o que A sea cicloalquileo  $C_{3-8}$ , y B sea un enlace directo.

15 En otra realización de la presente invención, desde el punto de vista de la provisión tanto de biodegradabilidad como de permanencia en la sangre se prefiere que, como se define en la Fórmula (I), X sea  $-NHCH_3$ ,  $-NH(CH_2)_2CH_3$  o  $NR^x-CHR^c-CONR^{ya}R^{yb}$ ; o que A sea  $-CR^aR^b$ - (donde  $R^a$  es como se ha definido anteriormente, y  $R^b$  se selecciona de entre un átomo de hidrógeno y alquilo  $C_{1-6}$  (donde el alquilo  $C_{1-6}$  puede estar sustituido por un grupo seleccionado de entre hidroxilo, carboxilo y carbamilo)), y B sea un enlace directo; o que A sea cicloalquileo  $C_{3-8}$  y B sea un enlace directo.

20  $R^a$  es, más preferentemente, un átomo de hidrógeno y metilo, e incluso más preferentemente, un átomo de hidrógeno.  $R^b$  es, preferentemente, un átomo de hidrógeno y alquilo  $C_{1-4}$  (donde el alquilo  $C_{1-4}$  puede estar sustituido por un grupo seleccionado de entre hidroxilo y carboxilo), y, más preferentemente, metilo, que puede estar sustituido por hidroxilo. Entre los ejemplos preferentes de  $R^b$  se incluyen un átomo de hidrógeno y alquilo  $C_{1-4}$  (donde el alquilo  $C_{1-4}$  puede estar sustituido por un grupo seleccionado de entre hidroxilo, carboxilo y carbamilo).

25

B es, preferentemente, ciclohexano-1,2-diilo y ciclobutano-1,1-diilo, y, más preferentemente, ciclohexano-1,2-diilo. Se prefiere que la configuración de  $-NR^x$ - y  $-COOR^y$  en el anillo de ciclohexano sea cualquiera de configuración cis y

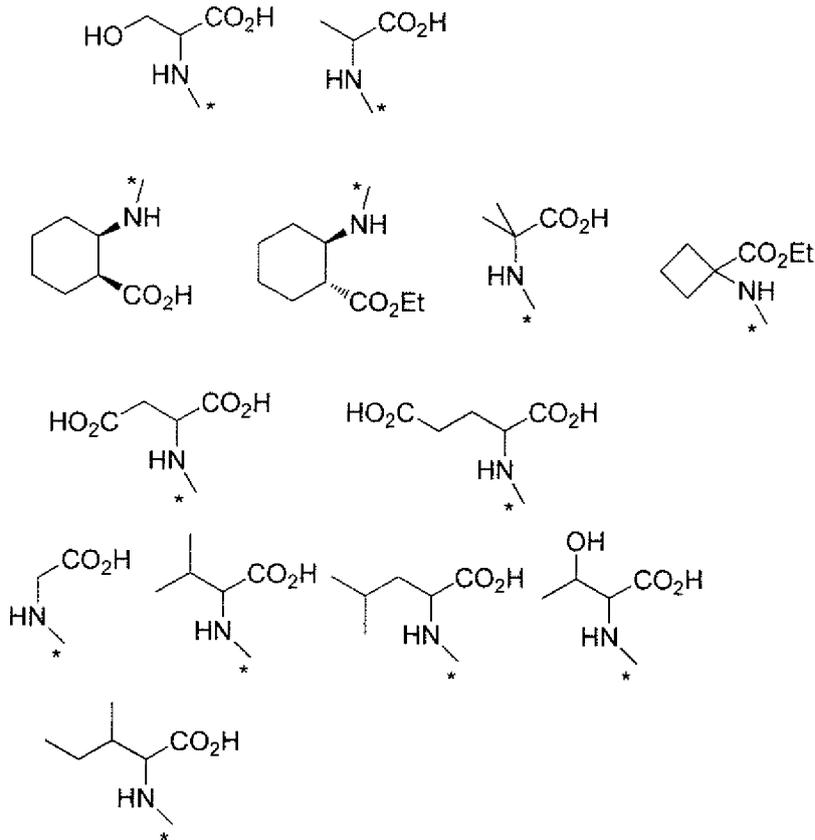
la configuración trans. En el derivado de ácido hialurónico de la presente invención, las configuraciones de  $-NR^x$ - y  $-COOR^y$  en los anillos de ciclohexano pueden consistir exclusivamente en configuraciones cis o en configuraciones trans, o pueden consistir en configuraciones cis y configuraciones trans en cualquier proporción. Como alternativa, la configuración de cada grupo puede consistir en uno de los tipos de configuración o puede consistir en ambos tipos de configuraciones en cualquier proporción.

5

Desde el punto de vista de la provisión tanto de biodegradabilidad como de permanencia en la sangre, entre los ejemplos específicos del X preferente se incluyen, pero sin limitación, los grupos representados por las siguientes fórmulas:

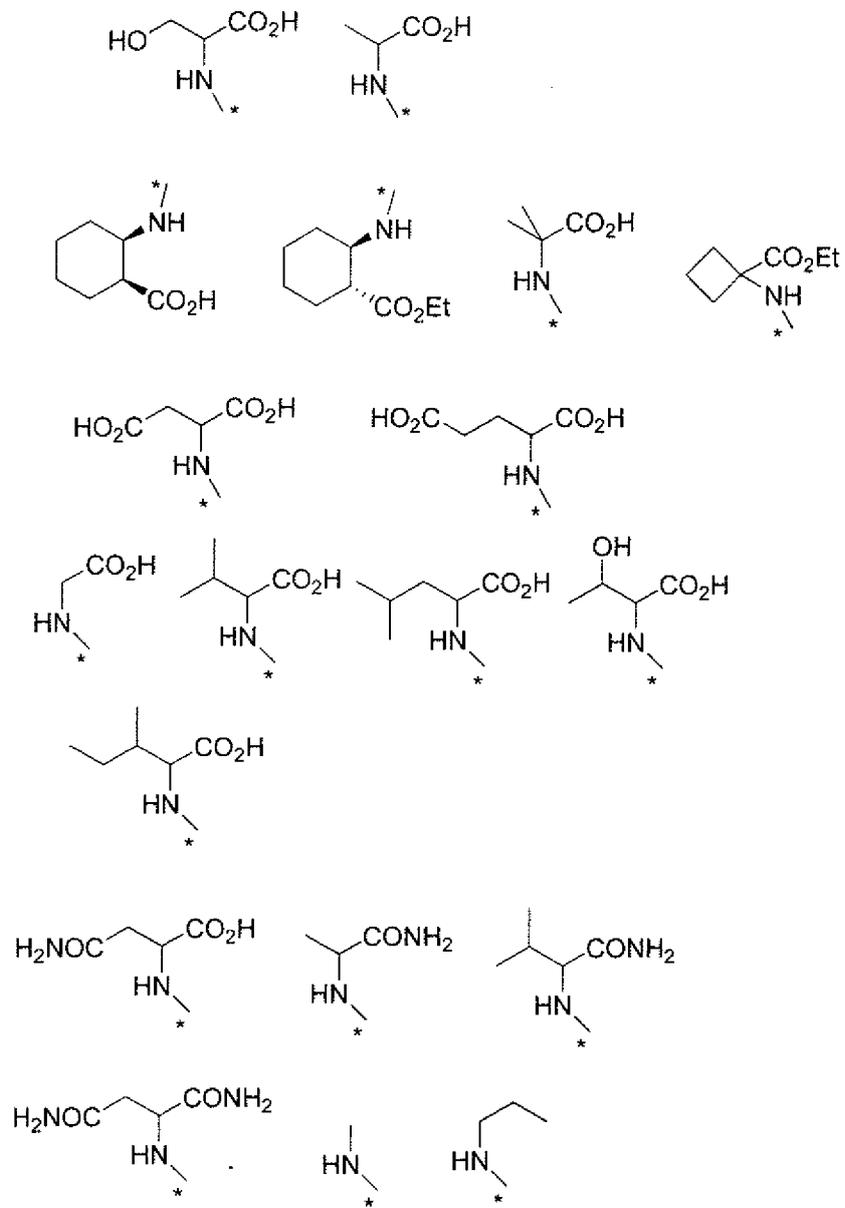
10

[Fórmula 9]



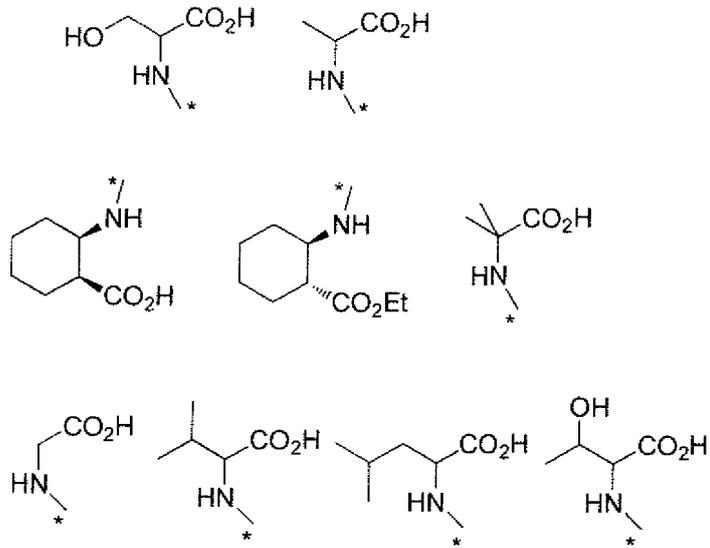
15 Desde el punto de vista de la provisión tanto de biodegradabilidad como de permanencia en la sangre, otros ejemplos específicos del X preferente incluyen, pero sin limitación, los grupos representados por las siguientes fórmulas:

[Fórmula 10]



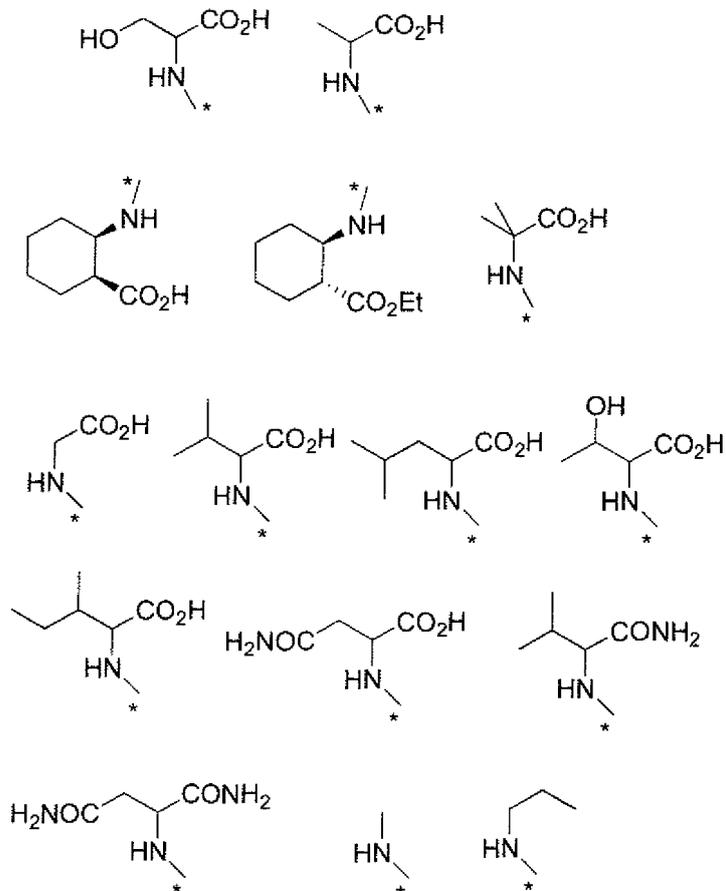
5 Entre los ejemplos específicos del X más preferente se incluyen siguientes grupos:

[Fórmula 11]



5 Entre otros ejemplos específicos del X más preferente se incluyen los siguientes grupos:

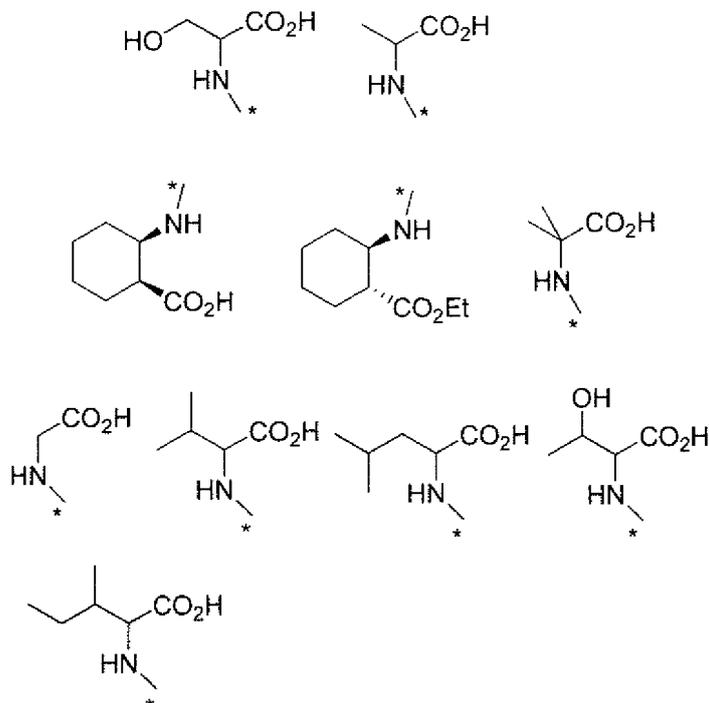
[Fórmula 12]



10

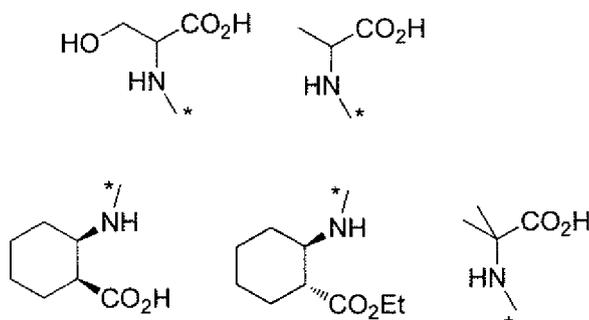
Entre los ejemplos específicos del X más preferente se incluyen siguientes grupos:

[Fórmula 13]



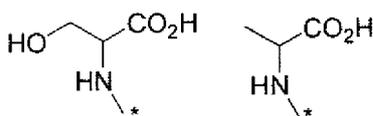
5 Entre otros ejemplos específicos del X más preferente se incluyen los siguientes grupos:

[Fórmula 14]



10 Entre los ejemplos específicos del X particularmente preferente se incluyen siguientes grupos:

[Fórmula 15]



15 Desde el punto de vista de la provisión tanto de biodegradabilidad como de permanencia en la sangre, la proporción de las unidades de disacárido de Fórmula (I) con respecto a las unidades de repetición de disacárido presentes en el derivado de ácido hialurónico de la presente invención es, preferentemente, de al menos 70 %, más preferentemente de al menos 75 %, e incluso más preferentemente de al menos 90 %.

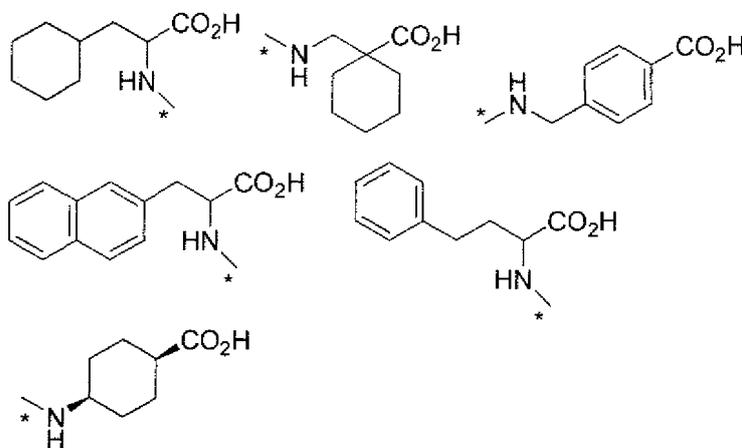
25 En una realización de la presente invención, desde el punto de vista de la administración de un gen o un fármaco en el citoplasma como se define en la fórmula (I) es preferente que A sea cicloalquileo C<sub>3-8</sub> y B sea un enlace directo; o que A sea -CH<sub>2</sub>- y B se seleccione de fenileno y cicloalquileo C<sub>3-8</sub>; o que A se seleccione de entre 2-ciclohexiletano-1,1-diilo, 2-(2-naftil)etan-1,1-diilo y 3-fenilpropano-1,1-diilo, y B sea un enlace directo. Es más preferente que, como se define en la Fórmula (I), A sea -CH<sub>2</sub>-, y B se seleccione de entre ciclohexano-1,1-diilo y

benceno-1,4-diilo; o que A se seleccione de entre 2-ciclohexiletano-1,1-diilo, 2-(2-naftil)etano-1,1-diilo y 3-fenilpropano-1,1-diilo.

5 En otra realización de la presente invención, desde el punto de vista de la administración de un gen o un fármaco en el citoplasma como se define en la fórmula (I) es preferente que A sea cicloalquileo C<sub>3-8</sub> y B sea un enlace directo; o que A sea -CH<sub>2</sub>- o -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, y B se seleccione de entre fenileno (donde el fenileno puede estar sustituido por uno o más grupos seleccionados de entre hidroxilo y átomos de halógeno), cicloalquileo C<sub>3-8</sub> y fenilmetano-1,1-diilo; o que A se seleccione de entre 2-ciclohexiletano-1,1-diilo, 2-(2-naftil)etano-1,1-diilo, 3-fenilpropano-1,1-diilo, ciclohexilmetano-1,1-diilo y 4-hidroxifenilmetano-1,1-diilo, y B sea un enlace directo. Es más preferente que, como  
10 se define en la Fórmula (I), A sea -CH<sub>2</sub>-, y B se seleccione de entre ciclohexano-1,1-diilo, benceno-1,4-diilo, benceno-1,3-diilo, 2-clorobenceno-1,4-diilo y fenilmetano-1,1-diilo; o que A sea -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, y B sea benceno-1,4-diilo; o que A se seleccione de entre 2-ciclohexiletano-1,1-diilo, 2-(2-naftil)etano-1,1-diilo y 3-fenilpropano-1,1-diilo.

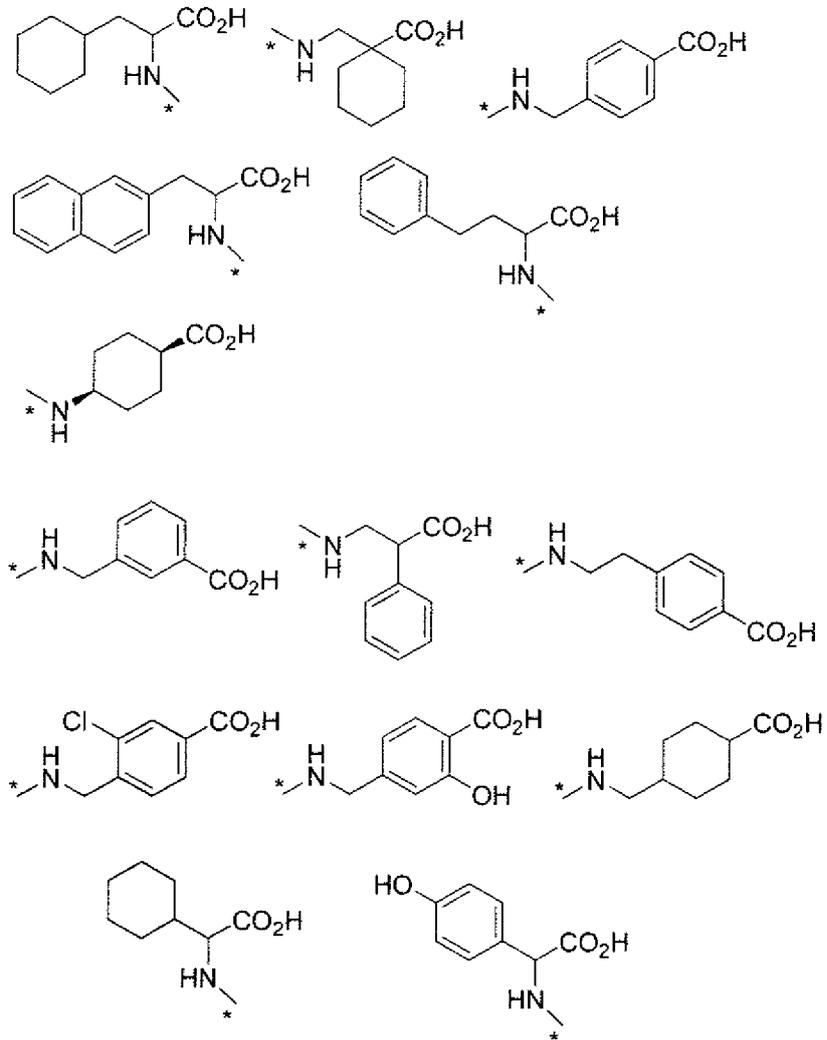
15 Desde el punto de vista de la administración de un gen o un fármaco en el citoplasma, entre los ejemplos específicos del X preferente se incluyen, pero sin limitación, los grupos representados por las siguientes fórmulas:

[Fórmula 16]



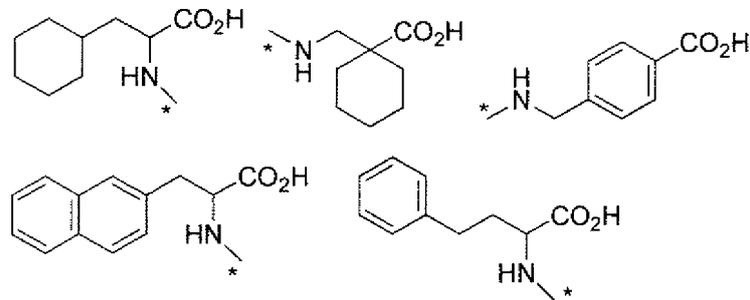
20 Desde el punto de vista de la administración de un gen o un fármaco en el citoplasma, entre los ejemplos específicos del X preferente se incluyen, pero sin limitación, los grupos representados por las siguientes fórmulas:

[Fórmula 17]



5 Entre los ejemplos específicos del X más preferente se incluyen siguientes grupos:

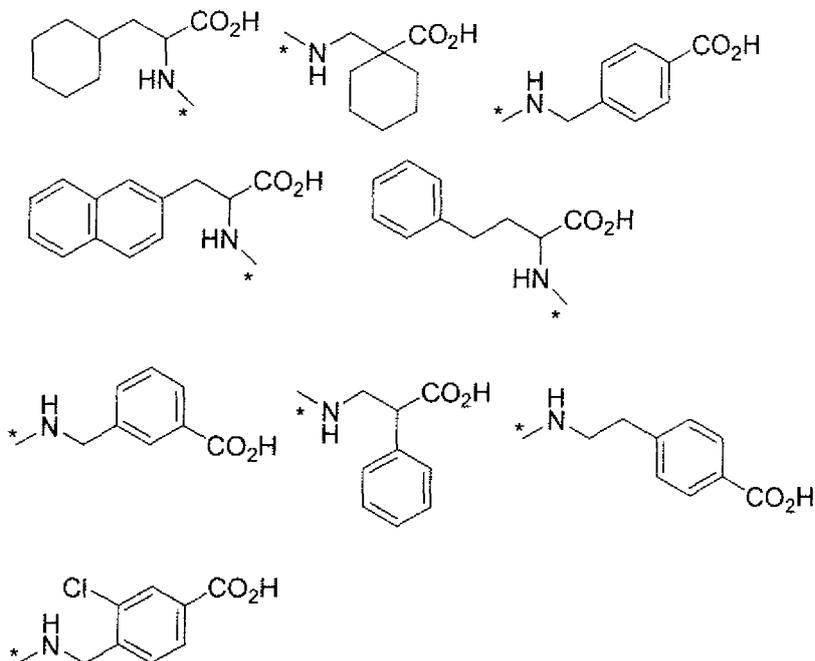
[Fórmula 18]



10

Entre otros ejemplos específicos del X más preferente se incluyen los siguientes grupos:

[Fórmula 19]

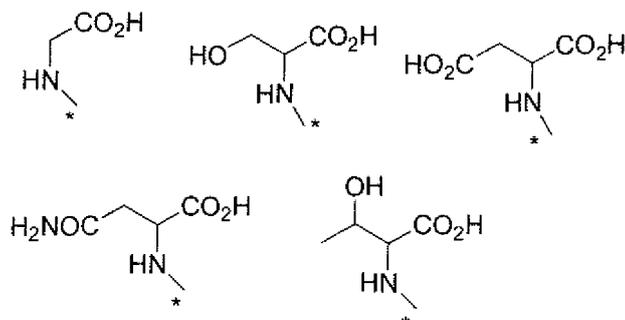


5 Cuando X en la Fórmula (I) contiene uno o más puntos asimétricos, la configuración en cada punto asimétrico puede consistir exclusivamente en una configuración R o S, o puede consistir en ambas configuraciones en cualquier proporción.

Cabe señalar que los siguientes grupos:

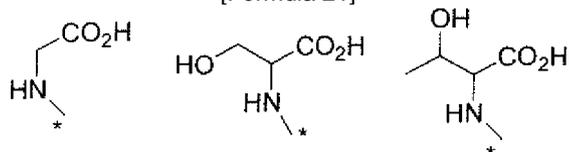
10

[Fórmula 20]



15 o los siguientes grupos:

[Fórmula 21]



20 pueden excluirse de X en la Fórmula (I).

25 En la Fórmula (II),  $Q^+$  no está particularmente limitado, siempre que sea un contracación que forme una sal con carboxi en agua y cuando es divalente o superior, forma una sal con dos o más grupos carboxi dependiendo de la valencia. Ejemplos del contracación incluyen, pero sin limitación, iones metálicos, tales como ion litio, ion sodio, ion rubidio, ion cesio, ion magnesio, ion calcio; y un ion amonio representado por la fórmula  $N^+R^jR^kR^lR^m$  (donde  $R^j$ ,  $R^k$ ,  $R^l$  y  $R^m$  cada uno se seleccionan independientemente de entre un átomo de hidrógeno y  $C_{1-6}$  alquilo), y, preferentemente, incluyen ion sodio, ion potasio e ion tetraalquilamonio (por ejemplo, ion tetra-n-butilamonio).  $R^j$ ,  $R^k$ ,

R<sup>l</sup> y R<sup>m</sup> son cada uno preferentemente el mismo grupo seleccionado de alquilos C<sub>1-6</sub>, y son, cada uno más preferentemente, n-butilo.

En la Fórmula (III), ejemplos de X<sup>b</sup> incluyen los siguientes grupos:

- 5        -HN-(CH<sub>2</sub>)<sub>j</sub>-SH;  
           -HN-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-(Y<sup>1</sup>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)<sub>c</sub>-SH;  
           -HN-(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>-O-CO-C(R<sup>7</sup>)=CH<sub>2</sub>;  
           -HN-(CH<sub>2</sub>)<sub>i</sub>-NHCO-C(R<sup>7</sup>)=CH<sub>2</sub>;  
 10        -HN-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-(Y<sup>1</sup>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)<sub>c</sub>-NHCO-C(R<sup>7</sup>)=CH<sub>2</sub>; o  
           -HN-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-(Y<sup>1</sup>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)<sub>c</sub>-O-CO-C(R<sup>7</sup>)=CH<sub>2</sub>

[donde j, Y<sup>1</sup>, c, p R<sup>7</sup> y 1 son como se han definido anteriormente en el presente documento].

- 15        En la presente invención, "alquilo C<sub>1-6</sub>" significa alquilo de cadena lineal o ramificada que contiene de 1 a 6 átomos de carbono y los ejemplos incluyen "alquilo C<sub>1-4</sub>", tal como metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, n-butilo, s-butilo, i-butilo, y t-butilo, así como n-pentilo, 3-metilbutilo, 2-metilbutilo, 1-metilbutilo, 1-etilpropilo, n-hexilo, 4-metilpentilo, 3-metilpentilo, 2-metilpentilo, 1-metilpentilo, 3-etilbutilo, y 2-etilbutilo.

- 20        En la presente invención, "alquilcarbonilo C<sub>1-6</sub>" significa alquilcarbonilo que tiene alquilo de cadena lineal o de cadena ramificada, que contiene de 1 a 6 átomos de carbono, y los ejemplos incluyen, pero sin limitación, acetilo, propionilo, butirilo, isobutirilo, pivaloilo, valerilo, isovalerilo, y hexanoilo.

- 25        En la presente invención, "arilo" significa un grupo carbocíclico aromático, tal como un grupo carboxicíclico aromático que contiene de 6 a 14 átomos de carbono, y los ejemplos de arilo incluyen, pero sin limitación, fenilo y naftilo (1-naftilo, 2-naftilo y 3-naftilo).

En la presente invención, "cicloalquilo C<sub>3-8</sub>" significa alquilo cíclico que contiene de 3 a 8 átomos de carbono y los ejemplos incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo y ciclooctilo.

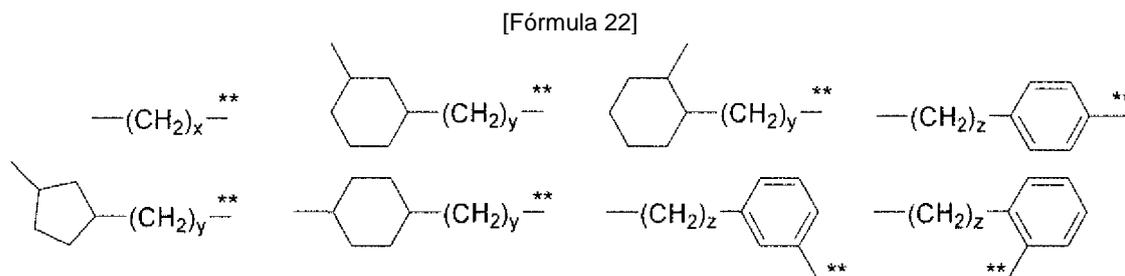
- 30        En la presente invención, "cicloalquilenos C<sub>3-8</sub>" significa alquilo cíclico divalente que contiene de 3 a 8 átomos de carbono y los ejemplos incluyen ciclopropileno, ciclobutileno, ciclopentileno, ciclohexileno, cicloheptileno, y ciclooctileno. Ejemplos más específicos incluyen, pero sin limitación, 1,1-ciclohexileno, 1,2-ciclohexileno, 1,3-ciclohexileno, 1,4-ciclohexileno, 1,1-ciclopentileno, 1,2-ciclopentileno, 1,3-ciclopentileno, 1,1-ciclobutileno, 1,2-ciclobutileno, y 1,3-ciclobutileno. Entre los ejemplos preferentes se incluyen 1,1-ciclohexileno, 1,2-ciclohexileno, 1,4-ciclohexileno, y 1,1-ciclobutileno.

En la presente invención, "fenileno" significa un grupo divalente donde dos átomos de hidrógeno en benceno están sustituidos y los ejemplos incluyen benceno-1,2-diilo, benceno-1,3-diilo y benceno-1,4-diilo.

- 40        En la presente invención, "alquilenos C<sub>1-10</sub>" significa un grupo alquilenos de cadena lineal o de cadena ramificada que contiene de 1 a 10 átomos de carbono y los ejemplos incluyen metileno, etano-1,2-diilo, propano-1,3-diilo, butano-1,4-diilo, pentano-1,5-diilo, hexano-1,6-diilo, heptano-1,7-diilo, octano-1,8-diilo, nonano-1,9-diilo, decano-1,10-diilo, propano-1,2-diilo, 2-metil-propano-1,3-diilo, butano-2,4-diilo, 3-metilbutano-1,4-diilo, 2-metilpentano-1,5-diilo, 4-etilhexano-1,6-diilo, 4-metil-heptano-2,7-diilo, 5-etiloctano-1,8-diilo, y 6-metilnonano-1,9-diilo.

- 45        En la presente invención, "alquilenos C<sub>1-10</sub> e tiene de uno a tres cicloalquilenos C<sub>3-8</sub> o fenilenos insertados en el mismo" significa un grupo alquilenos C<sub>1-10</sub> donde de uno a tres, preferentemente uno, fenileno(s) o cicloalquilenos C<sub>3-8</sub> está(están) insertados.

- 50        Ejemplos preferentes de G<sup>d</sup> incluyen, pero sin limitación, fenileno o los grupos representados por las siguientes fórmulas:



- 55        (donde x es un número entero seleccionado de 1 a 10, y es un número entero seleccionado de 1 a 6, z es un número entero seleccionado de 1 a 5, y "\*" representa una posición de enlace a X<sup>c</sup>).

En la presente invención, "átomo de halógeno" significa un átomo de flúor, un átomo de cloro, un átomo de bromo, o un átomo de yodo. Cuando X<sup>c</sup> es un átomo de halógeno, se prefieren un átomo de cloro, un átomo de bromo y un átomo de yodo, y, desde el punto de vista de la reactividad con mercapto en un fármaco, se prefieren un átomo de bromo y un átomo de yodo.

5 En la presente invención, "el transportador de fármaco es biodegradable" significa que el transportador de fármaco detectado en una orina se ha reducido en cuanto al peso molecular hasta que han transcurrido dos semanas después de la inyección intravenosa a una rata y/o a un ser humano.

10 En la presente invención, "intracelular" significa el interior de la membrana celular, incluyendo el endosoma y el núcleo celular.

En la presente invención, "intracitoplasmático" o "dentro del citoplasma" significa el interior de la membrana celular que excluye el endosoma y el núcleo celular.

15 En la presente invención, "endosoma significa una vesícula compuesta por una biomembrana, que se forma en el proceso de absorción de una sustancia por una célula y una vesícula formada por fusión de dicha vesícula con el lisosoma.

20 Se puede juzgar el "peso molecular reducido" determinando el tamaño de un transportador de fármaco excretado en una orina por cromatografía de exclusión por tamaño (véase el Ejemplo 3-3 en esta memoria descriptiva). Si la parte superior del pico del transportador de fármaco derivado de la orina como se observa en cualquier momento, hasta dos semanas después del tratamiento o durante un periodo de 24 horas se desplaza al lado de bajo peso molecular en comparación con el del transportador de fármaco derivado de la orina recogida en un punto de tiempo previo o durante un período previo (en otras palabras, el tiempo de retención en el cromatograma se hace más largo), entonces se considera que el transportador de fármaco es biodegradable.

El derivado de ácido hialurónico de la presente invención que comprende una o más unidades de disacárido representadas por la Fórmula (I) se sintetiza típicamente usando, como material de partida, ácido hialurónico o un derivado del mismo que está compuesto sustancialmente por unidades de disacárido representadas por la Fórmula (II), más preferentemente ácido hialurónico (incluyendo una sal del mismo) que está compuesto exclusivamente por unidades de disacárido representadas cada una por la Fórmula (II). En un aspecto de la presente invención, el peso molecular promedio en peso del ácido hialurónico a utilizar como material de partida está en el intervalo de 20-120 kilodalton y, preferentemente, en el intervalo de 20-30 y 50-120 kilodalton. El peso molecular promedio en peso preferente se ilustra por 25 kilodalton y 99 kilodalton. Desde el punto de vista de la permanencia mejorada en la sangre, es suficiente como mínimo 5 kilodalton como límite inferior del peso molecular promedio en peso, y es, preferentemente, al menos 50 kilodalton y, más preferentemente, al menos 99 kilodalton. El límite superior del peso molecular promedio en peso es, preferentemente no mayor de 250 kilodalton. El peso molecular promedio en peso preferente desde el punto de vista de la biodegradabilidad está en el intervalo de 50-120 kilodalton, por ejemplo 99 kilodalton, y el peso molecular promedio en peso desde el punto de vista de la migración intracitoplasmática está en el intervalo de 20-120 kilodalton, por ejemplo 25 kilodalton y 99 kilodalton.

Como se hace referencia en el presente documento, el peso molecular promedio en peso que varía de 20 a 120 kilodalton del ácido hialurónico (incluyendo una sal del mismo) que está compuesto exclusivamente por unidades de disacárido representadas cada una por la Fórmula (II) y usado como material de partida significa un peso molecular promedio en peso calculado sobre la suposición de que en la fórmula (II), R<sup>1a</sup>, R<sup>2a</sup>, R<sup>3a</sup>, y R<sup>4a</sup> son todos átomos de hidrógeno, R<sup>3a</sup> es acetilo y X<sup>a</sup> es -O<sup>-</sup>Na<sup>+</sup>, manteniéndose la estructura principal del derivado de ácido hialurónico de la presente invención. Por lo tanto, incluso en el caso en que algunas o todas las unidades de disacárido en un material de partida realmente usadas tienen -O<sup>-</sup>(ion tetra-n-butilamonio) como X<sup>a</sup> y, por lo tanto, el material de partida tiene un peso molecular promedio en peso de 400 kilodalton, el material de partida se incluirá como una realización preferida de la presente invención, siempre que tenga un peso molecular promedio en peso de 20-120 kilodalton, calculado de acuerdo con la suposición mencionada anteriormente.

Con el fin de determinar el peso molecular promedio en peso de HA, se pueden usar diversos métodos conocidos, incluidos el método de dispersión de la luz, osmometría y viscosimetría, como se divulga típicamente en Seiichi Nakahama, et al., *Essential Polymer Science* (publicado por Kodansha Ltd., ISBN4-06-153310-X). Tal como se indica en el presente documento, los pesos moleculares promedio en peso determinados por el método de dispersión de la luz se pueden determinar mediante un procedimiento utilizado habitualmente en el campo técnico al que pertenece la presente invención, por ejemplo, usando un detector de dispersión de luz láser de ángulo múltiple acoplado con un analizador cromatográfico de exclusión por tamaño (SEC-MALLS).

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, el derivado de ácido hialurónico de la presente invención se puede preparar usando, como material de partida, el ácido hialurónico (incluyendo una sal del mismo) que está compuesto exclusivamente por unidades de disacárido representadas por la Fórmula (II), que tiene un peso molecular promedio en peso no superior a 500 kilodalton, preferentemente no superior a 250 kilodalton. En una realización de la presente invención, el derivado de ácido hialurónico de la presente invención es un derivado de

ácido hialurónico compuesto sustancialmente por unidades de disacárido de las Fórmulas (I) y (II).

El derivado de ácido hialurónico de la presente invención que comprende unidades DE disacárido representadas por la fórmula (I) se puede preparar amidando carboxi en su resto de ácido glucurónico. Un proceso de preparación de ejemplo es el siguiente: ácido hialurónico (incluyendo una sal del mismo) como material de partida, preferentemente ácido hialurónico compuesto exclusivamente por unidades de disacárido representadas cada una por la Fórmula (II), se convierte en una sal de tetrametilamonio (por ejemplo, sal de tetrabutilamonio (TBA)) del mismo a través de intercambio iónico y la sal de ácido hialurónico resultante se hace reaccionar con un compuesto representado por la fórmula  $\text{HNR}^x\text{-A-B-COOR}^z$  (donde  $\text{R}^z$  es un grupo que forma un éster para la protección del carboxi, y  $\text{R}^x$ , A y B son como se han definido anteriormente en el presente documento) o la fórmula  $\text{HNR}^x\text{-A-CONR}^{ya}\text{R}^{yb}$  en un disolvente en presencia de un agente de condensación adecuado, y la desprotección se realiza si hay algún grupo protector presente. Como se hace referencia en el presente documento, el grupo que forma el éster no está particularmente limitado, siempre que sea un grupo de uso habitual para la protección del carboxi. Ejemplos del grupo que forma el éster incluyen alquilo  $\text{C}_{1-6}$ , bencilo, alcoxi  $\text{C}_{1-6}$  alquilo  $\text{C}_{1-6}$  y benciloxi alquilo  $\text{C}_{1-6}$ .

En la Fórmula (I), los grupos  $\text{-NR}^x\text{-A-B-COOR}^z$  y  $\text{-NR}^x\text{-A-CONR}^{ya}\text{R}^{yb}$  pueden ser iguales o diferentes para dos o más unidades de disacárido respectivas presentes. Por ejemplo, la reacción anterior puede realizarse también utilizando diferentes tipos de compuestos representados por las fórmulas:  $\text{HNR}^x\text{-A-B-COOR}^z$  y/o  $\text{HNR}^x\text{-A-CONR}^{ya}\text{R}^{yb}$ .

El agente de condensación que se puede usar en la reacción anterior no está particularmente limitado y los ejemplos incluyen, pero sin limitación, 4-(4,6-dimetoxi-1,3,5-triazina)-4-metilmorfolinio (DMT-MM), N,N'-carbonildiimidazol (CDI), N,N'-diciclohexil- carbodiimida (DCC), N-etoxicarbonil-2-etoxi-1,2-dihidroquinolina (EEDQ), tetrafluoroborato de 2-benzotriazol-1,1,3,3-tetrametiluronio (TBTU), 3,4-dihidro-3-hidroxi-4-oxo-1,2,3-benzotriazina (HODhbt), hexafluorofosfato de benzotriazol-1-oxi-tris- pirrolidino-fosfonio (PyBOP), hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxi-tris(dimetilamino)fosfonio (BOP), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) o N-hidroxisuccinimida (NHS).

Aunque no está particularmente limitado, se prefiere el DMT-MM porque la reacción prosigue con una alta eficiencia, incluso en un disolvente mixto de agua y un disolvente orgánico. Asimismo, usando DMT-MM como agente de condensación, se puede realizar amidación altamente selectiva con amino y carboxi mientras se reduce la esterificación, en un sistema donde coexisten muchos grupos hidroxilo. El uso de este agente de condensación puede impedir, por ejemplo, la reacción de un alcohol como disolvente con carboxi en el resto de ácido hialurónico y la reticulación indeseada causada por uniones intramoleculares o intermoleculares entre carboxi e hidroxilo coexistentes en el resto de ácido hialurónico.

El disolvente usado en la reacción anterior se puede ejemplificar mediante agua, dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilformamida (DMF), dimetilacetamida (DMAC), 1,3-dimetil-2-imidazolidinona (DMI), sulfolan (SF), N-metilpirrolidona (NMP), dioxano (por ejemplo, 1,4-dioxano), metanol, etanol, propanol, butanol, acetonitrilo, tetrahidrofurano, diclorometano, cloroformo, hexano, éter dietílico, acetato de etilo, y disolventes mixtos de los mismos. Desde el punto de vista de la solubilidad de los materiales de partida, los modificadores y productos y la reactividad de los agentes de condensación, se prefiere usar DMSO solo o usar un disolvente mixto de agua/DMSO. Dependiendo del tipo de ácido amino-carboxílico como modificador, también puede usarse en la reacción como una solución de metanol o una solución de dioxano.

El compuesto representado por la fórmula  $\text{HNR}^x\text{-A-B-COOR}^z$  se ilustra mediante éster de alanina, éster de serina, diéster de ácido glutámico, éster de glicina, éster de valina, éster de leucina, éster de isoleucina, éster de treonina, diéster de ácido aspártico, éster de ácido cis-2-amino-1-ciclohexilcarboxílico, éster de ácido trans-2-amino-1-ciclohexilcarboxílico, éster de ácido 2-aminoisobutírico, éster de ácido 1-amino-1-ciclobutírico, éster de ácido 1-aminometil-1-ciclohexanoico, éster de ácido cis-4-aminociclohexanoico, éster de L-2-naftilalanina, éster de ácido 2-aminofenilbutírico, éster de ciclohexil-L-alanina, y éster de ácido 4-aminometilbenzoico. Ejemplos de los ésteres anteriores incluyen, pero sin limitación, éster de alquilo  $\text{C}_{1-6}$ , éster de arilo, éster de alcoxi  $\text{C}_{1-6}$  alquilo  $\text{C}_{1-6}$ , y éster de alquilarilo  $\text{C}_{1-6}$ , siendo preferentes éster metílico, éster etílico, éster bencilico y similares.

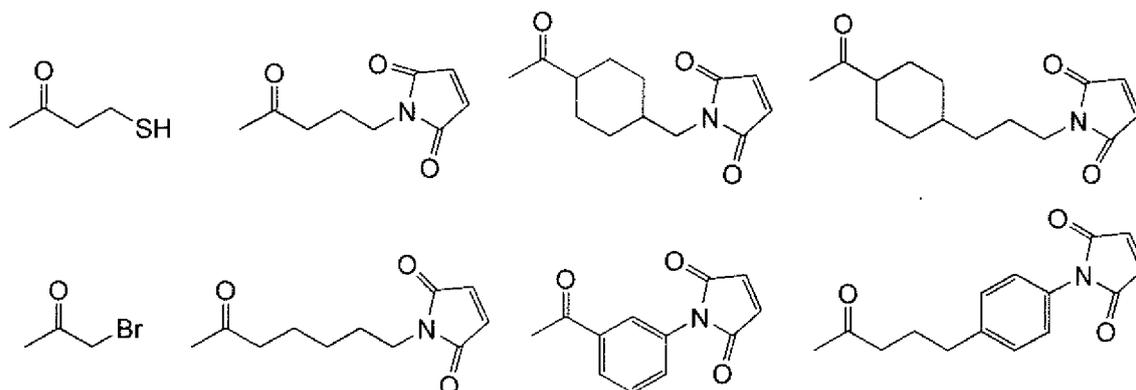
El compuesto representado por la fórmula  $\text{HNR}^x\text{-A-CONR}^{ya}\text{R}^{yb}$  se ilustra mediante alaninamida, asparaginamida, amida de ácido aspártico, glutaminamida, amida de ácido glutámico, glicinamida, isoleucinamida, leucinamida, fenilalaninamida, serinamida, treoninamida, tirosinamida, y valinamida.

El proceso para preparar el derivado de ácido hialurónico de la presente invención que comprende unidades de disacárido representadas por la fórmula (I) donde X es  $\text{-NHCH}_3$  o  $\text{-NH(CH}_2)_2\text{CH}_3$  se ilustra mediante un proceso por el cual la sal de tetrabutilamonio anterior del ácido hialurónico se hace reaccionar con un compuesto representado por  $\text{NH}_2\text{CH}_3$  o  $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$  en un disolvente en presencia de un agente de condensación adecuado. En esta reacción se puede usar un agente de condensación y un disolvente como se ha divulgado anteriormente en el presente documento. El grado de modificación con cada amina se puede ajustar, por ejemplo, controlando el número de equivalentes del agente de condensación y/o la amina con respecto a la unidad de HA, la temperatura de reacción y/o el tiempo de reacción.

El proceso para preparar el derivado de ácido hialurónico de la presente invención que comprende unidades de

disacárido representadas por la Fórmula (III) se ilustra mediante un proceso por el cual la sal de tetrabutilamonio de ácido hialurónico anterior se hace reaccionar con un compuesto representado por la fórmula  $\text{HNR}^e\text{-Y}^b\text{-R}^w$  (donde  $\text{R}^w$  es un átomo de hidrógeno, alquilo  $\text{C}_{1-6}$ ,  $-\text{CO-C}(\text{R}^7)=\text{CH}_2$ ,  $-\text{CO-G}^4\text{-X}^c$ , un grupo protector de hidroxilo, un grupo protector de amino, o un grupo protector de mercapto, y  $\text{R}^e$ ,  $\text{Y}^b$ ,  $\text{R}^7$ ,  $\text{G}^4$ , y  $\text{X}^c$  son como se han definido anteriormente en el presente documento) en un disolvente en presencia de un agente de condensación adecuado, y la desprotección se realiza si hay algún grupo protector presente. En esta reacción se puede usar un agente de condensación y un disolvente como se ha divulgado anteriormente en el presente documento.

Ejemplos específicos de  $-\text{CO-G}^4\text{-X}^c$  incluyen los grupos representados por las fórmulas siguientes:



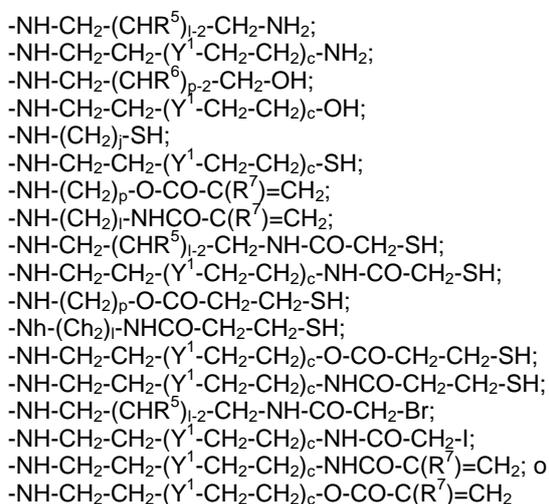
Ejemplos específicos del grupo protector usado en la reacción anterior se divulgan, típicamente, en T. W. Greene, P. G. M. Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, Tercera edición, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1999.

Ejemplos del grupo protector de hidroxilo incluyen alquylcarbonilo  $\text{C}_{1-6}$ , arilcarbonilo, heteroarilcarbonilo, alcoxicarbonilo  $\text{C}_{1-6}$ , alcoxi  $\text{C}_{1-6}$  alquilo  $\text{C}_{1-6}$  alquilaminocarbonilo  $\text{C}_{1-6}$ , di(alquilo  $\text{C}_{1-6}$ )aminocarbonilo, arilalquilo  $\text{C}_{1-6}$ , heteroarilalquilo  $\text{C}_{1-6}$ , arilalquilo  $\text{C}_{1-6}$  aminocarbonilo, alquilo  $\text{C}_{1-6}$ , alquilsulfonilo  $\text{C}_{1-6}$ , ((aminoalquilo  $\text{C}_{1-6}$ )carboniloxi)alquilo  $\text{C}_{1-6}$ , alquilo  $\text{C}_{1-6}$  carboniloxi heterocíclico insaturado, di(alquilo  $\text{C}_{1-6}$ )sililarilo, y tri(alquilo  $\text{C}_{1-6}$ )sililo. El grupo protector de hidroxilo preferente se ilustra mediante acetilo.

Ejemplos de  $-\text{NH}-$  o del grupo protector de amino incluyen, pero sin limitación, alquylcarbonilo  $\text{C}_{1-6}$ , arilalquylcarbonilo  $\text{C}_{1-6}$ , arilcarbonilo, heteroarilcarbonilo, alcoxicarbonilo  $\text{C}_{1-6}$ , alquilaminocarbonilo  $\text{C}_{1-6}$ , di(alquilo  $\text{C}_{1-6}$ )aminocarbonilo, arilalquilo  $\text{C}_{1-6}$ , heteroarilalquilo  $\text{C}_{1-6}$ , y (arilalquilo  $\text{C}_{1-6}$ )aminocarbonilo. El grupo protector de amino preferente se ilustra mediante acetilo, t-butoxicarbonilo, y 9-fluorenilmetoxicarbonilo. El amino puede protegerse para formar un grupo heterocíclico saturado o insaturado, tal como imida de ácido ftálico, imida de ácido succínico, imida de ácido glutárico y 1-pirrolilo.

El grupo protector de mercapto se ilustra mediante alquiltio  $\text{C}_{1-6}$ , tal como etiltio y t-butiltio; feniltio sustituido, tal como 2-nitrofeniltio y 2-carboxifeniltio; y heteroariltio, tal como 2-piridiltio. Un ejemplo preferente es 2-piridiltio.

Ejemplos del grupo representado por  $-\text{NR}^e\text{-Y}^b\text{-R}^d$  en la fórmula (III) como se ha mencionado anteriormente incluyen el grupo representado por la siguiente fórmula:



[donde R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup>, R<sup>7</sup>, Y<sup>1</sup>, c, j, 1 y p son como se definen en el presente documento].

5 En estas fórmulas, los números respectivos de CHR<sup>5</sup> y CHR<sup>6</sup>, donde R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> son hidroxilo, que están contenidos en una molécula del derivado del ácido hialurónico, están en el intervalo de 0 a 8, respectivamente, preferentemente en el intervalo de 0 a 3, y, más preferentemente, 0 o 1. La solubilidad en agua del derivado de ácido hialurónico de la presente invención se puede ajustar controlando los números de CHR<sup>5</sup> y CHR<sup>6</sup>, donde R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> son hidroxilo. Cuando todos los R<sup>5</sup> son átomos de hidrógeno, 1 está, preferentemente, en el intervalo de 2 a 6, y se ilustra específicamente por 2 y 6. Cuando uno de R<sup>5</sup> es hidroxilo, 1 se ilustra específicamente por 3. Cuando Y<sup>1</sup> es un átomo de oxígeno, c se ilustra específicamente por 2. Cuando Y<sup>1</sup> es -NH-, c se ilustra específicamente por 1 a 3. 1 y p se ilustran específicamente por 3.

Ejemplos específicos de -(CH<sub>2</sub>)<sub>a</sub>-(Y<sup>1</sup>-(CH<sub>2</sub>)<sub>b</sub>)C-G- incluyen, pero sin limitación,

15 -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-(O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)<sub>c</sub>-O-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-(O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)<sub>c</sub>-NH-,  
 -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-(O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)<sub>c</sub>-O-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-(O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)<sub>c</sub>-NH-,  
 -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NR<sup>n</sup>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NR<sup>n</sup>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NH-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-NR<sup>n</sup>-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-O-,  
 -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-NR<sup>n</sup>-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-NH-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-NR<sup>n</sup>-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-O-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-NR<sup>n</sup>-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-NH-,  
 20 -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-NR<sup>n</sup>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NR<sup>n</sup>-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-O-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-NR<sup>n</sup>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NR<sup>n</sup>-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-NH-,  
 -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-NR<sup>n</sup>-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-NR<sup>n</sup>-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-O-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-NR<sup>n</sup>-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-NR<sup>n</sup>-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-NH-(de tipo espermina),  
 -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NR<sup>n</sup>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NR<sup>n</sup>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NR<sup>n</sup>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-,  
 -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NR<sup>n</sup>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NR<sup>n</sup>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NR<sup>n</sup>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NH-,  
 -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NR<sup>n</sup>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NR<sup>n</sup>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NR<sup>n</sup>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NR<sup>n</sup>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-, y  
 25 -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NR<sup>n</sup>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NR<sup>n</sup>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NR<sup>n</sup>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NR<sup>n</sup>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NH-. En estas fórmulas, se prefiere que todos los R<sup>n</sup> sean átomos de hidrógeno.

Ejemplos específicos de R<sup>d</sup> que está unido a cualquiera de estos ejemplos de

30 -(CH<sub>2</sub>)<sub>a</sub>-(Y<sup>1</sup>-(CH<sub>2</sub>)<sub>b</sub>)<sub>c</sub>-G- incluyen, pero sin limitación, un átomo de hidrógeno, -CO-CH=CH<sub>2</sub>, -CO-C(CH<sub>3</sub>)=CH<sub>2</sub>, -CO-CH<sub>2</sub>-Cl, -CO-CH<sub>2</sub>-Br, -CO-CH<sub>2</sub>-I, -CO-CH<sub>2</sub>-SH, y  
 -CO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-SH.

Ejemplos específicos del grupo representado por -NR<sup>e</sup>-Y<sup>b</sup>-R<sup>d</sup> incluyen, pero sin limitación,

35 -NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-N(-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-NHCOCH<sub>3</sub>)-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-SH,  
 -NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-N(-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-NHCOCH<sub>3</sub>)-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-SH, y  
 -NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-N(-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NHCOCH<sub>3</sub>)-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-SH.

El proceso para preparar el derivado de ácido hialurónico de la presente invención que comprende unidades de

40 disacárido representadas por la Fórmula (III) se ilustra mediante un proceso mediante el cual se hace reaccionar el carboxilo (-COOH) en el resto de ácido glucurónico de ácido hialurónico con una diamina representada por la fórmula H<sub>2</sub>N-CH<sub>2</sub>-(CHR<sup>5</sup>)<sub>1-2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> para convertirlo en una amida representada por la fórmula -CONH-CH<sub>2</sub>-(CHR<sup>5</sup>)<sub>1-2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>, y después se modifica el amino terminal para convertir dicha amida en una amida representada por el grupo -CONH-CH<sub>2</sub>-(CHR<sup>5</sup>)<sub>1-2</sub>-CH<sub>2</sub>-NHR<sup>d</sup>.

45 Ejemplos específicos de la diamina anterior incluyen, pero sin limitación, H<sub>2</sub>N-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>N-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-NH<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>N-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>N-(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-NH<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>N-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-NH<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>N-(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>-NH<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>N-(CH<sub>2</sub>)<sub>8</sub>-NH<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>N-(CH<sub>2</sub>)<sub>9</sub>-NH<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>N-(CH<sub>2</sub>)<sub>10</sub>-NH<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>N-CH<sub>2</sub>-CHOH-CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>N-CH<sub>2</sub>-CHOH-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>N-CH<sub>2</sub>-(CHOH)<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>N-CH<sub>2</sub>-CHOH-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-NH<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>N-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-CHOH-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>N-CH<sub>2</sub>-(CHOH)<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>N-(CH<sub>2</sub>-CHOH)<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>N-CH<sub>2</sub>-(CHOH)<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>N-CH<sub>2</sub>-CHOH-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>N-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-CHOH-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-NH<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>N-CH<sub>2</sub>-(CHOH)<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-NH<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>N-CH<sub>2</sub>-CHOH-CH<sub>2</sub>-CHOH-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>N-CH<sub>2</sub>-CHOH-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-CHOH-CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>N-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-(CHOH)<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>N-CH<sub>2</sub>-(CHOH)<sub>3</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>N-CH<sub>2</sub>-(CHOH)<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CHOH-CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>N-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-CHOH-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>N-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-CHOH-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub>, y H<sub>2</sub>N-(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-CHOH-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub>.

El proceso para preparar el derivado de ácido hialurónico de la presente invención que comprende unidades de

55 disacárido representadas por la Fórmula (III) se ilustra mediante un proceso mediante el cual se hace reaccionar el carboxilo (-COOH) en el resto de ácido glucurónico de ácido hialurónico con una hidroxiamina representada por la fórmula H<sub>2</sub>N-CH<sub>2</sub>-(CHR<sup>5</sup>)<sub>p-2</sub>-CH<sub>2</sub>-OH para convertirlo en una amida representada por la fórmula -CONH-CH<sub>2</sub>-(CHR<sup>5</sup>)<sub>p-2</sub>-CH<sub>2</sub>-OH, y después se modifica el amino terminal para convertir dicha amida en una amida representada por el grupo -CONH-CH<sub>2</sub>-(CHR<sup>5</sup>)<sub>p-2</sub>-CH<sub>2</sub>-OR<sup>d</sup>.

60 Ejemplos específicos de la hidroxilamina anterior incluyen, pero sin limitación, H<sub>2</sub>N-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-OH, H<sub>2</sub>N-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-OH, H<sub>2</sub>N-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-OH, H<sub>2</sub>N-(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-OH, H<sub>2</sub>N-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-OH, H<sub>2</sub>N-(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>-OH, H<sub>2</sub>N-(CH<sub>2</sub>)<sub>8</sub>-OH, H<sub>2</sub>N-(CH<sub>2</sub>)<sub>9</sub>-OH, H<sub>2</sub>N-(CH<sub>2</sub>)<sub>10</sub>-OH, H<sub>2</sub>N-CH<sub>2</sub>-CHOH-CH<sub>2</sub>-OH, H<sub>2</sub>N-CH<sub>2</sub>-CHOH-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-OH, H<sub>2</sub>N-CH<sub>2</sub>-(CHOH)<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-OH, H<sub>2</sub>N-CH<sub>2</sub>-CHOH-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-OH, H<sub>2</sub>N-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-CHOH-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-OH, H<sub>2</sub>N-CH<sub>2</sub>-(CHOH)<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-OH, H<sub>2</sub>N-(CH<sub>2</sub>-CHOH)<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-OH, H<sub>2</sub>N-CH<sub>2</sub>-(CHOH)<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-OH, H<sub>2</sub>N-CH<sub>2</sub>-CHOH-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-OH, H<sub>2</sub>N-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-CHOH-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-OH, H<sub>2</sub>N-CH<sub>2</sub>-(CHOH)<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-OH, H<sub>2</sub>N-CH<sub>2</sub>-CHOH-CH<sub>2</sub>-CHOH-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-OH, H<sub>2</sub>N-CH<sub>2</sub>-CHOH-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-CHOH-CH<sub>2</sub>-OH, H<sub>2</sub>N-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-(CHOH)<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-OH, H<sub>2</sub>N-CH<sub>2</sub>-(CHOH)<sub>3</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-OH, H<sub>2</sub>N-CH<sub>2</sub>-(CHOH)<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CHOH-CH<sub>2</sub>-OH, H<sub>2</sub>N-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-CHOH-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-OH, H<sub>2</sub>N-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-CHOH-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-OH,

$H_2N-(CH_2)_2-CHOH-(CH_2)_6-OH$ , y  $H_2N-(CH_2)_5-CHOH-(CH_2)_4-OH$ .

Estos compuestos están típicamente disponibles comercialmente en Sigma-Aldrich y pueden adquirirse para su uso según sea apropiado. Como alternativa, también pueden sintetizarse siguiendo un método publicado o utilizando dicho método como referencia.

En la Fórmula (III), el grupo  $-NR^e-Y^b-R^d$  puede el mismo o diferente para dos o más unidades de disacárido respectivas presentes. Por ejemplo, la reacción anterior también puede llevarse a cabo usando diferentes tipos del compuesto representado por la fórmula  $HNR^e-Y^b-R^d$ .

Cuando X en la Fórmula (I) es  $-NR^x-A-B-COOR^y$ ,  $X^b$  puede estar presente en la posición indicada en la unidad de disacárido representada por la Fórmula (III) o, como alternativa, algunos o todos  $X^{b'}$  pueden estar sustituidos con  $-OR^y$ , de forma que X puede ser  $-NR^x-A-B-CO-X^b$ .

En un aspecto de la presente invención, un ácido hialurónico no derivatizado correspondiente al derivado de ácido hialurónico de la presente invención en términos de la estructura principal tiene un peso molecular promedio en peso de 20-120 kilodalton. Dicho ácido hialurónico no derivatizado (incluyendo una sal del mismo) es ácido hialurónico compuesto exclusivamente por unidades de disacárido de fórmula (II), donde  $R^{1a}$ ,  $R^{2a}$ ,  $R^{3a}$  y  $R^{4a}$  son átomos de hidrógeno,  $R^{8a}$  es acetilo y  $X^a$  es  $-ONa^+$ .

Dado que dicho ácido hialurónico no derivatizado corresponde al derivado de ácido hialurónico de la presente invención en términos de estructura principal, el número de unidades de disacárido presentes en dicho ácido hialurónico no derivatizado coincide con el del derivado de ácido hialurónico de la presente invención. El derivado de ácido hialurónico en este aspecto se puede preparar usando, como material de partida, ácido hialurónico que tiene un peso molecular promedio en peso de 20-120 kilodalton o una sal de sodio del mismo.

En un aspecto de la presente invención, la proporción de las unidades de disacárido de Fórmula (II) con respecto a las unidades de disacárido presentes es, preferentemente, no superior al 50 %, más preferentemente no superior al 30 %, e incluso más preferentemente no superior al 20 %. El límite inferior de la proporción puede ser cualquier valor no inferior a 0 %. En este aspecto, al menos el 50 % de los grupos carboxi ( $-COOH$ ) en el derivado de ácido hialurónico se convierte en los grupos de  $-CONHCH_3$ ,  $-CONH(CH_2)_2CH_3$ ,  $-CONR^x-A-B-COOR^y$ ,  $-CONR^x-A-CO-NR^{ya}R^{yb}$ , o  $-CONR^e-Y^b-R^d$ .

El derivado de ácido hialurónico que comprende unidades de disacárido de Fórmula (III) que tienen un doble enlace carbono-carbono reactivo puede someterse a una reacción de reticulación con un agente de reticulación que tiene dos o más grupos mercapto (por ejemplo ditiotreitól (DTT), butanoditiol, o polietilenglicol ditiol). Asimismo, el derivado de ácido hialurónico que comprende unidades de disacárido de Fórmula (III) que tienen un grupo mercapto puede someterse a una reacción de reticulación mediante formación de disulfuro con un agente de reticulación que tiene dos o más grupos mercapto (por ejemplo, ditiotreitól (DTT), butanoditiol, o polietilenglicol ditiol) o a una reacción de reticulación con un agente de reticulación que tiene dos o más enlaces dobles de carbono-carbono reactivos (por ejemplo, divinilsulfona). La realización de una reacción de reticulación permite la gelificación del derivado de ácido hialurónico de la presente invención.

Otras reacciones de reticulación de ejemplo incluyen: reticulación a base de condensación entre un derivado de ácido hialurónico modificado con amino y un agente de reticulación que comprende alquileo  $C_{2-20}$  que tiene un éster succinimidílico o cualquier otro imidoéster en ambos extremos terminales del mismo (por ejemplo, bis[sulfosuccinimidil]suberato ( $BS_3$ ), etilenglicol-bis[sulfosuccinimidil]succinato (Sulfo-EGS), o clorhidrato de dimetiladipimidato (DMA)); reticulación entre un derivado de ácido hialurónico modificado con amino y un agente de reticulación que comprende alquileo  $C_{2-20}$  que tiene formilo en ambos extremos terminales del mismo (por ejemplo, glutaraldehído); reticulación basada en la oxidación de un derivado de ácido hialurónico modificado con mercapto en condiciones de oxidación (por ejemplo, en presencia de tetrionato de sodio (STT)); reticulación basada en la adición de Michael entre un derivado de ácido hialurónico modificado con mercapto y un agente de reticulación que comprende alquileo  $C_{2-20}$  que tiene un enlace insaturado, tal como maleimida (MAL) o metacrilóilo en ambos extremos terminales del mismo (por ejemplo, 1,4-bis- maleimidabutano (BMB), etilendimetacrilato (EDMA)); reticulación basada en la polimerización de radicales entre un derivado de ácido hialurónico modificado con un enlace insaturado, tal como acrilóilo y metacrilóilo y cualquiera de varios iniciadores de la polimerización (por ejemplo, peroxodisulfato de potasio (KPS)/N,N,N',N'-tetrametiletildiamina (TEMED), e Irgacure2959); y reticulación con un agente de condensación (por ejemplo, N,N'-carbonildiimidazol (CDI), N,N'-díciclohexilcarbodiimida (DCC), N-etoxicarbonil-2-etoxi-1,2-dihidroquinolina (EEDQ), cloruro de 4-(4,6-dimetoxi-1,3,5-triazina)-4-metil-morfolinio (DMT-MM), tetrafluoroborato de 2-benzotriazol-1,1,3,3-tetrametiluronio (TBTU), 3,4-dihidro- 3-hidroxi-4-oxo-1,2,3-benzotriazina (HODhbt), hexafluorofosfato de benzotriazol-1-oxi-tris-pirrolidino-fosfonio (PyBOP), hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxi-tris(dimetilamino)fosfonio (BOP), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) o N-hidroxisuccinimida (NHS)) en presencia de un compuesto de diamina (por ejemplo, EDA o 2,2'-(etilendioxi)bis(etilendiamina)). Las reticulaciones mencionadas anteriormente pueden tener lugar en una molécula de derivado de ácido hialurónico o entre diferentes moléculas de derivado de ácido hialurónico.

Supóngase el caso donde el proceso para preparar el derivado de ácido hialurónico de la presente invención que comprende una etapa de condensación de una diamina con carboxi en el resto de ácido glucurónico y solo una porción (por ejemplo, 10 %) de la diamina está unida a un fármaco, de modo que el amino no utilizado permanece en el derivado del ácido hialurónico. A continuación, dicho amino puede tratarse con un anhídrido dicarboxílico, tal como

5 anhídrido succínico, anhídrido maleico, anhídrido glutárico, y anhídrido adípico o puede hacerse reaccionar con ácido dicarboxílico, tal como ácido maleico, ácido glutárico y ácido adípico en presencia de un agente de condensación, de manera que los grupos funcionales terminales se pueden convertir de nuevo en carboxi para eliminar la cationicidad de dicho amino restante o hacer aniónica la carga total. Como alternativa, dicho amino puede tratarse con un anhídrido carboxílico, tal como anhídrido acético y anhídrido benzoico o puede tratarse con un ácido

10 carboxílico, tal como ácido acético y ácido benzoico en presencia de un agente de condensación, de manera que los grupos funcionales terminales se pueden amidar para eliminar la cationicidad de dicho amino restante o hacer no iónica la carga total.

La estructura químicamente reticulada de un gel del derivado de ácido hialurónico de la invención puede comprender también una estructura biodegradable. Aunque lo siguiente no es exhaustivo, los grupos que tienen un enlace éster y metacrilato pueden usarse como un grupo sometido a una reacción de reticulación. Como alternativa, se puede usar un compuesto que tenga un enlace éster, tal como Sulfo-EGS y EDMA, o un compuesto que tiene un espaciador peptídico que se degrada por una enzima en el cuerpo vivo como agente de reticulación. Además, un gel reticulado mediante enlaces disulfuro formado por oxidación de grupos mercapto se degradará en el cuerpo vivo a través de

15 reacción de intercambio de disulfuro o reacción de reducción. La presencia de una estructura reticulada químicamente degradable permite el control de la velocidad de biodegradación del gel del derivado de ácido hialurónico de la invención, permitiendo así también el control de la velocidad de liberación del fármaco.

El derivado de ácido hialurónico de la presente invención se puede usar como vehículo para una composición farmacéutica. En un aspecto de la presente invención, un derivado de ácido hialurónico que comprende unidades de disacárido representadas por la Fórmula (I) y la Fórmula (III) o por la Fórmula (I), la Fórmula (II) y la Fórmula (III) se reticula usando un agente de reticulación para gelificación, de manera que el gel resultante puede usarse como vehículo para encapsular un fármaco (compuesto de bajo peso molecular, proteína, péptido, o ácido nucleico). El fármaco se puede ilustrar mediante lo siguiente.

25

Ejemplos del compuesto de bajo peso molecular incluyen, pero sin limitación, agente carcinostático (por ejemplo, agente alquilante, antimetabolito, alcaloide), agente inmunosupresor, agente antiinflamatorio (por ejemplo, esteroide, agente antiinflamatorio no esteroideo), agente antirreumático y agente antibacteriano (por ejemplo, antibiótico  $\beta$ -lactámico, antibiótico aminoglucósido, antibiótico macrólido, antibiótico tetraciclina, nuevo antibiótico quinolona fármaco sulfa).

30

Ejemplos de la proteína y el péptido incluyen, pero sin limitación, eritropoyetina (EPO) que sirve como fármaco para la anemia y fármaco de protección de órganos, factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) que actúa como fármaco para la neutropenia, interferón- $\alpha$ , - $\beta$ , - $\gamma$ , (INF- $\alpha$ , - $\beta$ , - $\gamma$ ), trombopoyetina (TPO), factor neurotrófico ciliar (CNTF), factor de necrosis tumoral (TNF), proteína de unión al factor de necrosis tumoral (TNFbp), interleucina-10 (IL-10), tirosina quinasa de tipo FMS (Flt-3), hormona de crecimiento (GH), insulina, factor 1 de crecimiento insulinoide (IGF-1), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), antagonista del receptor de interleucina-1 (IL-1ra), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), factor de células madre (SCF), factor de crecimiento y diferenciación de megacariocitos (MGDF), osteoprotegerina (OPG), leptina, hormona paratiroidea (PTH), factor de crecimiento fibroblástico básico (b-FGF), proteína morfogenética ósea (BMP), péptido natriurético auricular (ANP), péptido natriurético cerebral (BNP), péptido natriurético tipo C (CNP), Péptido 1 similar al glucagón (GLP-1), diversos fármacos de sustitución de la enzima, anticuerpo, diacuerpo, minicuerpo, anticuerpo fragmentado y formas químicamente modificadas de los mismos.

35

Ejemplos del ácido nucleico incluyen, pero sin limitación, ADN, ARN, antisentido, decoy, ribozima, ARN pequeño de interferencia, microARN, aptámero de ARN y formas químicamente modificadas de los mismos.

40

Los fármacos preferidos son una proteína, un péptido y un ácido nucleico, y la composición de la invención que comprende una proteína, un péptido y un ácido nucleico puede obtenerse encapsulando estos fármacos.

45

En otro aspecto de la presente invención, se proporciona un conjugado de derivado de ácido hialurónico/fármaco donde uno o más de los fármacos anteriores están conjugados a un derivado de ácido hialurónico que comprende unidades de disacárido representadas por la Fórmula (I). El derivado de ácido hialurónico que puede usarse en una realización de este aspecto es un derivado de ácido hialurónico que comprende unidades de disacárido representadas por la Fórmula (I) y la Fórmula (III) o por la Fórmula (I), Fórmula (II) y Fórmula (III). Por ejemplo, el conjugado de derivado de ácido hialurónico/fármaco puede prepararse conjugando el fármaco a hidroxilo, amino, mercapto o un doble enlace carbono-carbono reactivo (por ejemplo, metacrilato, acrilato), que están presentes en el grupo de  $-NR^e-Y^b-R^d$  en la Fórmula (III). Algunos o todos los grupos de la fórmula  $-NR^e-Y^b-R^d$  que se convierten en  $-NR^x-A-B-CO-NR^e-Y^b-R^d$  pueden estar presentes en la Fórmula (I).

50

Además, puede insertarse, entre el grupo de  $-NR^e-Y^b-R^d$  y un fármaco, un espaciador representado por la fórmula -

55

G<sup>1</sup>-G<sup>2</sup>-G<sup>3</sup>-J-\*\*\*

(donde

"\*\*\*" representa una posición de unión al fármaco;

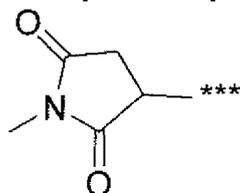
G<sup>1</sup> se selecciona de entre un enlace directo, -C(=O)-, -NR<sup>s</sup>-, y -S-;

5 G<sup>2</sup> se selecciona de entre -(CH<sub>2</sub>)<sub>i</sub>- y -(CH<sub>2</sub>)<sub>q</sub>-(O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub>-;

G<sup>3</sup> se selecciona de entre un enlace directo, -C(=O)-NR<sup>t</sup>-(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>-, y -NR<sup>u</sup>-C(=O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-;

J representa un grupo representado por la fórmula siguiente:

[Fórmula 24]



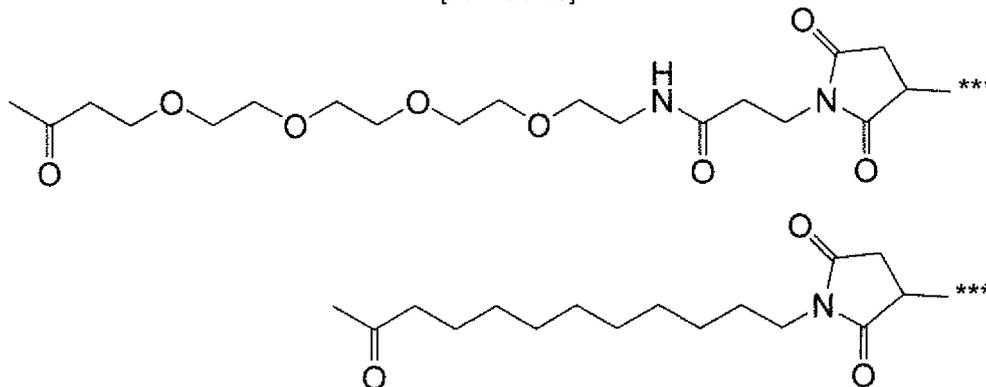
10

R<sup>s</sup>, R<sup>t</sup> y R<sup>u</sup> se seleccionan independientemente entre un átomo de hidrógeno y alquilo C<sub>1-6</sub>, i es un número entero seleccionado de 1 a 10, q es un número entero seleccionado de 2 a 10, k es un número entero seleccionado de 1 a 100 y r y m son independientemente un número entero seleccionado de 1 a 10).

15

Ejemplos específicos de la fórmula -G<sup>1</sup>-G<sup>2</sup>-G<sup>3</sup>-J-\*\*\* incluyen, pero sin limitación, las siguientes fórmulas:

[Fórmula 25]



20

Los grupos hidroxilo en la posición 4 del ácido glucurónico o en la posición 1 de la acetilglucosamina, que están presentes en los extremos terminales de la cadena principal del derivado del ácido hialurónico de la presente invención, pueden convertirse en grupos diferentes, y pueden ser, por ejemplo, alcoxi C<sub>1-6</sub>, formiloxi, y alquilcarboniloxi C<sub>1-6</sub>.

25

Un gel del derivado de ácido hialurónico de la presente invención que tiene un fármaco encapsulado en el mismo o un conjugado entre el derivado de ácido hialurónico de la presente invención y un fármaco puede formularse en una composición farmacéutica que comprende el gel o el conjugado y uno o más aditivos farmacéuticamente aceptables, tales como diluyentes, agentes humectantes, agentes emulsionantes, agentes de dispersión, adyuvantes, agentes antisépticos, agentes tamponadores, agentes aglutinantes, agentes estabilizantes, de manera que la composición puede administrarse en cualquier forma de dosificación apropiada dependiendo de la vía de administración deseada. La vía de administración puede ser una vía parenteral u oral.

30

La presente invención hace posible conseguir una liberación sostenida prolongada de fármacos tales como proteínas, péptidos, ácidos nucleicos y compuestos de bajo peso molecular, lo que no se ha logrado mediante formulaciones convencionales de liberación sostenida, así como proporcionar formulaciones de liberación sostenida y composiciones farmacéuticas que tienen una biodegradabilidad y seguridad adecuadas. Esta invención también hace posible proporcionar formulaciones farmacéuticas y composiciones que permitan una captación efectiva de los fármacos en el citoplasma, porque en la ruta de captación intracelular de fármacos endocitados, el derivado de ácido hialurónico de la presente invención tiene una acción promotora sobre la liberación de los fármacos desde el endosoma al citoplasma.

40

### Ejemplos

45 La presente invención se describió a continuación usando realizaciones adecuadas específicas de la misma como ejemplos de trabajo.

Como se usa en el presente documento a continuación, "unidad de HA" significa una unidad repetitiva de ácido N-acetilglucosamina-glucurónico en ácido hialurónico. El análisis de RMN se realizó usando un espectrómetro de resonancia magnética nuclear (JNM-ECA500; JEOL, Ltd.). Las condiciones de análisis de RMN son las siguientes.

5 Condiciones de análisis de RMN de  $^1\text{H}$  RMN

Punto de datos: 16384

Anchura del espectro (barrido en X): 15 ppm

10 Tiempo de adquisición (tiempo de adq. X): 1.749 s

Retraso del pulso (retraso de relajación): 30 s

Temporales (barridos): 64

### 15 [Ejemplo 1] Síntesis de derivados de ácido hialurónico

#### (Ejemplo 1-1) Conversión de una resina de intercambio catiónico en sal de tetrabutilamonio (TBA)

Se suspendió DOWEX™ 50WX-8-400 (Sigma-Aldrich) en agua ultrapura y la resina se lavó con agua ultrapura aproximadamente tres veces por decantación. Se añadió una solución acuosa de 40 % en peso de hidróxido de tetrabutilamonio (TBA-OH) (Sigma-Aldrich) en una cantidad de aproximadamente 1,5 equivalentes molares calculada para la capacidad del intercambio catiónico de la resina, y se realizó agitación durante 30 minutos. Después de la retirada de la solución en exceso de TBA-OH mediante decantación, se repitió más lavado con exceso de agua ultrapura y, por último, la mezcla se pasó a través de un filtro de 0,45  $\mu\text{m}$ , de modo que se obtuvo una resina de intercambio catiónico convertida en una sal de TBA.

25

#### (Ejemplo 1-2) Preparación de una sal de TBA de ácido hialurónico (HA-TBA)

Las sales de sodio de ácido hialurónico (HA-Na, Shiseido Co., Ltd.) con pesos moleculares de 25 kDa y 99 kDa se disolvieron cada una en agua ultrapura a una concentración de 15 mg/ ml. La resina de intercambio catiónico convertida en una sal de TBA en el Ejemplo 1-1 se añadió en una cantidad de 5 equivalentes molares con respecto al número de moles de la unidad de HA (peso molecular de la unidad, 401,3) calculado para la capacidad de intercambio iónico de la resina. Después de agitar durante 15 minutos, la mezcla se pasó a través de un filtro de 0,45  $\mu\text{m}$  y el filtrado se liofilizó, para dar muestras de HA-TBA como un sólido blanco.

35 La figura 1 muestra el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de un ejemplo representativo de los productos, que se obtuvo mediante análisis en  $\text{D}_2\text{O}$  del producto sintetizado usando HA-Na de 99 kDa como material de partida. La relación cuantitativa de TBA y la unidad de HA se calculó a partir del valor integrado de la señal derivada de acetilo en HA glucosamina (-COCH<sub>3</sub>, 2,0 ppm; 3H) y el valor integrado de las señales derivadas de cuatro etilenos en TBA (N(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, 1,4 1,7 ppm; 16H), y, después, se calculó el peso molecular promedio unitario de HA-TBA a partir de la relación resultante. Por ejemplo, el peso molecular promedio unitario de HA-TBA sintetizado utilizando HA-Na 99 kDa como material de partida fue de 752,6.

40

#### (Ejemplo 1-3) Síntesis de una sal de TBA de HA (HA-FL/TBA) marcada con fluoresceína

45 Se preparó una solución en DMSO anhidro (10 mg/ml) de HA-TBA sintetizada usando HA-Na (99 kDa) como material de partida en el Ejemplo 1-2. A continuación, se añadió clorhidrato de 5-(aminometil)fluoresceína (Invitrogen) en una cantidad de 0,05 equivalentes molares con respecto a la unidad de HA. Después, se añadió cloruro de 4-(4,6-dimetoxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metilmorfolinio (DMT-MM, Kokusan Chemical Co., Ltd.) en una cantidad de 0.2 equivalentes molares con respecto a la unidad de HA, y se realizó agitación a temperatura ambiente durante al menos 6 horas. La solución de reacción se dializó (Spectra/Por 4, corte del peso molecular (COPM): 12-14 kDa) contra una solución acuosa de NaCl 0,3 M y agua ultrapura, en este orden. La suspensión de resina de intercambio catiónico convertida en una sal de TBA en el Ejemplo 1-1 se añadió al dializado resultante en una cantidad de 5 equivalentes molares con respecto a la unidad de HA según se ha calculado para la capacidad de intercambio iónico de la resina. Después de agitar durante 15 minutos, la mezcla se pasó a través de un filtro de 0,45  $\mu\text{m}$  y el filtrado se liofilizó, para dar el producto de interés (HA-FL/TBA) en forma de un sólido de color amarillo.

55

La figura 2 muestra el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  obtenido mediante análisis del producto en  $\text{D}_2\text{O}$ . La relación cuantitativa entre TBA y la unidad de HA se calculó a partir del valor integrado del pico derivado de acetilo en HA glucosamina (-COCH<sub>3</sub>, 2,0 ppm; 3H) y el valor integrado del pico derivado de cuatro metilos en TBA ((N(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, 1,0 ppm; 12H), y, después, se calculó el peso molecular promedio unitario de HA-FL/TBA a partir de la relación resultante. El contenido de unidades de HA por peso se cuantificó a partir del valor integrado del pico derivado de acetilo en HA glucosamina y el valor integrado del pico derivado de metilo en 3-(trimetilsilil)propionato-d4 de sodio (TSP-d4) usado como el material estándar interno (-Si(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, 0,0 ppm; 9H). El producto se disolvió en una solución de tampón carbonato 50 mM (pH 9,0) a una concentración de 0,05 mg/ ml y el contenido de FL por peso se cuantificó a partir de la absorbancia a 491 nm, calculando de este modo el grado de

65

modificación de la unidad de HA con FL. El grado de modificación con FL estaba en el intervalo de 3 % a 6 % para cada lote.

#### (Ejemplo 1-4) Síntesis de derivados de HA a partir de HA-TBA o HA-FL/TBA

##### (Ejemplo 1-4-1) Síntesis de un derivado de HA modificado con L-alanina (Ala) (HA-Ala/FL)

Se preparó una solución en DMSO anhidro (5 mg/ml) de HA-TBA sintetizada usando HA-Na (99 kDa) como material de partida en el Ejemplo 1-2. A continuación, se añadieron clorhidrato de éster etílico de L-alanina (Sigma-Aldrich) y clorhidrato de 5-(aminometil)fluoresceína en cantidades de 3 y 0,15 equivalentes molares con respecto a la unidad de HA. Después, se añadió DMT-MM en una cantidad de 6 equivalentes molares con respecto a la unidad de HA y se realizó agitación a temperatura ambiente durante toda la noche. La solución de reacción se dializó (Spectra/Por 4, corte del peso molecular (COPM): 12-14 kDa) contra DMSO, una solución acuosa de NaCl 0,3 M, y agua ultrapura, en este orden. A continuación se añadió NaOH 2N al dializado resultante para ajustar el pH a, al menos, 12,5, se realizó agitación durante una hora para efectuar desprotección con carboxi mediante hidrólisis de éster etílico. A continuación, la mezcla se neutralizó con HCl 2N y se dializó después, y, a continuación, el dializado se liofilizó, para dar HA-Ala/FL como un sólido de color amarillo.

La figura 3-1 muestra el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  obtenido mediante análisis del producto en las mismas condiciones que se han descrito en el Ejemplo 1-3. El grado de modificación de la unidad de HA con alanina se calculó a partir del valor integrado del pico derivado de acetilo en HA glucosamina ( $-\text{COCH}_3$ , 2,0 ppm; 3H) y el valor integrado del pico derivado de metilo en alanina ( $-\text{CH}_3$ , 1,4 ppm; 3H) usando la ecuación siguiente (Tabla 1).

[Fórmula 26]

$$\text{Grado de modificación (\%)} = \frac{(\text{valor integrado del pico de metilo en alanina})/3}{(\text{valor integrado del pico de acetilo en HA})/3} * 100$$

##### (Ejemplo 1-4-2) Síntesis de un derivado de HA modificado con L-serina (Ser) (HA-Ser/FL)

Se realizó el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1-4-1, excepto que se usó clorhidrato de éster etílico de L-serina (Sigma-Aldrich) en lugar de clorhidrato de éster etílico de L-alanina; de este modo, se proporcionó HA-Ser/FL en forma de un sólido de color amarillo. Además, se tomó una parte de la solución de diálisis antes de la desprotección del carboxi y se liofilizó para su uso como muestra para calcular el grado de modificación (HA-Ser-OEt/FL).

La figura 3-2 muestra el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  obtenido mediante análisis de la muestra para el cálculo del grado de modificación en las mismas condiciones que se han descrito en el Ejemplo 1-3. El grado de modificación de la unidad de HA con serina se calculó a partir del valor integrado del pico derivado de acetilo en HA glucosamina ( $-\text{COCH}_3$ , 2,0 ppm; 3H) y el valor integrado del pico derivado de metilo en éster etílico de serina ( $-\text{CH}_3$ , 1,3 ppm; 3H) usando el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1-4-1 (Tabla 1). La figura 3-2 también muestra el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  obtenido mediante análisis de la muestra desprotegida en las mismas condiciones que se han descrito en el Ejemplo 1-3.

##### (Ejemplo 1-4-3) Síntesis de un derivado de HA modificado con ácido L-glutámico (Glu) (HA-Glu/FL)

Se llevó a cabo el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1-4-1, excepto que se usó clorhidrato de éster dietílico de ácido L-glutámico (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) en lugar de clorhidrato de éster etílico de L-alanina; de este modo, se proporcionó HA-Glu/FL en forma de un sólido de color amarillo.

La figura 3-3 muestra el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  obtenido mediante análisis del producto en las mismas condiciones que se han descrito en el Ejemplo 1-3. El grado de modificación de la unidad de HA con ácido glutámico se calculó a partir del valor integrado del pico derivado de acetilo en HA glucosamina ( $-\text{COCH}_3$ , 2,0 ppm; 3H) y el valor integrado del pico derivado de metileno en ácido glutámico ( $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ , 2,3 ppm; 2H) usando el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1-4-1 (Tabla 1). Dado que el pico derivado de acetilo en HA glucosamina solapaba con el pico derivado de otro metileno en ácido glutámico ( $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ , 2,1 ppm; 2H), el valor obtenido restando el valor integrado del pico a 2,3 ppm del de los picos a de 1,7 a 2,2 ppm se tomó como el pico derivado de acetilo en la glucosamina HA y se usó para el cálculo del grado de modificación.

##### (Ejemplo 1-4-4) Síntesis de derivados de HA modificados con glicina (Gly) (HA-Gly y HA-Gly/FL)

Como material de partida se usó una solución en DMSO anhidro (5 mg/ml) de HA-TBA sintetizada en el Ejemplo 1-2 o una solución con agua ultrapura/DMSO (1:3) de HA-FL/TBA (aproximadamente 4 mg/ml) sintetizada en el Ejemplo 1-3. Se añadió clorhidrato de éster etílico de glicina (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) en una cantidad de 5 equivalentes molares con respecto a la unidad de HA. Después, se añadió DMT-MM en una cantidad de 3 equivalentes molares con respecto a la unidad de HA y se realizó agitación a temperatura ambiente durante toda la

noche. La solución de reacción se dializó (Spectra/Por 4, corte del peso molecular (COPM): 12-14 kDa) contra una solución acuosa de NaCl 0,3 M y agua ultrapura, en este orden. A continuación se añadió NaOH 2N al dializado resultante para ajustar el pH a, al menos, 12,5, se realizó agitación durante una hora para efectuar desprotección con carboxi mediante hidrólisis de éster etílico. A continuación, la mezcla se neutralizó con HCl 2N y se dializó después, y, a continuación, el dializado se liofilizó, para dar HA-Gly como un sólido de color blanco o HA-Gly/FL como un sólido de color amarillo. Además, se tomó una parte de la solución de diálisis antes de la desprotección del carboxi y se liofilizó para su uso como muestra para calcular el grado de modificación (HA-Gly-OEt/FL).

La figura 3-4 muestra el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  obtenido mediante análisis de la muestra para el cálculo del grado de modificación en las mismas condiciones que se han descrito en el Ejemplo 1-3. El grado de modificación de la unidad de HA con glicina se calculó a partir del valor integrado del pico derivado de acetilo en HA glucosamina (-COCH<sub>3</sub>, 2,0 ppm; 3H) y el valor integrado del pico derivado de metilo en éster etílico de glicina (-CH<sub>3</sub>, 1,3 ppm; 3H) usando el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1-4-1 (Tabla 1). La figura 3-4 también muestra el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  obtenido mediante análisis de las muestras desprotegidas en las mismas condiciones que se han descrito en el Ejemplo 1-3.

#### **(Ejemplo 1-4-5) Síntesis de derivados de HA modificados con L-valina (Val) (HA-Val y HA-Val/FL)**

Se llevó a cabo el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1-4-4, excepto que se usó clorhidrato de éster dietílico de L-valina (Watanabe Chemical Industries, Ltd.) en lugar de clorhidrato de éster etílico de glicina; de este modo, se proporcionó HA-Val en forma de un sólido de color blanco, o HA-Val/FL en forma de un sólido de color amarillo.

La figura 3-5 muestra el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  obtenido mediante análisis del producto en las mismas condiciones que se han descrito en el Ejemplo 1-3. El grado de modificación de la unidad de HA con glicina se calculó a partir del valor integrado del pico derivado de acetilo en HA glucosamina (-COCH<sub>3</sub>, 2,0 ppm; 3H) y el valor integrado del pico derivado de dos metilo en valina (-CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 0,9 ppm; 6H) usando el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1-4-1 (Tabla 1). Dado que el pico derivado de acetilo en HA glucosamina solapaba con el pico derivado de hidrógeno en la posición 3 de valina (-CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 2,1 ppm; 1H), el valor integrado del pico a 0,9 ppm multiplicado por 1/6 se restó del valor integrado de los picos a de 1,8 a 2,2 ppm y el valor resultante se tomó como el pico derivado de acetilo en HA glucosamina y se usó para el cálculo del grado de modificación.

#### **(Ejemplo 1-4-6) Síntesis de derivados de HA modificados con L-leucina (Leu) (HA-Leu y HA-Leu/FL)**

Se llevó a cabo el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1-4-4, excepto que se usó clorhidrato de éster etílico de L-leucina (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) en lugar de clorhidrato de éster etílico de glicina; de este modo, se proporcionó HA-Leu en forma de un sólido de color blanco, o HA-Leu/FL en forma de un sólido de color amarillo.

La figura 3-6 muestra el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  obtenido mediante análisis del producto en las mismas condiciones que se han descrito en el Ejemplo 1-3. El grado de modificación de la unidad de HA con leucina se calculó a partir del valor integrado del pico derivado de acetilo en HA glucosamina (-COCH<sub>3</sub>, 2,0 ppm; 3H) y el valor integrado del pico derivado de dos metilos en leucina (-CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 0,9 ppm; 6H) usando el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1-4-1 (Tabla 1).

#### **(Ejemplo 1-4-7) Síntesis de derivados de HA modificados con L-isoleucina (Ile) (HA-Ile y HA-Ile/FL)**

Se llevó a cabo el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1-4-4, excepto que se usó DMSO anhidro como disolvente y que se usó clorhidrato de éster metílico de L-isoleucina (Watanabe Chemical Industries, Ltd.) en lugar de clorhidrato de éster etílico de glicina; de este modo, se proporcionó HA-Ile en forma de un sólido de color blanco o HA-Ile/FL en forma de un sólido de color amarillo.

La figura 3-7 muestra el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  obtenido mediante análisis del producto en las mismas condiciones que se han descrito en el Ejemplo 1-3. El grado de modificación de la unidad de HA con isoleucina se calculó a partir del valor integrado del pico derivado de acetilo en HA glucosamina (-COCH<sub>3</sub>, 2,0 ppm; 3H) y el valor integrado del pico derivado de dos metilos en isoleucina (-CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, 0,9 ppm; 6H) usando el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1-4-1 (Tabla 1). Dado que el pico derivado de acetilo en HA glucosamina solapaba con el pico derivado de hidrógeno en la posición 3 de isoleucina (-CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, 1,9 ppm; 1H), el valor integrado del pico a 0,9 ppm multiplicado por 1/6 se restó del valor integrado de los picos a de 1,8 a 2,2 ppm y el valor resultante se tomó como el pico derivado de acetilo en HA glucosamina y se usó para el cálculo del grado de modificación.

#### **(Ejemplo 1-4-8) Síntesis de derivados de HA modificados con L-treonina (Thr) (HA-Thr y HA-Thr/FL)**

Se realizó el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1-4-4, excepto que se usó clorhidrato de éster metílico de L-treonina (Bachem) en lugar de clorhidrato de éster etílico de glicina; de este modo, se proporcionó HA-Thr en forma de un sólido de color blanco o HA-Thr/FL en forma de un sólido de color amarillo.

La figura 3-8 muestra el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  obtenido mediante análisis del producto en las mismas condiciones

que se han descrito en el Ejemplo 1-3. El grado de modificación de la unidad de HA con treonina se calculó a partir del valor integrado del pico derivado de acetilo en HA glucosamina (-COCH<sub>3</sub>, 2,0 ppm; 3H) y el valor integrado del pico derivado de metilo en treonina (-CH<sub>3</sub>, 1,2 ppm; 3H) usando el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1-4-1 (Tabla 1).

5 **(Ejemplo 1-4-9) Síntesis de derivados de HA modificados con ácido de L-aspártico (Asp) (HA-Asp y HA-Asp/FL)**

10 Se llevó a cabo el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1-4-4, excepto que se usó clorhidrato de éster dietílico de ácido L-aspártico (Watanabe Chemical Industries, Ltd.) en lugar de clorhidrato de éster etílico de glicina; de este modo, se proporcionó HA-Asp en forma de un sólido de color blanco o HA-Asp/FL en forma de un sólido de color amarillo.

15 La figura 3-9 muestra el espectro de RMN de <sup>1</sup>H obtenido mediante análisis del producto en las mismas condiciones que se han descrito en el Ejemplo 1-3. El grado de modificación de la unidad de HA con ácido aspártico se calculó a partir del valor integrado del pico derivado de acetilo en HA glucosamina (-COCH<sub>3</sub>, 2,0 ppm; 3H) y el valor integrado de los picos derivados de metileno en ácido aspártico (-CH<sub>2</sub>COOH, 2,7 2,8 ppm; 2H) usando el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1-4-1 (Tabla 1).

20 **(Ejemplo 1-4-10) Síntesis de un derivado de HA modificado con ácido cis-2-amino-1-ciclohexil carboxílico (cACHCA) (HAcACHCA/FL)**

25 Se llevó a cabo el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1-4-4, excepto que se usó clorhidrato de éster etílico de cACHCA (Acros) en lugar de clorhidrato de éster etílico de glicina y que se llevó a cabo desprotección de carboxi usando NaOH 5N a pH 13,2; de este modo, se proporcionó HA-cACHCA/FL en forma de un sólido de color amarillo.

30 La figura 3-10 muestra el espectro de RMN de <sup>1</sup>H obtenido mediante análisis del producto en las mismas condiciones que se han descrito en el Ejemplo 1-3. El grado de modificación de la unidad de HA con cACHCA se calculó a partir del valor integrado del pico derivado de acetilo en HA glucosamina (-COCH<sub>3</sub>, 2,0 ppm; 3H) y el valor integrado del pico derivado del anillo de ciclohexano en (-CHCOO-, 2,5 ppm; 1H) usando el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1-4-1 (Tabla 1).

35 **(Ejemplo 1-4-11) Síntesis de un derivado de HA modificado con éster etílico de ácido trans-2-amino-1-ciclohexil carboxílico éster (tACHCA-OEt) (HA-tACHCA-OEt/FL)**

Se llevó a cabo el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1-4-4, excepto que se usó clorhidrato de tACHCA-OEt (Acros) en lugar de clorhidrato de éster etílico de glicina y que no se llevó a cabo desprotección de carboxi; de este modo, se proporcionó HA --cACHCA/FL en forma de un sólido de color amarillo.

40 La figura 3-11 muestra el espectro de RMN de <sup>1</sup>H obtenido mediante análisis del producto en las mismas condiciones que se han descrito en el Ejemplo 1-3. El grado de modificación de la unidad de HA con tACHCA-OEt se calculó a partir del valor integrado del pico derivado de acetilo en HA glucosamina (-COCH<sub>3</sub>, 2,0 ppm; 3H) y el valor integrado del pico derivado del protón sobre el carbono adyacente al carbonilo en el anillo de ciclohexano en tACHCA-OEt (-CH(COOEt)-, 2,2 ppm; 1H) usando el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1-4-1 (Tabla 1). Dado que el pico derivado de acetilo en HA glucosamina solapaba con el pico derivado de ciclohexilo y metilo en el grupo protector (11H), el valor integrado del pico a 2,2 ppm multiplicado por 11 se restó del valor integrado de los picos a de 1,2 a 2,1 ppm y el valor resultante se tomó como el pico derivado de acetilo en HA glucosamina y se usó para el cálculo del grado de modificación.

50 **(Ejemplo 1-4-12) Síntesis de un derivado de HA modificado con ácido 2-aminoisobutírico (Aib) (HA-Aib/FL)**

55 Se llevó a cabo el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1-4-4, excepto que se usó clorhidrato de éster etílico de Aib (Watanabe Chemical Industries, Ltd.) se usó en lugar de clorhidrato de éster etílico de glicina y que se llevó a cabo desprotección del carboxi usando NaOH 5N a pH 13,2; de este modo, se proporcionó HA-Aib/FL en forma de un sólido de color amarillo.

60 La figura 3-12 muestra el espectro de RMN de <sup>1</sup>H obtenido mediante análisis del producto en las mismas condiciones que se han descrito en el Ejemplo 1-3. El grado de modificación de la unidad de HA con Aib se calculó a partir del valor integrado del pico derivado de acetilo en HA glucosamina (-COCH<sub>3</sub>, 2,0 ppm; 3H) y el valor integrado del pico derivado de dimetilo en Aib (-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-, 1,5 ppm; 6H) usando el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1-4-1 (Tabla 1).

65 **(Ejemplo 1-4-13) Síntesis de un derivado de HA modificado con éster etílico de ácido 1-amino-1-ciclobutírico (ACBuCA-OEt) (HA-ACBuCA-OEt/FL)**

Se llevó a cabo el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1-4-4, excepto que se usó clorhidrato de ACBuCA-OEt

(Sigma- Aldrich) en lugar de clorhidrato de éster etílico de glicina y que no se llevó a cabo desprotección de carboxi; de este modo, se proporcionó HA-ACBuCA-OEt/FL en forma de un sólido de color amarillo.

La figura 3-13 muestra el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  obtenido mediante análisis del producto en las mismas condiciones que se han descrito en el Ejemplo 1-3. El grado de modificación de la unidad de HA con ACBuCA-OEt se calculó a partir del valor integrado del pico derivado de acetilo en HA glucosamina ( $-\text{COCH}_3$ , 2,0 ppm; 3H) y el valor integrado del pico derivado de metilo en el grupo protector de ACBuCA-OEt ( $-\text{CH}_3$ , 1,3 ppm; 3H) usando el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1-4-1 (Tabla 1). Dado que el pico derivado de acetilo en HA glucosamina solapaba con el pico derivado de ciclobutano presente en ACBuCA-OEt (6H), el valor integrado del pico a 1,3 ppm multiplicado por 2 se restó del valor integrado de los picos a de 1,8 a 2,8 ppm y el valor resultante se tomó como el pico derivado de acetilo en HA glucosamina y se usó para el cálculo del grado de modificación.

#### **(Ejemplo 1-4-14) Síntesis de derivados de HA modificados con L-asparagina (Asn) (HA-Asn y HA-Asn/Rh)**

Se sintetizó HA-Asn del siguiente modo. Se añadió clorhidrato de éster metílico de L-asparagina (Bachem) a una solución en DMSO anhidro (5 mg/ ml) de HA-TBA sintetizado usando HA-Na (99 kDa) como material de partida en el Ejemplo 1-2 en una cantidad de 5 equivalentes molares con respecto a la unidad de HA. Después, se añadió DMT-MM en una cantidad de 3-6 equivalentes molares con respecto a la unidad de HA y se realizó agitación a temperatura ambiente durante toda la noche. Después de la reacción, la solución se volvió a precipitar con éter dietílico y el precipitado se disolvió en agua ultrapura, se añadió una solución de NaOH 5N para ajustar el pH a al menos 12,5 y se realizó agitación durante una hora para efectuar desprotección de carboxi mediante hidrólisis de éster etílico. A continuación, la mezcla se neutralizó con una solución de HCl 5N y se dializó adicionalmente para su purificación contra una solución acuosa de NaCl 0,3 M, agua destilada y agua ultrapura en este orden, y, a continuación, el dializado se liofilizó, para dar HA-Asn como un sólido de color blanco.

HA-Asn/Rh se sintetizó del siguiente modo. Se añadió clorhidrato de 1-(9-fluorenilmetiloxicarbonil-amino)-3,6-dioxa-8-octanamina (Fmoc-EDOBEA, Iris Biotech GmbH) a una solución en DMSO anhidro (5 mg/ ml) de HA-TBA sintetizado usando HA-Na (99 kDa) como material de partida en el Ejemplo 1-2 en una cantidad de 0,1 equivalentes molares con respecto a la unidad de HA. Después, se añadió DMT-MM en una cantidad de 0,2 equivalentes molares con respecto a la unidad de HA y se realizó agitación a temperatura ambiente durante 6 horas. A continuación, se añadieron clorhidrato de éster metílico de L-asparagina y DMT-MM en este orden en cantidades de 5 y 3-6 equivalentes molares, respectivamente, con respecto a la unidad de HA, y se realizó agitación a temperatura ambiente durante toda la noche. La solución de reacción se dializó para su purificación contra DMSO. Se añadió piperidina (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) al dializado resultante, para dar a concentración de 20 % y se realizó agitación durante 2 horas para retirar el grupo Fmoc. A continuación, la mezcla se dializó para su purificación contra DMSO, una solución acuosa de NaCl 0,3 M y agua destilada en este orden. Se añadió NaOH 5N al dializado resultante para ajustar el pH a, al menos, 12,5 y se realizó agitación durante una hora para efectuar la hidrólisis del éster y la desprotección del carboxi. A continuación, la mezcla se neutralizó con una solución de HCl 5N y se dializó adicionalmente para su purificación contra agua destilada y agua ultrapura, en este orden, y, a continuación, el dializado se liofilizó, para dar HA-Asn/EDOBEA.

Se diluyó 2 veces una solución acuosa (10 mg/ ml) de HA-Asn/EDOBEA con PB 100 mM (pH 7,4), se añadió NHS-rhodamina (éster succinimidílico de 5/6-carboxitetrametilrhodamina, Thermo Fisher Scientific Inc.) en una cantidad de 0,05 equivalentes molares con respecto a la unidad de HA y se realizó agitación a temperatura ambiente durante toda la noche. A continuación, se añadió anhídrido acético (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) en una cantidad de 40 equivalentes molares con respecto a la unidad de HA y se realizó agitación durante una hora para acetilar el amino terminal en exceso de EDOBEA. Se añadió una solución de NaOH 5N a la solución de reacción para ajustar el pH a, al menos, 12,5 y se realizó agitación durante una hora. A continuación, la mezcla se neutralizó con una solución de HCl 5N y se dializó para su purificación contra una solución acuosa de NaCl 0,3 M, agua destilada y agua ultrapura, en este orden, y, a continuación, el dializado se liofilizó, para dar HA-Asn/Rh como un sólido de color rojo.

Todas las membranas de diálisis utilizadas fueron Spectra/Por 4 (corte del peso molecular (COPM): 12-14 kDa).

La figura 3-14 muestra el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  obtenido mediante análisis del producto en las mismas condiciones que se han descrito en el Ejemplo 1-3. El grado de modificación de la unidad de HA con asparagina se calculó a partir del valor integrado del pico derivado de acetilo en HA glucosamina ( $-\text{COCH}_3$ , 2,0 ppm; 3H) y el valor integrado del pico derivado de metileno en asparagina ( $-\text{CH}_2\text{CONH}_2$ , 2,8 ppm; 2H) usando el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1-4-1 (Tabla 1).

#### **(Ejemplo 1-4-15) Síntesis de derivados de HA modificados con L-alaninamida (Ala-NH<sub>2</sub>) (HA-Ala-NH<sub>2</sub> y HA-Ala-NH<sub>2</sub>/Rh)**

Se llevó a cabo el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1-4-14, excepto que se usó clorhidrato de L-alaninamida (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) en lugar de clorhidrato de éster metílico de L-asparagina y de que no se realizó ningún procedimiento para reprecipitación o desprotección del carboxi; de este modo, se proporcionó HA-Ala-NH<sub>2</sub> en

forma de un sólido de color blanco o HA-Ala- NH<sub>2</sub>/Rh en forma de un sólido de color rojo.

La figura 3-15 muestra el espectro de RMN de <sup>1</sup>H obtenido mediante análisis del producto en las mismas condiciones que se han descrito en el Ejemplo 1-3. El grado de modificación de la unidad de HA con alaninamida se calculó a partir del valor integrado del pico derivado de acetilo en HA glucosamina (-COCH<sub>3</sub>, 2,0 ppm; 3H) y el valor integrado del pico derivado de metilo en alaninamida (-CH<sub>3</sub>, 1,5 ppm; 3H) usando el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1-4-1 (Tabla 1).

**(Ejemplo 1-4-16) Síntesis de derivados de HA modificados con L-valinamida (Val-NH<sub>2</sub>) (HA-Val-NH<sub>2</sub> y HA-Val-NH<sub>2</sub>/Rh)**

Se llevó a cabo el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1-4-15, excepto que se usó clorhidrato de L-valinamida (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) en lugar de clorhidrato de L-alaninamida; de este modo, se proporcionó HA-Val-NH<sub>2</sub> en forma de un sólido de color blanco o HA-Val-NH<sub>2</sub>/Rh en forma de un sólido de color rojo.

La figura 3-16 muestra el espectro de RMN de <sup>1</sup>H obtenido mediante análisis del producto en las mismas condiciones que se han descrito en el Ejemplo 1-3. El grado de modificación de la unidad de HA con valinamida se calculó a partir del valor integrado del pico derivado de acetilo en HA glucosamina (-COCH<sub>3</sub>, 2,0 ppm; 3H) y el valor integrado del pico derivado de dos metilos en valinamida (-CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 1,0 ppm; 6H) usando el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1-4-1 (Tabla 1). Dado que el pico derivado de acetilo en HA glucosamina solapaba con el pico derivado de hidrógeno en la posición de valinamida (-CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 2,1 ppm; 1H), el valor integrado del pico a 1,0 ppm multiplicado por 1/6 se restó del valor integrado de los picos a de 1,8 a 2,2 ppm y el valor resultante se tomó como el pico derivado de acetilo en HA glucosamina y se usó para el cálculo del grado de modificación.

**(Ejemplo 1-4-17) Síntesis de derivados de HA modificados con L-asparaginamida (Asn-NH<sub>2</sub>) (HA-Asn-NH<sub>2</sub> y HA-Asn-NH<sub>2</sub>/Rh)**

Se llevó a cabo el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1-4-15, excepto que se usó clorhidrato de L-asparaginamida (Kokusai Chemical Co., Ltd.) en lugar de clorhidrato de L-alaninamida; de este modo, se proporcionó HA-Asn-NH<sub>2</sub> en forma de un sólido de color blanco o HA-Asn-NH<sub>2</sub>/Rh en forma de un sólido de color rojo.

La figura 3-17 muestra el espectro de RMN de <sup>1</sup>H obtenido mediante análisis del producto en las mismas condiciones que se han descrito en el Ejemplo 1-3. El grado de modificación de la unidad de HA con asparaginamida se calculó a partir del valor integrado del pico derivado de acetilo en HA glucosamina (-COCH<sub>3</sub>, 2,0 ppm; 3H) y el valor integrado del pico derivado de metileno asparaginamida (-CH<sub>2</sub>CONH<sub>2</sub>, 2,8 ppm; 2H) usando el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1-4-1 (Tabla 1).

**(Ejemplo 1-4-18) Síntesis de derivados de HA modificados con metilamina (Me) (HA-Me y HA-Me/FL)**

Se sintetizó HA-Me del siguiente modo. Se preparó una solución en DMSO anhidro (5 mg/ml) de HA-TBA sintetizada usando HA-Na (99 kDa) como material de partida en el Ejemplo 1-2. A continuación, se añadieron metilamina (solución de metanol al 40 %, Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) y BOP (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) en este orden a una relación equivalente de unidad de HA/BOP/metilamina = 1/3/50 (mol/mol/mol), y se realizó agitación a temperatura ambiente durante toda la noche. La solución de reacción se dializó (Spectra/Por 4, corte del peso molecular (COPM): 12-14 kDa) contra una solución acuosa de NaCl 0,3 M y agua ultrapura, en este orden, y, a continuación, el dializado se liofilizó, para dar HA-Me como un sólido de color blanco.

HA-Me/FL se sintetizó del siguiente modo. Se preparó una solución en DMSO anhidro (5 mg/ml) de HA-TBA sintetizada usando HA-Na (99 kDa) como material de partida en el Ejemplo 1-2. A continuación, se añadieron metilamina, etilendiamina (Sigma- Aldrich) y BOP, en este orden, a una relación equivalente de unidad de HA/metilamina/etilendiamina = 1/2,5/4,5/0,25 (mol/mol/mol/mol) y se realizó agitación a temperatura ambiente durante toda la noche. La solución de reacción se dializó (Spectra/Por 4, corte del peso molecular (COPM): 12-14 kDa) contra una solución acuosa de NaCl 0,3 M y agua ultrapura, en este orden, y, a continuación, el dializado se liofilizó, para dar un intermedio como un sólido de color blanco.

Después, el producto intermedio resultante se disolvió en agua ultrapura para dar una concentración de 10 mg/ml y, después, la solución se diluyó 2 veces con una solución de tampón fosfato 100 mM (pH 7,4) para preparar una solución de 5 mg/ml. A esta solución se añadió NHS-fluoresceína como una solución en DMSO en una cantidad de 0,1 equivalentes molares con respecto a la unidad de HA y se realizó agitación a temperatura ambiente durante una hora. A continuación, se añadió anhídrido acético (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) en una cantidad de 40 equivalentes molares con respecto a la unidad de HA y se realizó agitación adicional durante una hora para acetilar el amino terminal en exceso de etilendiamina. La solución de reacción se dializó (Spectra/Por 4, corte del peso molecular (COPM): 12-14 kDa) contra una solución acuosa de NaCl 0,3 M y agua ultrapura, en este orden, en condiciones de oscuridad y, a continuación, el dializado se liofilizó, para dar HA-Me/FL como un sólido de color amarillo.

La figura 3-18 muestra los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  obtenidos mediante análisis de los productos en las mismas condiciones que se han descrito en el Ejemplo 1-3. El grado de modificación de la unidad de HA con metilo se calculó a partir del valor integrado del pico derivado de acetilo en HA glucosamina ( $-\text{COCH}_3$ , 2,0 ppm; 3H) y el valor integrado del pico derivado de metilo ( $-\text{CH}_3$ , 2,8 ppm; 3H) usando el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1-4-1 (Tabla 1).

**(Ejemplo 1-4-19) Síntesis de derivados de HA modificados con propilamina (Pr) (HA-Pr y HA-Pr/FL)**

Se sintetizó HA-Pr del siguiente modo. Se preparó una solución en DMSO anhidro (5 mg/ml) de HA-TBA sintetizada usando HA-Na (99 kDa) como material de partida en el Ejemplo 1-2. A continuación, se añadieron propilamina (Sigma- Aldrich) y BOP, en este orden, a una relación equivalente de unidad de HA/BOP/propilamina = 1/3/50 (mol/mol/mol) y se realizó agitación a temperatura ambiente durante toda la noche. La solución de reacción se dializó (Spectra/Por 4, corte del peso molecular (COPM): 12-14 kDa) contra una solución acuosa de NaCl 0,3 M y agua ultrapura, en este orden, y, a continuación, el dializado se liofilizó, para dar HA-Pr como un sólido de color blanco.

Se sintetizó HA-Pr/FL del siguiente modo. Se preparó una solución en DMSO anhidro (5 mg/ml) de HA-TBA sintetizada usando HA-Na (99 kDa) como material de partida en el Ejemplo 1-2. A continuación, se añadieron propilamina, etilendiamina y BOP, en este orden, a una relación equivalente de unidad de HA/propilamina/etilendiamina = 1/2,5/45/2,5 (mol/mol/mol/mol) y se realizó agitación a temperatura ambiente durante toda la noche. La solución de reacción se dializó (Spectra/Por 4, corte del peso molecular (COPM): 12-14 kDa) contra una solución acuosa de NaCl 0,3 M y agua ultrapura, en este orden, y, a continuación, el dializado se liofilizó, para dar un intermedio como un sólido de color blanco.

Después, el producto intermedio resultante se disolvió en agua ultrapura para dar una concentración de 10 mg/ml y, después, la solución se diluyó 2 veces con una solución de tampón fosfato 100 mM (pH 7,4) para preparar una solución de 5 mg/ml. A esta solución se añadió NHS-fluoresceína como una solución en DMSO en una cantidad de 0,06 equivalentes molares con respecto a la unidad de HA y se realizó agitación a temperatura ambiente durante una hora. A continuación, se añadió anhídrido acético (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) en una cantidad de 40 equivalentes molares con respecto a la unidad de HA y se realizó agitación adicional durante una hora para acetilar el amino terminal en exceso de etilendiamina. La solución de reacción se dializó (Spectra/Por 4, corte del peso molecular (COPM): 12-14 kDa) contra una solución acuosa de NaCl 0,3 M y agua ultrapura, en este orden, en condiciones de oscuridad y, a continuación, el dializado se liofilizó, para dar HA-Pr/FL como un sólido de color amarillo.

La figura 3-19 muestra los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  obtenidos mediante análisis de los productos en las mismas condiciones que se han descrito en el Ejemplo 1-3. El grado de modificación de la unidad de HA con metilo se calculó a partir del valor integrado del pico derivado de acetilo en HA glucosamina ( $-\text{COCH}_3$ , 2,0 ppm; 3H) y el valor integrado del pico derivado de metilo perteneciente a propilo ( $-\text{CH}_3$ , 0,9 ppm; 3H) usando el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1-4-1 (Tabla 1).

[Tabla 1]

Tabla 1 Grados de modificación de los derivados de HA sintetizados (99 kDa)

N.º de ejemplo	Compuesto de modificación	Grado de modificación con derivado de ácido amino-carboxílico o alquilamina (%)
1-4-1	Ala/FL	86
1-4-2	Ser/FL	89
1-4-3	Glu/FL	73
1-4-4	Gly	89
	Gly/FL	93
1-4-5	Val	99
	Val/FL	101
1-4-6	Leu	84
	Leu/FL	93
1-4-7	Ile	100

N.º de ejemplo	Compuesto de modificación	Grado de modificación con derivado de ácido amino-carboxílico o alquilamina (%)
	Ile/FL	98
1-4-8	Thr	98
	Thr/FL	99
1-4-9	Asp	96
	Asp/FL	100
1-4-10	cACHCA/FL	82
1-4-11	tACHCA-OEt/FL	87
1-4-12	Aib/FL	80
1-4-13	ACBuCA-OEt/FL	98
1-4-14	Asn	84
	Asn/Rh	81
1-4-15	Ala-NH <sub>2</sub>	93
	Ala-NH <sub>2</sub> /Rh	82
1-4-16	Val-NH <sub>2</sub>	97
	Val-NH <sub>2</sub> /Rh	83
1-4-17	Asn-NH <sub>2</sub>	91
	Asn-NH <sub>2</sub> /Rh	71
1-4-18	Me	101
	Me/FL	91
1-4-19	Pr	108
	Pr/FL	87

**(Ejemplo 1-5) Síntesis de derivados de HA de HA-TBA (25 kDa o 99 kDa)**

**(Ejemplo 1-5-1) Síntesis de derivados de HA modificados con ácido 1-aminometil-1-ciclohexanoico (AMCHCA) (HA-AMCHCA)**

5

Se prepararon soluciones de DMSO anhidro (10 mg/ml) de HA-TBA sintetizada usando HA-Na (25 kDa y 99 kDa) como material de partida en el Ejemplo 1-2 y, después, se añadió clorhidrato de éster metílico de 1-aminometil-ciclohexanoico (AMCHCA-OMe-HCl, Bionet Research) a cada una de las soluciones a la relación con respecto a la unidad HA-TBA como se muestra en la Tabla 2. Después, Se añadió DMT- MM a la relación con respecto a la

10 unidad HA-TBA como se muestra en la Tabla 2 y se realizó agitación a temperatura ambiente durante toda la noche. La solución de reacción se dializó (Spectra/Por 4, corte del peso molecular (COPM): 12-14 kDa) para su purificación contra un exceso grande de solución acuosa de NaCl 0,3 M. Se añadió una solución acuosa de NaOH 5N al dializado resultante para ajustar el pH a, al menos, 13,2 y se realizó agitación a temperatura ambiente durante una

15 hora, y además se añadió HCl 5N para la neutralización. Después, la mezcla se dializó (Spectra/Por 4, COPM: 12-14 kDa) para la purificación contra agua destilada y agua ultrapura, en este orden, y el dializado resultante se liofilizó, para dar los productos de interés (HA-AMCHCA) en forma de un sólido de color blanco.

La figura 4-1 muestra el espectro de RMN de <sup>1</sup>H de un ejemplo representativo de los productos, que se obtuvo mediante análisis en D<sub>2</sub>O del producto sintetizado usando HA-Na con un PM de 99 kDa en presencia de los reactivos a la relación de unidad de HA-TBA/DMT-MM/AMCHCA-OMe-HCl = 1/3/5. El grado de modificación de la

20 unidad de HA con AMCHCA se calculó a partir del valor integrado del pico derivado de acetilo en HA glucosamina (-COCH<sub>3</sub>, 2,0 ppm; 3H) y el valor integrado de los picos derivados de ciclohexano perteneciente a AMCHCA (C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>, 1,2-1,9 ppm; 10H) usando el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1-4-1 (Tabla 2).

25

**(Ejemplo 1-5-2) Síntesis de un derivado de HA modificado con ácido cis-4-aminociclohexanoico (pcACHCA) (HA-pcACHCA)**

Se realizó el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1-5-1, excepto que se usó clorhidrato de éster metílico de ácido cis-4-amino-1-ciclohexilcarboxílico (pcACHCA-OMe·HCl, Iris Biotech) en lugar de AMCHCA-OMe·HCl; de este modo, se proporcionó el producto de interés (HA-pcACHCA) en forma de un sólido de color blanco. Las cantidades de adición de los reactivos se muestran en la Tabla 2.

Como ejemplo representativo, la figura 4-2 muestra el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  obtenido mediante análisis en  $\text{D}_2\text{O}$  del producto sintetizado usando HA-Na con un PM de 99 kDa en presencia de los reactivos a la relación de unidad de HA-TBA/DMT-MM/pcACHCA-OMe·HCl = 1/3/5. El grado de modificación de la unidad de HA con pcACHCA se calculó a partir del valor integrado del pico derivado de acetilo en HA glucosamina (-COCH<sub>3</sub>, 2,0 ppm; 3H) y el valor integrado de los picos derivados de dos etilenos presentes en ciclohexano perteneciente a pcACHCA (1,5-1,8 ppm; 8H) usando el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1-4-1 (Tabla 2).

#### **(Ejemplo 1-5-3) Síntesis de derivados de HA modificados con L-2-naftilalanina (Nal) (HA-Nal)**

Se realizó el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1-5-1 excepto que se usó sal de para-tosilato de éster bencílico de L-2-naftilalanina (Nal-Obzl-p-Ts, Bachem) en lugar de AMCHCA-OMe·HCl; de este modo, se proporcionaron los productos de interés (HA-Nal) en forma de un sólido de color blanco. Las relaciones de adición de los reactivos se muestran en la Tabla 2.

La figura 4-3 muestra el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de un ejemplo representativo de los productos, que se obtuvo mediante análisis en  $\text{D}_2\text{O}$  del producto sintetizado usando HA-Na con un PM de 99 kDa en presencia de los reactivos a la relación de unidad de HA-TBA/DMT-MM/Nal-Obzl-p-Ts=1/3/5. El grado de modificación de la unidad de HA con Nal se calculó a partir del valor integrado del pico derivado de acetilo en HA glucosamina (-COCH<sub>3</sub>, 2,0 ppm; 3H) y el valor integrado de los picos derivados de naftilo perteneciente a Nal (-C<sub>10</sub>H<sub>7</sub>, 7,4-7,9 ppm; 7H) usando el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1-4-1 (Tabla 2).

#### **(Ejemplo 1-5-4) Síntesis de un derivado de HA modificado con ácido 2-amino-4-fenilbutírico (APBA) (HA-APBA)**

Se realizó el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1-5-1, excepto que se usó clorhidrato de éster etílico de ácido 2-amino-4-fenilbutírico (APBA-OEt·HCl, Sigma-Aldrich) en lugar de AMCHCA-OMe·HCl; de este modo, se proporcionó el producto de interés (HA-APBA) en forma de un sólido de color blanco. La relación de adición de los reactivos se muestra en la Tabla 2.

La figura 4-4 muestra el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  obtenido mediante análisis en  $\text{D}_2\text{O}$  del producto sintetizado usando HA-Na con un PM de 99 kDa en presencia de los reactivos a la relación de unidad de HA-TBA/DMT-MM/APBA-OEt·HCl = 1/3/5. El grado de modificación de la unidad de HA con APBA se calculó a partir del valor integrado del pico derivado de acetilo en HA glucosamina (-COCH<sub>3</sub>, 2,0 ppm; 3H) y el valor integrado de los picos derivados de fenilo perteneciente a APBA (-C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>, 7,2-7,4 ppm; 5H) usando el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1-4-1 (Tabla 2).

#### **(Ejemplo 1-5-5) Síntesis de derivados de HA modificados con ciclohexil-L-alanina (Cha) (HA-Cha)**

Se realizó el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1-5-1, excepto que se usó clorhidrato de éster metílico de ciclohexil-L-alanina (Cha-OMe·HCl, Watanabe Chemical Industries, Ltd.) en lugar de AMCHCA-OMe·HCl; de este modo, se proporcionaron los productos de interés (HA-Cha) en forma de un sólido de color blanco. Las relaciones de adición de los reactivos se muestran en la Tabla 2.

La figura 4-5 muestra el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de un ejemplo representativo de los productos, que se obtuvo mediante análisis en  $\text{D}_2\text{O}$  del producto sintetizado usando HA-Na con un PM de 99 kDa en presencia de los reactivos a la relación de unidad de HA-TBA/DMT-MM/Cha-OMe·HCl = 1/3/5. El grado de modificación de la unidad de HA con Cha se calculó a partir del valor integrado del pico derivado de acetilo en HA glucosamina (-COCH<sub>3</sub>, 2,0 ppm; 3H) y el valor integrado de los picos derivados de ciclohexilmetilo perteneciente a Cha (-CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>, 0,9-1,8 ppm; 13H) usando el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1-4-1 (Tabla 2).

#### **(Ejemplo 1-5-6) Síntesis de derivados de HA modificados con ácido 4-aminometilbenzoico (AMBA) (HA-AMBA)**

Se realizó el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1-5-1, excepto que se usó clorhidrato de éster metílico de 4-aminometilbenzoico (AMBA-OMe·HCl, Sigma-Aldrich) en lugar de AMCHCA-OMe·HCl; de este modo, se proporcionaron los productos de interés (HA-AMBA) en forma de un sólido de color blanco. Las relaciones de adición de los reactivos se muestran en la Tabla 2. La figura 4-6 muestra el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  del producto. El grado de modificación de la unidad de HA con AMBA se calculó a partir del valor integrado del pico derivado de acetilo en HA glucosamina (-COCH<sub>3</sub>, 2,0 ppm; 3H) y el valor integrado de los picos derivados de fenilo perteneciente a AMBA (-CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>COOH, 7,4 7,9 ppm; 4H) usando los mismos procedimientos que en el Ejemplo 1-4-1 (Tabla 2).

**(Ejemplo 1-5-7) Síntesis de derivados de HA modificados con ácido 3-aminometilbenzoico (3AMBA) (HA-3AMBA)**

5 Se realizó el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1-5-1, excepto que se usó clorhidrato de éster metílico de 3-aminometilbenzoico (AMBA-OMe-HCl, Fluorochem) en lugar de AMCHCA-OMe-HCl; de este modo, se proporcionaron los productos de interés (HA-3AMBA) en forma de un sólido de color blanco. Las relaciones de adición de los reactivos se muestran en la Tabla 2.

10 La figura 4-7 muestra el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de un ejemplo representativo de los productos, que se obtuvo mediante análisis en  $\text{D}_2\text{O}$  del producto sintetizado usando HA-Na con un PM de 99 kDa en presencia de los reactivos a la relación de unidad de HA-TBA/DMT-MM/3AMBA-OMe-HCl = 1/3/5. El grado de modificación de la unidad de HA con 3AMBA se calculó a partir del valor integrado del pico derivado de acetilo en HA glucosamina (-COCH<sub>3</sub>, 2,0 ppm; 3H) y el valor integrado de los picos derivados de fenilo perteneciente a 3AMBA (-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>COOH, 7,4-7,9 ppm; 4H) usando los mismos procedimientos que en el Ejemplo 1-4-1 (Tabla 2).

**(Ejemplo 1-5-8) Síntesis de derivados de HA modificados con ácido 3-amino-2-fenilpropiónico (APhPA) (HA-APhPA)**

20 Se realizó el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1-5-1, excepto que se usó clorhidrato de éster etílico de ácido 3-amino-2-fenilpropiónico (APhPA-OEt-HCl, Fluorochem) en lugar de AMCHCA-OMe-HCl; de este modo, se proporcionaron los productos de interés (HA-APhPA) en forma de un sólido de color blanco. Las relaciones de adición de los reactivos se muestran en la Tabla 2.

25 La figura 4-8 muestra el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de un ejemplo representativo de los productos, que se obtuvo mediante análisis en  $\text{D}_2\text{O}$  del producto sintetizado usando HA-Na con un PM de 99 kDa en presencia de los reactivos a la relación de unidad de HA-TBA/DMT-MM/APhPA-OEt-HCl = 1/3/5. El grado de modificación de la unidad de HA con APhPA se calculó a partir del valor integrado del pico derivado de acetilo en HA glucosamina (-COCH<sub>3</sub>, 2,0 ppm; 3H) y el valor integrado del pico derivado de fenilo perteneciente a APhPA (-C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>, 7,4 ppm; 5H) usando el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1-4-1 (Tabla 2).

**(Ejemplo 1-5-9) Síntesis de derivados de HA modificados con ácido 4-(2-aminoetil)benzoico (AEBA) (HA-AEBA)**

35 Se realizó el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1-5-1, excepto que se usó clorhidrato de éster metílico de ácido 4-(2-aminoetil)benzoico (AEBA-OMe-HCl, enamina) en lugar de AMCHCA-OMe-HCl; de este modo, se proporcionaron los productos de interés (HA-AEBA) en forma de un sólido de color blanco. Las relaciones de adición de los reactivos se muestran en la Tabla 2.

40 La figura 4-9 muestra el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de un ejemplo representativo de los productos, que se obtuvo mediante análisis en  $\text{D}_2\text{O}$  del producto sintetizado usando HA-Na con un PM de 99 kDa en presencia de los reactivos a la relación de unidad de HA-TBA/DMT-MM/APhPA-OEt-HCl = 1/3/5. El grado de modificación de la unidad de HA con AEBA se calculó a partir del valor integrado del pico derivado de acetilo en HA glucosamina (-COCH<sub>3</sub>, 2,0 ppm; 3H) y el valor integrado de los picos derivados de fenilo perteneciente a AEBA (-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>COOH, 7,3-7,9 ppm; 4H) usando el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1-4-1 (Tabla 2).

**(Ejemplo 1-5-10) Síntesis de derivados de HA modificados con ácido 4-aminometil-3-clorobenzoico (AMCIBA) (HA-AMCIBA)**

50 Se realizó el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1-5-1, excepto que se usó clorhidrato de éster metílico de 4-aminometil-3-clorobenzoico (AMCIBA-OMe-HCl, Anichem) en lugar de AMCHCA-OMe-HCl; de este modo, se proporcionaron los productos de interés (HA-AMCIBA) en forma de un sólido de color blanco. Las relaciones de adición de los reactivos se muestran en la Tabla 2.

55 La figura 4-10 muestra el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de un ejemplo representativo de los productos, que se obtuvo mediante análisis en  $\text{D}_2\text{O}$  del producto sintetizado usando HA-Na con un PM de 99 kDa en presencia de los reactivos a la relación de unidad de HA-TBA/DMT-MM/AMCIBA-OMe-HCl = 1/3/5. El grado de modificación de la unidad de HA con AMCIBA se calculó a partir del valor integrado del pico derivado de acetilo en HA glucosamina (-COCH<sub>3</sub>, 2,0 ppm; 3H) y el valor integrado de los picos derivados de fenilo perteneciente a AMCIBA (-C<sub>6</sub>H<sub>3</sub>()COOH, 7,5-7,9 ppm; 3H) usando el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1-4-1 (Tabla 2).

**(Ejemplo 1-5-11) Síntesis de derivados de HA modificados con ácido 5-aminometilsalicílico (AMSA) (HA-AMSA)**

65 Se realizó el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1-5-1, excepto que se usó clorhidrato de éster metílico de ácido 5-aminometilbenzoico (AMSA-OMe-HCl, Oakwood) en lugar de AMCHCA-OMe-HCl; de este modo, se proporcionaron los productos de interés (HA-AMSA) en forma de un sólido de color blanco. Las relaciones de adición

de los reactivos se muestran en la Tabla 2.

La figura 4-11 muestra el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de un ejemplo representativo de los productos, que se obtuvo mediante análisis en  $\text{D}_2\text{O}$  del producto sintetizado usando HA-Na con un PM de 99 kDa en presencia de los reactivos a la relación de unidad de HA-TBA/DMT-MM/AMSA-OMe-HCl = 1/3/5. El grado de modificación de la unidad de HA con AMSA se calculó a partir del valor integrado del pico derivado de acetilo en HA glucosamina (-COCH<sub>3</sub>, 2,0 ppm; 3H) y el valor integrado de los picos derivados de fenilo perteneciente a AMSA (-C<sub>6</sub>H<sub>3</sub>(OH)COOH, 6,9-7,9 ppm; 3H) usando el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1-4-1 (Tabla 2).

#### 10 (Ejemplo 1-5-12) Síntesis de un derivado de HA modificado con ácido trans-4-aminometilciclohexanoico (4AMCHCA) (HA-4AMCHCA)

Se realizó el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1-5-1, excepto que se usó clorhidrato de éster metílico de ácido trans-4-aminometilciclohexanoico (4AMCHCA-OMe-HCl, AK Scientific) en lugar de AMCHCA-OMe-HCl; de este modo, se proporcionó el producto de interés (HA-4AMCHCA) en forma de un sólido de color blanco. La relación de adición de los reactivos se muestra en la Tabla 2.

La figura 4-12 muestra el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  obtenido mediante análisis en  $\text{D}_2\text{O}$  del producto sintetizado usando HA-Na con un PM de 25 kDa en presencia de los reactivos a la relación de unidad de HA-TBA/DMT-MM/4AMCHCA-OMe-HCl = 1/3/5. El grado de modificación de la unidad de HA con 4AMCHCA se calculó a partir del valor integrado del pico derivado de acetilo en HA glucosamina (-COCH<sub>3</sub>, 2,0 ppm; 3H) y el valor integrado de los picos derivados de ciclohexano perteneciente a 4AMCHCA (-CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH-, 1,2-1,9 ppm; 9H) usando el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1-4-1 (Tabla 2).

#### 25 (Ejemplo 1-5-13) Síntesis de derivados de HA modificados con L-ciclohexilglicina (Chg) (HA-Chg)

Se realizó el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1-5-1, excepto que se usó clorhidrato de éster metílico de L-ciclohexilglicina (Cha-OMe-HCl, INDOFINE Chemical Company) en lugar de AMCHCA-OMe-HCl; de este modo, se proporcionaron los productos de interés (HA-Cha) en forma de un sólido de color blanco. Las relaciones de adición de los reactivos se muestran en la Tabla 2.

La figura 4-13 muestra el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de un ejemplo representativo de los productos, que se obtuvo mediante análisis en  $\text{D}_2\text{O}$  del producto sintetizado usando HA-Na con un PM de 25 kDa en presencia de los reactivos a la relación de unidad de HA-TBA/DMT-MM/Chg-OMe-HCl = 1/3/5. El grado de modificación de la unidad de HA con Chg se calculó a partir del valor integrado del pico derivado de acetilo en HA glucosamina (-COCH<sub>3</sub>, 2,0 ppm; 3H) y el valor integrado de los picos derivados de ciclohexilo perteneciente a Chg (-C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>, 1,0-1,8 ppm; 11H) usando el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1-4-1 (Tabla 2).

#### 40 (Ejemplo 1-5-14) Síntesis de derivados de HA modificados con ácido (R)-amino-(4-hidroxifenil)acético (pHPHg) (HA- pHPHg)

Se realizó el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1-5-1, excepto que se usó clorhidrato de éster metílico de ácido (R)-amino-(4-hidroxifenil)acético (pHPHg-OMe-HCl Sigma-Aldrich) en lugar de AMCHCA-OMe-HCl; de este modo, se proporcionaron los productos de interés (HA-pHPHg) en forma de un sólido de color blanco. Las relaciones de adición de los reactivos se muestran en la Tabla 2.

La figura 4-14 muestra el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de un ejemplo representativo de los productos, que se obtuvo mediante análisis en  $\text{D}_2\text{O}$  del producto sintetizado usando HA-Na con un PM de 99 kDa en presencia de los reactivos a la relación de unidad de HA-TBA/DMT-MM/pHPHg-OMe-HCl = 1/3/5. El grado de modificación de la unidad de HA con pHPHg se calculó a partir del valor integrado del pico derivado de acetilo en HA glucosamina (-COCH<sub>3</sub>, 2,0 ppm; 3H) y el valor integrado de los picos derivados de fenilo perteneciente a pHPHg (-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>OH, 6,9 7,3 ppm; 4H) usando el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1-4-1 (Tabla 2).

[Tabla 2]

Tabla 2 Cantidades de los reactivos utilizados para sintetizar derivados de HA y resultados de síntesis

N.º de ejemplo	Compuesto de modificación	Peso molecular de HA	Relación de adición molar del compuesto de modificación y DMT-MM (unidad de HA-TBA/ DMT-MM/compuesto de modificación)	Grado de modificación (%)
1-5-1	AMCHCA	99 kDa	1/3/5	94
	AMCHCA	99 kDa	1/0,33/5	27
	AMCHCA	25 kDa	1/3/5	93

N.º de ejemplo	Compuesto de modificación	Peso molecular de HA	Relación de adición molar del compuesto de modificación y DMT-MM (unidad de HA-TBA/ DMT-MM/compuesto de modificación)	Grado de modificación (%)
	AMCHCA	25 kDa	1/0,33/5	31
1-5-2	pcACHCA	99 kDa	1/3/5	90
1-5-3	Nal	99 kDa	1/3/5	106
	Nal	99 kDa	1/0,55/5	31
	Nal	99 kDa	1/0,33/5	16
	Nal	25 kDa	1/3/5	105
	Nal	25 kDa	1/0,55/5	36
	Nal	25 kDa	1/0,33/5	18
1-5-4	APBA	99 kDa	1/3/5	99
1-5-5	Cha	99 kDa	1/3/5	99
	Cha	99 kDa	1/0,33/5	26
	Cha	25 kDa	1/3/5	99
	Cha	25 kDa	1/0,33/5	29
1-5-6	AMBA	99 kDa	1/3/5	102
	AMBA	25 kDa	1/3/5	101
1-5-7	3AMBA	99 kDa	1/3/5	100
	3AMBA	25 kDa	1/3/5	101
1-5-8	APhPA	99 kDa	1/3/5	101
	APhPA	25 kDa	1/3/5	100
1-5-9	AEB	99 kDa	1/3/5	99
	AEB	99 kDa	1/0,33/5	26
	AEB	25 kDa	1/3/5	101
	AEB	25 kDa	1/0,33/5	33
1-5-10	AMCIBA	99 kDa	1/3/5	99
	AMCIBA	99 kDa	1/0,33/5	22
	AMCIBA	25 kDa	1/3/5	97
	AMCIBA	25 kDa	1/0,33/5	22
1-5-11	AMSA	99 kDa	1/3/5	97
	AMSA	25 kDa	1/3/5	95
1-5-12	4AMCHCA	25 kDa	1/3/5	105
1-5-13	Chg	25 kDa	1/3/5	103
	Chg	25 kDa	1/0,33/5	32
1-5-14	pHPhg	99 kDa	1/3/5	103
	pHPhg	99 kDa	1/0,33/5	28

**(Ejemplo comparativo 1-1) Síntesis de derivados de HA marcados con FL de HA-TBA o HA-FL/TBA****(Ejemplo comparativo 1-1-1) Síntesis de un HA marcado con FL (HA-FL)**

5 Se preparó una solución en DMSO anhidro (5 mg/ml) de HA-TBA sintetizada usando HA-Na (99 kDa) como material de partida en el Ejemplo 1-2. A continuación, se añadieron 2,2'-(etilendioxi)bis(etilamina) (EDOBEA, Sigma-Aldrich) y BOP (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), en este orden, a una relación equivalente de unidad de HA/EDOBEA = 1/0,2/50 (mol/mol/mol), y se realizó agitación a temperatura ambiente durante toda la noche. La solución de reacción se dializó (Spectra/Por 4, corte del peso molecular (COPM): 12-14 kDa) contra una solución acuosa de NaCl 0,3 M y agua ultrapura, en este orden, y, a continuación, el dializado se liofilizó, para dar HA-EDOBEA con un grado de modificación bajo.

15 La figura 5-1 muestra el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  obtenido mediante análisis de HA-EDOBEA con un grado de modificación bajo en las mismas condiciones que se han descrito en el Ejemplo 1-3. El grado de modificación de la unidad de HA con EDOBEA se calculó a partir del valor integrado del pico derivado de acetilo en HA glucosamina (-COCH<sub>3</sub>, 2,0 ppm; 3H) y el valor integrado del pico derivado de metileno terminal en EDOBEA (-CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, 3,2 ppm; 2H) usando el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1-3 (Tabla 3).

20 Después, el HA-EDOBEA resultante con un grado de modificación bajo se disolvió en agua ultrapura para dar una concentración de 10 mg/ml y, después, la solución se diluyó 2 veces con una solución de tampón fosfato 100 mM (pH 7,4) para preparar una solución de 5 mg/ml. A esta solución se añadió NHS-fluoresceína (éster succinimidílico de 5/6-carboxifluoresceína, NHS-FL, PIERCE) como una solución en DMSO en una cantidad de 0,1 equivalentes molares con respecto a la unidad de HA y se realizó agitación a temperatura ambiente durante una hora. A continuación, se añadió anhídrido succínico (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) como una solución en DMSO en una cantidad de 40 equivalentes molares con respecto a la unidad de HA y se realizó agitación adicional durante una hora para tratar el amino terminal en exceso de EDOBEA con ácido succínico. La solución de reacción se dializó (Spectra/Por 4, corte del peso molecular (COPM): 12-14 kDa) contra una solución acuosa de NaCl 0,3 M y agua ultrapura, en este orden, en condiciones de oscuridad y, a continuación, el dializado se liofilizó, para dar HA-FL (HA con un grado de modificación bajo) en forma de un sólido de color amarillo.

30 La figura 5-1 muestra también el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  obtenido mediante análisis del producto en las mismas condiciones que se han descrito en el Ejemplo 1-3.

35 El producto se disolvió en una solución de tampón carbonato 50 mM (pH 9,0) a una concentración de 0,05 mg/ml y el contenido de FL por peso se cuantificó a partir de la absorbancia a 491 nm, calculando de este modo el grado de modificación de la unidad de HA con FL (Tabla 3).

**(Ejemplo comparativo 1-1-2) Síntesis de un derivado de HA modificado con EDOBEA (HA-EDOBEA-Ac/FL)**

40 Se realizó el mismo procedimiento que en el Ejemplo comparativo 1-1-1 excepto que se añadieron los reactivos a una realización de unidad de HA/BOP/EDOBEA = 1/2,5/50 (mol/mol/mol); de este modo, se obtuvo HA-EDOBEA con un grado de modificación alto.

45 La figura 5-2 muestra el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  obtenido mediante análisis de HA-EDOBEA con un grado de modificación alto en las mismas condiciones que se han descrito en el Ejemplo 1-3. Para analizar la solución, se añadió NaOD a una concentración de 0,0046N para hacer que la solución sea alcalina. El grado de modificación de la unidad de HA con EDOBEA se calculó a partir del valor integrado del pico derivado de acetilo en HA glucosamina (-COCH<sub>3</sub>, 2,0 ppm; 3H) y el valor integrado del pico derivado de metileno terminal en EDOBEA (-CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, 2,8 ppm; 2H) usando el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1-3 (Tabla 3).

50 Después, el HA-EDOBEA resultante con un grado de modificación alto se disolvió en agua ultrapura, para dar una concentración de 10 mg/ml y, después, la solución se diluyó 2 veces con una solución de tampón fosfato 100 mM (pH 7,4) para preparar una solución de 5 mg/ml. A esta solución se añadió NHS-fluoresceína como una solución en DMSO en una cantidad de 0,04 equivalentes molares con respecto a la unidad de HA y se realizó agitación a temperatura ambiente durante una hora. A continuación, se añadió anhídrido acético (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) en una cantidad de 40 equivalentes molares con respecto a la unidad de HA y se realizó agitación adicional durante una hora para acetilar el amino terminal en exceso de EDOBEA. La solución de reacción se dializó (Spectra/Por 4, corte del peso molecular (COPM): 12-14 kDa) contra una solución acuosa de NaCl 0,3 M y agua ultrapura, en este orden, en condiciones de oscuridad y, a continuación, el dializado se liofilizó, para dar HA-EDOBEA-Ac/FL como un sólido de color amarillo.

55 La figura 5-2 muestra también el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  obtenido mediante análisis del producto en las mismas condiciones que se han descrito en el Ejemplo 1-3. El grado de modificación de la unidad de HA de este producto con FL se determinó mediante el mismo procedimiento como en el Ejemplo comparativo 1-1-1 (Tabla 3).

65

[Tabla 3]

Tabla 3 Cantidades de los reactivos utilizados para sintetizar derivados de HA y resultados de síntesis

N.º Ej. comp.	Producto de interés	Relación de adición de los reactivos usados para sintetizar HA-EDOBEA (unidad de HA/EDOBEA)	Grado de modificación con EDOBEA (%)	Grado de modificación con FL (%)
1-1-1	HA-FL	1/0,2/50	13	7
1-1-2	HA-EDOBEA - Ac/FL	1/2,5/50	82	3

#### 5 (Ejemplo comparativo 1-1-3) Síntesis de un derivado de HA modificado con L-fenilalanina (Phe) (HA-Phe/FL)

Se realizó el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1-4-1, excepto que se usó clorhidrato de éster etílico de L-fenilalanina (Sigma-Aldrich) en lugar de clorhidrato de éster etílico de L-alanina; de este modo, se proporcionó HA-Phe/FL en forma de un sólido de color amarillo.

10 La figura 5-3 muestra el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  obtenido mediante análisis del producto en las mismas condiciones que se han descrito en el Ejemplo 1-3. El grado de modificación de la unidad de HA con fenilalanina se calculó a partir del valor integrado del pico derivado de acetilo en HA glucosamina ( $-\text{COCH}_3$ , 2,0 ppm; 3H) y el valor integrado de los picos derivados de fenilo en fenilalanina ( $-\text{C}_6\text{H}_5$ , 7,2-7,4 ppm; 5H) usando el mismo procedimiento que en el

15 Ejemplo 1-4-1 (Tabla 4).

#### (Ejemplo comparativo 1-1-4) Síntesis de un derivado de HA modificado con L-tirosina (Tyr) (HA-Tyr/FL)

20 Se llevó a cabo el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1-4-4, excepto que se usó clorhidrato de éster etílico de L-tirosina (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) en lugar de clorhidrato de éster etílico de glicina; de este modo, se proporcionó HA-Tyr/FL en forma de un sólido de color amarillo.

25 La figura 5-4 muestra el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  obtenido mediante análisis del producto en las mismas condiciones que se han descrito en el Ejemplo 1-3. El grado de modificación de la unidad de HA con tirosina se calculó a partir del valor integrado del pico derivado de acetilo en HA glucosamina ( $-\text{COCH}_3$ , 2,0 ppm; 3H) y el valor integrado de los picos derivados de hidroxifenilo en tirosina ( $-\text{C}_6\text{H}_4\text{ OH}$ , 6,8 7,2 ppm; 4H) usando el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1-4-1 (Tabla 4).

#### 30 (Ejemplo comparativo 1-1-5) Síntesis de un derivado de HA modificado con $\alpha$ -metil-DL-fenilalanina (MePhe) (HA-MePhe/FL)

35 Se llevó a cabo el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1-4-4, excepto que se usó clorhidrato de éster metílico de MePhe (Watanabe Chemical Industries, Ltd.) en lugar de clorhidrato de éster etílico de glicina y que se llevó a cabo desprotección del carboxi usando NaOH 5N a pH 13,2; de este modo, se proporcionó HA-MePhe/FL en forma de un sólido de color amarillo.

40 La figura 5-5 muestra el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  obtenido mediante análisis del producto en las mismas condiciones que se han descrito en el Ejemplo 1-3. El grado de modificación de la unidad de HA con MePhe se calculó a partir del valor integrado del pico derivado de acetilo en HA glucosamina ( $-\text{COCH}_3$ , 2,0 ppm; 3H) y el valor integrado del pico derivado de metilo en MePhe ( $-\text{CH}_3$ , 1,5 ppm; 3H) usando el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1-4-1 (Tabla 4).

#### 45 (Ejemplo comparativo 1-1-6) Síntesis de un derivado de HA modificado con éster metílico de L-prolina (Pro-OMe) (HA-Pro-OMe/FL)

Se llevó a cabo el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1-4-4, excepto que se usó clorhidrato de Pro-OMe (Sigma-Aldrich) en lugar de clorhidrato de éster etílico de glicina y que no se llevó a cabo desprotección de carboxi; de este modo, se proporcionó HA-Pro-OMe/FL en forma de un sólido de color amarillo.

50 La figura 5-6 muestra el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  obtenido mediante análisis del producto en las mismas condiciones que se han descrito en el Ejemplo 1-3. El grado de modificación de la unidad de HA con Pro-OMe se calculó a partir del valor integrado del pico derivado de acetilo en HA glucosamina ( $-\text{COCH}_3$ , 2,0 ppm; 3H) y el valor integrado del pico para 1H derivado del anillo de pirrolidina en Pro-OMe ( $-\text{CHCOO}-$ , 2,4 ppm; 1H) usando el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1-4-1 (Tabla 4). Dado que el pico derivado de acetilo en HA glucosamina solapaba con los picos

55 derivados para los otros hidrógenos en el grupo de pirrolidona (3H), el valor integrado del pico a 2,4 ppm multiplicado por 3 se restó del valor integrado de los picos a de 1,8 a 2,2 ppm y el valor resultante se tomó como el pico derivado de acetilo en HA glucosamina y se usó para el cálculo del grado de modificación.

**(Ejemplo comparativo 1-1-7) Síntesis de derivados de HA modificados con glicinamida (Gly-NH<sub>2</sub>) (HA-Gly-NH<sub>2</sub> y HA-Gly-NH<sub>2</sub>/Rh)**

Se llevó a cabo el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1-4-15, excepto que se usó clorhidrato de glicinamida (Watanabe Chemical Industries, Ltd.) en lugar de clorhidrato de L-alaninamida; de este modo, se proporcionó HA-Gly-NH<sub>2</sub> en forma de un sólido de color blanco o HA-Gly-NH<sub>2</sub>/Rh en forma de un sólido de color rojo.

La figura 5-7 muestra el espectro de RMN de <sup>1</sup>H obtenido mediante análisis del producto en las mismas condiciones que se han descrito en el Ejemplo 1-3. El grado de modificación de la unidad de HA con glicinamida se calculó a partir del valor integrado del pico derivado de acetilo en HA glucosamina (-COCH<sub>3</sub>, 2,0 ppm; 3H) y el valor integrado del pico derivado de metileno en glicinamida (-CH<sub>2</sub>-; 2H) usando el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1-4-1 (Tabla 4). Dado que el pico derivado de metileno en glicinamida solapaba con los picos para las posiciones 2-5 de ácido glucurónico (4H), aquellos para las posiciones 2-6 de glucosamina (6H) y los derivados de EDOBEA (12H), el valor integrado del pico en 2,0 ppm multiplicado por 10/3, así como el valor integrado del pico a 2,0 ppm multiplicado por (grado de modificación de EDOBEA) 12/3 se restaron del valor integrado de los picos a 3,2 a 4,2 ppm y el valor resultante se tomó como el pico derivado de metileno en glicinamida y se usó para el cálculo del grado de modificación. El grado de modificación de EDOBEA se calculó mediante el mismo procedimiento como en el Ejemplo comparativo 1-1-2.

**(Ejemplo comparativo 1-1-8) Síntesis de derivados de HA modificados con L-serinamida (Ser-NH<sub>2</sub>) (HA-Ser-NH<sub>2</sub> y HA-Ser-NH<sub>2</sub>/Rh)**

Se llevó a cabo el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1-4-15, excepto que se usó clorhidrato de L-serinamida (Watanabe Chemical Industries, Ltd.) en lugar de clorhidrato de L-alaninamida; de este modo, se proporcionó HA-Ser-NH<sub>2</sub> en forma de un sólido de color blanco o HA-Ser-NH<sub>2</sub>/Rh en forma de un sólido de color rojo.

La figura 5-8 muestra el espectro de RMN de <sup>1</sup>H obtenido mediante análisis del producto en las mismas condiciones que se han descrito en el Ejemplo 1-3. El grado de modificación de la unidad de HA con serinamida se calculó a partir del valor integrado del pico derivado de acetilo en HA glucosamina (-COCH<sub>3</sub>, 2,0 ppm; 3H) y el valor integrado del pico derivado de metileno serinamida (-CH<sub>2</sub>-; 2H) usando el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1-4-1 (Tabla 4). Dado que el pico derivado de metileno en serinamida solapaba con los picos para las posiciones 2-5 de ácido glucurónico (4H), aquellos para las posiciones 2-6 de glucosamina (6H) y los derivados de EDOBEA (12H), el valor integrado del pico derivado de metileno en serinamida se calculó mediante el mismo procedimiento que en el ejemplo comparativo 1-1-7.

**(Ejemplo comparativo 1-1-9) Síntesis de derivados de HA modificados con L-leucinamida (Leu-NH<sub>2</sub>) (HA-Leu-NH<sub>2</sub> y HA-Leu-NH<sub>2</sub>/Rh)**

Se llevó a cabo el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1-4-15, excepto que se usó clorhidrato de L-leucinamida (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) en lugar de clorhidrato de L-alaninamida; de este modo, se proporcionó HA-Leu-NH<sub>2</sub> en forma de un sólido de color blanco o HA-Leu-NH<sub>2</sub>/Rh en forma de un sólido de color rojo.

La figura 5-9 muestra el espectro de RMN de <sup>1</sup>H obtenido mediante análisis del producto en las mismas condiciones que se han descrito en el Ejemplo 1-3. El grado de modificación de la unidad de HA con leucinamida se calculó a partir del valor integrado del pico derivado de acetilo en HA glucosamina (-COCH<sub>3</sub>, 2,0 ppm; 3H) y el valor integrado del pico derivado de dos metilos en leucinamida (-CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 0,9 ppm; 6H) usando el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1-4-1 (Tabla 4).

**(Ejemplo comparativo 1-1-10) Síntesis de derivados de HA modificados con L-isoleucinamida (Ile-NH<sub>2</sub>) (HA-Ile-NH<sub>2</sub> y HA-Ile-NH<sub>2</sub>/Rh)**

Se llevó a cabo el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1-4-15, excepto que se usó clorhidrato de L-isoleucinamida (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) en lugar de clorhidrato de L-alaninamida; de este modo, se proporcionó HA-Ile-NH<sub>2</sub> en forma de un sólido de color blanco o HA-Ile-NH<sub>2</sub>/Rh en forma de un sólido de color rojo.

La figura 5-10 muestra el espectro de RMN de <sup>1</sup>H obtenido mediante análisis del producto en las mismas condiciones que se han descrito en el Ejemplo 1-3. El grado de modificación de la unidad de HA con isoleucinamida se calculó a partir del valor integrado del pico derivado de acetilo en HA glucosamina (-COCH<sub>3</sub>, 2,0 ppm; 3H) y el valor integrado del pico derivado de dos metilos en isoleucinamida (-CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, 0,9 ppm; 6H) usando el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1-4-1 (Tabla 4). Dado que el pico derivado de acetilo en HA glucosamina solapaba con el pico para el hidrógeno en la posición 3 de isoleucinamida (-CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, 1,9 ppm; 1H), el valor integrado del pico a 0,9 ppm multiplicado por 1/6 se restó del valor integrado de los picos a de 1,8 a 2,2 ppm y el valor resultante se tomó como el pico derivado de acetilo en HA glucosamina y se usó para el cálculo del grado de modificación.

**(Ejemplo comparativo 1-1-11) Síntesis de derivados de HA modificados con L-treoninamida (Thr-NH<sub>2</sub>) (HA-**

**Thr-NH<sub>2</sub> y HA-Thr-NH<sub>2</sub>/Rh)**

Se llevó a cabo el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1-4-15, excepto que se usó clorhidrato de L-treoninamida (Watanabe Chemical Industries, Ltd.) en lugar de clorhidrato de L-alaninamida; de este modo, se proporcionó HA-Thr-NH<sub>2</sub> en forma de un sólido de color blanco o HA-Thr-NH<sub>2</sub>/Rh en forma de un sólido de color rojo.

La figura 5-11 muestra el espectro de RMN de <sup>1</sup>H obtenido mediante análisis del producto en las mismas condiciones que se han descrito en el Ejemplo 1-3. El grado de modificación de la unidad de HA con treoninamida se calculó a partir del valor integrado del pico derivado de acetilo en HA glucosamina (-COCH<sub>3</sub>, 2,0 ppm; 3H) y el valor integrado del pico derivado de metilo en treoninamida (-CH<sub>3</sub>, 1,2 ppm; 3H) usando el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1-4-1 (Tabla 4).

**(Ejemplo comparativo 1-1-12) Síntesis de derivados de HA modificados con L-glutaminamida (Gln-NH<sub>2</sub>) (HA-Gln-NH<sub>2</sub> y HA-Gln-NH<sub>2</sub>/Rh)**

Se llevó a cabo el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1-4-15, excepto que se usó clorhidrato de L-glutaminamida (Kokusai Chemical Co., Ltd.) en lugar de clorhidrato de L-alaninamida; de este modo, se proporcionó HA-Gln-NH<sub>2</sub> en forma de un sólido de color blanco o HA-Gly-NH<sub>2</sub>/Rh en forma de un sólido de color rojo.

La figura 5-12 muestra el espectro de RMN de <sup>1</sup>H obtenido mediante análisis del producto en las mismas condiciones que se han descrito en el Ejemplo 1-3. El grado de modificación de la unidad de HA con glutaminamida se calculó a partir del valor integrado del pico derivado de acetilo en HA glucosamina (-COCH<sub>3</sub>, 2,0 ppm; 3H) y el valor integrado del pico derivado de metileno en glutaminamida (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CONH<sub>2</sub>, 2,4 ppm; 2H) usando el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1-4-1 (Tabla 4). Dado que el pico derivado de acetilo en HA glucosamina solapaba con el pico derivado para metileno en glutaminamida (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>, 2,1 ppm; 2H), el valor integrado del pico a 2,4 ppm se restó del valor integrado de los picos a de 1,8 a 2,2 ppm y el valor resultante se tomó como el pico derivado de acetilo en HA glucosamina y se usó para el cálculo del grado de modificación.

[Tabla 4]

30

Tabla 4 Grados de modificación de los derivados de HA sintetizados (99 kDa)

N.º Ej. comp.	Compuesto de modificación	Grado de modificación con derivado de ácido amino-carboxílico (%)
1-1-3	Phe/FL	88
1-1-4	Tyr/FL	97
1-1-5	MePhe/FL	80
1-1-6	Pro-OMe/FL	78
1-1-7	Gly-NH <sub>2</sub>	99
	Gly-NH <sub>2</sub> /Rh	93
1-1-8	Ser-NH <sub>2</sub>	98
	Ser-NH <sub>2</sub> /Rh	93
1-1-9	Leu-NH <sub>2</sub>	98
	Leu-NH <sub>2</sub> /Rh	83
1-1-10	Ile-NH <sub>2</sub>	95
	Ile-NH <sub>2</sub> /Rh	83
1-1-11	Thr-NH <sub>2</sub>	97
	Thr-NH <sub>2</sub> /Rh	85
1-1-12	Gln-NH <sub>2</sub>	93
	Gln-NH <sub>2</sub> /Rh	81

**(Ejemplo comparativo 1-2) Síntesis de derivados de HA a partir de HA-TBA****35 (Ejemplo comparativo 1-2-1) Síntesis de derivados de HA modificados con L-norleucina (Nle) (HA-Nle)**

Se realizó el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1-5-1, excepto que se usó clorhidrato de éster metílico de L-

norleucina (Cha-OMe-HCl, Bachem) en lugar de AMCHCA-OMe-HCl; de este modo, se proporcionaron los productos de interés (HA-Nle) en forma de un sólido de color blanco. Las relaciones de adición de los reactivos se muestran en la Tabla 5.

- 5 La figura 6-1 muestra el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de un ejemplo representativo de los productos, que se obtuvo mediante análisis en  $\text{D}_2\text{O}$  del producto sintetizado usando HA-Na con un PM de 99 kDa en presencia de los reactivos a la relación de unidad de HA-TBA/DMT-MM/Cha-OMe-HCl = 1/3/5. El grado de modificación de la unidad de HA con Nle se calculó a partir del valor integrado del pico derivado de acetilo en HA glucosamina (-COCH<sub>3</sub>, 2,0 ppm; 3H) y el valor integrado del pico derivado de metilo en Nle (-CH<sub>3</sub>, 0,9 ppm; 3H) usando el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1-4-1 (Tabla 5).

**(Ejemplo comparativo 1-2-2) Síntesis de un derivado de HA modificado con L-leucina terciaria (tLeu) (HA-tLeu)**

- 15 Se realizó el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1-5-1, excepto que se usó clorhidrato de éster metílico de L-leucina terciaria (tLeu-OMe-HCl, Fluka) en lugar de AMCHCA-OMe-HCl; de este modo, se proporcionaron los productos de interés (HA-tLeu) en forma de un sólido de color blanco. Las relaciones de adición de los reactivos se mostraron en la Tabla 5.
- 20 La figura 6-2 muestra el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de un ejemplo representativo de los productos, que se obtuvo mediante análisis en  $\text{D}_2\text{O}$  del producto sintetizado usando HA-Na con un PM de 99 kDa en presencia de los reactivos a la relación de unidad de HA-TBA/DMT-MM/Cha-OMe-HCl = 1/3/5. El grado de modificación de la unidad de HA con tLeu se calculó a partir del valor integrado del pico derivado de acetilo en HA glucosamina (-COCH<sub>3</sub>, 2,0 ppm; 3H) y el valor integrado del pico derivado de tres metilos en tLeu (-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, 1,0 ppm; 9H) usando el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1-4-1 (Tabla 5).

**(Ejemplo comparativo 1-2-3) Síntesis de derivados de HA modificados con para-fluorofenilalanina (pF-Phe) (HA-pFPhe)**

- 30 Se realizó el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1-5-1, excepto que se usó clorhidrato de éster etílico de para-fluorofenilalanina (tLeu (pFPhe-OEt-HCl, Bachem) en lugar de AMCHCA-OMe-HCl y que se llevó a cabo desprotección del carboxi usando NaOH 5N a pH 13,2; de este modo, se proporcionaron los productos de interés (HA-pFPhe) en forma de un sólido de color blanco.
- 35 La figura 6-3 muestra el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de un ejemplo representativo de los productos, que se obtuvo mediante análisis en  $\text{D}_2\text{O}$  del producto sintetizado usando HA-Na con un PM de 99 kDa en presencia de los reactivos a la relación de unidad de HA-TBA/DMT-MM/Phe-OEt-HCl = 1/3/5. El grado de modificación de la unidad de HA con pFPhe se calculó a partir del valor integrado del pico derivado de acetilo en HA glucosamina (-COCH<sub>3</sub>, 2,0 ppm; 3H) y el valor integrado de los picos derivados del anillo aromático en pFPhe (-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>F, 7,1, 7,3 ppm; 4H) usando el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1-4-1 (Tabla 5).

**(Ejemplo comparativo 1-2-4) Síntesis de derivados de HA modificados con (s)-(+)-2-fenilglicina (Phg) (HA-Phg)**

- 45 Se realizó el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1-5-1, excepto que se usó clorhidrato de éster metílico de (s)-(+)-2-fenilglicina (Phg-OMe-HCl, Sigma-Aldrich) en lugar de AMCHCA-OMe-HCl; de este modo, se proporcionaron los productos de interés (HA-Phg) en forma de un sólido de color blanco.
- 50 La figura 6-4 muestra el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de un ejemplo representativo de los productos, que se obtuvo mediante análisis en  $\text{D}_2\text{O}$  del producto sintetizado usando HA-Na con un PM de 99 kDa en presencia de los reactivos a la relación de unidad de HA-TBA/DMT-MM/Phg-OMe-HCl = 1/3/5. El grado de modificación de la unidad de HA con Phg se calculó a partir del valor integrado del pico derivado de acetilo en HA glucosamina (-COCH<sub>3</sub>, 2,0 ppm; 3H) y el valor integrado de los picos derivados del anillo aromático en Phg (-C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>, 7,3-7,5 ppm; 5H) usando el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1-4-1 (Tabla 5).

[Tabla 5]

Tabla 5 Cantidades de los reactivos utilizados para sintetizar derivados de HA y resultados de síntesis

N.º Ej. comp.	Compuesto de modificación	Peso molecular de HA	Relación de adición molar del compuesto de modificación y DMT-MM (unidad de HA-TBA/DMT-MM/compuesto de modificación)	Grado de modificación (%)
1-2-1	Nle	99 kDa	1/3/5	103
	Nle	25 kDa	1/3/5	100

N.º Ej. comp.	Compuesto de modificación	Peso molecular de HA	Relación de adición molar del compuesto de modificación y DMT-MM (unidad de HA-TBA/DMT-MM/compuesto de modificación)	Grado de modificación (%)
1-2-2	tLeu	99 kDa	1/3/5	105
	tLeu	25 kDa	1/3/5	107
1-2-3	pFPhe	99 kDa	1/3/5	108
	pFPhe	25 kDa	1/3/5	109
1-2-4	Phg	99 kDa	1/3/5	97
	Phg	25 kDa	1/3/5	103

### (Ejemplo comparativo 1-3) Síntesis de a derivado de PEG marcado con FL (PEG-FL)

Se disolvió PEG (MEPA-30T, NOF Corporation) en agua ultrapura para dar una concentración de 10 mg/ ml, y, después, la solución se diluyó 2 veces con una solución de tampón fosfato 100 mM (pH 7,4) para preparar una solución de 5 mg/ml. A esta solución se añadió NHS-fluoresceína (NHS-FL, PIERCE) como una solución en DMSO en una cantidad de 15 equivalentes molares al extremo terminal de PEG y se realizó agitación a temperatura ambiente durante toda la noche. Después de la solución de reacción se volvió a precipitar con éter dietílico, el precipitado se recogió mediante filtración y se disolvió de nuevo en agua ultrapura, la solución se dializó (Spectra/Por 4, corte del peso molecular (COPM): 12-14 kDa) contra agua ultrapura en exceso grande y el dializado se liofilizó, para dar el producto de interés (PEG-FL) en forma de un sólido de color amarillo.

La figura 7 muestra el espectro de RMN de <sup>1</sup>H obtenido mediante análisis del producto en las mismas condiciones que se han descrito en el Ejemplo 1-3. Los hallazgos del pico derivado de un extremo terminal de PEG (-OCH<sub>3</sub>, 3,4 ppm, 3H) y los picos derivados de fluoresceína (7-8 ppm) demostraron la modificación del extremo terminal de PEG con FL.

### [Ejemplo 2] Confirmación *in vitro* de biodegradabilidad

Se confirmaron las resistencias de las muestras incubadas en ciertas condiciones con hialuronidasa SD (Hyase, Seikagaku Corporation).

Se determinaron algunos de los productos obtenidos en el Ejemplo 1-4 y el Ejemplo Comparativo 1-1. Se usaron soluciones acuosas de cinco (5) o 20 mg/ ml de los productos como muestras de análisis y una solución acuosa de 5 mg/ ml de HA- Na como muestra patrón. Las muestras se diluyeron 10 veces con PBS o plasma de rata. Las muestras diluidas con PBS se incubaron cada una a 37 °C durante 0 horas, 24 horas, o 1 semana, respectivamente, y las muestras diluidas en plasma se incubaron a 37 °C durante 24 horas. Cada una de las muestras se dividió en dos alícuotas. Una alícuota se mezcló a una relación de agua de muestra/agua ultrapura/solución de tampón fosfato 0,2 M (pH 6,2)/solución de tampón fosfato 0,2 M (pH 6,2) que contenía Hyase (0,5 U/ml) = 2/1/2/1 y la mezcla resultante se puso en uso como una muestra tratada con Hyase. La otra alícuota se mezcló a una relación de muestra/agua ultrapura/solución de tampón fosfato 0,2 M (pH 6,2) = 2/1/3 y la mezcla resultante se puso en uso como una muestra no tratada con Hyase. Después de incubar las muestras respectivas a 37 °C durante la noche, se cuantificaron los contenidos de N-acetilglucosamina terminal reductora en las muestras mediante el método Reissig descrito a continuación. Las muestras derivadas de la muestra estándar se diluyeron 1,3, 10, 30, 100 y 300 veces, respectivamente, para asegurar que las composiciones de los disolventes no se cambiaron. A continuación, las respectivas muestras resultantes, puestas en uso como muestras de curva de calibración, se sometieron a coloración mediante el mismo procedimiento.

Las muestras tratadas con Hyase obtenidas de este modo, las muestras no tratadas con Hyase y las muestras de la curva de calibración se mezclaron cada una a una relación de la muestra /solución tampón de borato 0,8M (pH 9,1)/1 N KOH = 25/5/2. Las mezclas resultantes se calentaron cada una en un baño de agua en ebullición durante 3 minutos y, después, se introdujeron en hielo inmediatamente. Después, se disolvió p-dimetilaminobenzaldehído en una solución mixta (1:70) de HCl 10N y ácido acético para proporcionar un reactivo (10 mg/ ml). Las muestras anteriores se mezclaron cada una con el reactivo en una relación de 32:150 y las mezclas resultantes se incubaron cada una a 37 °C durante 20 minutos y, después, se introdujeron en hielo inmediatamente. Después de que las temperaturas de las muestras retornaron a la temperatura ambiente se determinó la absorbancia a 544 nm inmediatamente. Utilizando los valores obtenidos restando las absorbancias de las muestras no tratadas con Hyase de las de las muestras tratadas con Hyase, se construyó una curva de calibración para calcular las concentraciones de N-acetilglucosamina terminal reductora en las respectivas muestras, con lo que los grados de degradación se determinaron a partir de la siguiente ecuación (Tabla 6):

$$(\text{grado de degradación}) = \frac{[\text{Fórmula 27}] \cdot 100}{\left( \frac{\text{concentración de la N-acetilglucosamina terminal reductora}}{\text{concentración de las unidades de repetición de disacárido determinada mediante RMN de } ^1\text{H}} \right)}$$

5 Además, la muestra estándar degradó HA-Na completamente (100 %) en estas condiciones. Al grado de degradación del 1 %, se estima que el HA con un PM de 100 kDa se escinde en 2,5 posiciones por molécula, lo que da como resultado una disminución en el peso molecular hasta 40 kDa.

10 En cuanto a HA-EDOBEA-Ac/FL (Ejemplo comparativo 1-1-2), se realizó análisis mediante cromatografía de exclusión por tamaño como se ha descrito en el Ejemplo 3-3-2, pero no se observó ningún compuesto inyectado con peso molecular reducido en la muestra de orina, lo que confirma la ausencia de biodegradabilidad y los resultados de este ensayo tampoco mostraron degradabilidad con Hyase. Por otro lado, todos los demás derivados de HA mostraron degradabilidad.

15 En particular, las muestras de los ejemplos 1-4-1 a 1-4-6, 1-4-8 a 1-4-11, 1-4-14 a 1-4-16, 1-4-18, y 1-4-19 que se trataron con plasma de rata durante un día mostraron una degradabilidad aumentada en comparación con las muestras que se trataron con PBS durante un día; esto hizo concebible que estos derivados se alteraran hasta producir formas más sensibles a la degradación mediada por Hyase liberando compuestos de modificación en un entorno biológico.

20 [Tabla 6-1]

Tabla 6 Resultados de una evaluación in vitro de las biodegradabilidades de los derivados de HA

N.º ej./N.º ej. comp.	Compuesto de modificación	Grado de degradación inicial (%)	Grado de degradación después del tratamiento con PBS durante un día (%)	Grado de degradación después del tratamiento con PBS durante 7 días (%)	Grado de degradación después del tratamiento con plasma de rata durante un día (%)
Ej. 1-4-1	Ala/FL	0,92	0,96	0,92	3,19
Ej. 1-4-2	Ser/FL	0,63	0,61	0,54	2,17
Ej. 1-4-3	Glu/FL	2,45	2,54	2,40	6,92
Ej. 1-4-4	Gly	1,06	1,09	1,21	2,73
Ej. 1-4-5	Val	0,27	0,23	0,26	0,61
Ej. 1-4-6	Leu	3,43	2,81	3,24	6,01
Ej. 1-4-7	He	0,42	0,34	0,59	n.d.
Ej. 1-4-8	Thr	0,11	0,12	0,23	1,02
Ej. 1-4-9	Asp	0,26	0,29	0,22	0,88
Ej. 1-4-10	cACHCA/FL	0,54	0,36	0,19	1,11
Ej. 1-4-11	tACHCA-O Et/FL	1,14	0,85	0,65	1,69
Ej. 1-4-12	Aib/FL	3,57	3,56	3,18	3,03
Ej. 1-4-13	ACBuCA-O Et/FL	0,30	0,19	0,44	n.d.
Ej. 1-4-14	Asn	0,26	0,10	n.d.	0,90
Ej. 1-4-15	Ala-NH <sub>2</sub>	n.d.	0,22	n.d.	2,07
Ej. 1-4-16	Val-NH <sub>2</sub>	n.d.	0,88	0,72	2,28
Ej. 1-4-17	Asn-NH <sub>2</sub>	n.d.	n.d.	0,23	n.d.
Ej. 1-4-18	Me	0,31	0,33	0,32	0,68
Ej. 1-4-19	Pr	0,19	0,09	0,10	0,46
Ej. comp. 1-1-2	EDOBEA-Ac/FL	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

N.º ej./N.º ej. comp.	Compuesto de modificación	Grado de degradación inicial (%)	Grado de degradación después del tratamiento con PBS durante un día (%)	Grado de degradación después del tratamiento con PBS durante 7 días 7 días (%)	Grado de degradación después del tratamiento con plasma de rata durante un día (%)
Ej. comp. 1-1-3	Phe/FL	1,74	1,84	1,82	4,75

[Tabla 6-2]

Ej. comp. 1-1-4	Tyr/FL	0,23	0,13	0,19	0,98
Ej. comp. 1-1-5	MePhe/FL	7,49	5,57	6,06	5,25
Ej. comp. 1-1-6	Pro-OMe/FL	8,12	10,03	8,94	7,92
Ej. comp. 1-1-7	Gly-NH <sub>2</sub>	1,04	0,11	0,30	1,58
Ej. comp. 1-1-8	Ser-NH <sub>2</sub>	n.d.	0,91	n.d.	2,23
Ej. comp. 1-1-9	Leu-NH <sub>2</sub>	0,50	0,92	0,79	2,17
Ej. comp. 1-1-10	Ile-NH <sub>2</sub>	n.d.	0,93	0,34	3,53
Ej. comp. 1-1-11	Thr-NH <sub>2</sub>	1,29	n.d.	0,24	1,52
Ej. comp. 1-1-12	Gln-NH <sub>2</sub>	n.d.	0,17	n.d.	0,91

\* "n.d. (no determinado)" representa que el grado de degradación no se pudo calcular debido a que la concentración de N-acetilglucosamina terminal reductora estaba por debajo del límite inferior de cuantificación.

### 5 [Ejemplo 3] Confirmación in vivo de la permanencia en sangre y la biodegradabilidad (Ejemplo 3-1) Muestras biológicas de ratas tratadas con derivado de HA

Los compuestos obtenidos en el Ejemplo 1-4 y el Ejemplo comparativo 1-1 y los compuestos obtenidos en Ejemplo comparativo 1-3 se administraron por vía intravenosa a ratas a dosis únicas de 20 y 10 mg/kg, respectivamente. Cinco (5) minutos y 2, 7, 24, 48, 72, 168, 240 y 336 horas después del tratamiento, se obtuvieron muestras de sangre de la vena yugular usando jeringas tratadas con heparina sódica y se sometieron a centrifugación para obtener plasma. Las muestras de plasma se crioconservaron por debajo de -20 °C hasta el análisis. Las muestras de orina se recogieron utilizando jaulas metabólicas de 0 a 24 horas, 24 a 48 horas, 48 a 72 horas, 72 a 96 horas, 168 a 192 horas, 240 a 264 horas, y 336 a 360 horas después del tratamiento. Se midieron las cantidades de orina y una parte de las respectivas muestras se crioconservaron por debajo de -20 °C hasta el análisis.

### 15 (Ejemplo 3-2) Análisis de las muestras de plasma de las ratas tratadas con derivados de HA (Ejemplo 3-2-1) Preparación de muestras de análisis

#### 20 (Ejemplo 3-2-1) Preparación de muestras de análisis

Las muestras de plasma se descongelaron, se agitaron y se centrifugaron para recoger los sobrenadantes. Los sobrenadantes se diluyeron con una solución tampón (HA marcado con FL: solución de tampón fosfato (pH 8,0, I=0,15); HA marcado con Rh: PBS). Las soluciones de administración se diluyeron con una solución mixta (3:1) de una solución tampón y plasma de rata en blanco para preparar muestras de la curva de calibración.

#### 25 (Ejemplo 3-2-2) Determinación de la concentración

Se determinó la intensidad de fluorescencia de las muestras preparadas en el Ejemplo 3-2-1 utilizando un lector de placas (SPECTRAMax GEMINI, Molecular Devices) (HA marcados con FL: longitud de onda de excitación 495 nm, longitud de onda de fluorescencia 520 nm; HA marcados con Rh: longitud de onda de excitación 552 nm, longitud de onda de fluorescencia 595 nm). Se construyó una curva de calibración para cada compuesto a partir de los valores medidos de las muestras de la curva de calibración, por lo que se calcularon las concentraciones de los compuestos en plasma de los individuos respectivos en los respectivos puntos de tiempo. Los promedios de las concentraciones plasmáticas se muestran en la figura 8, y los gráficos para los cursos temporales de dichos promedios se muestran en la figura 9.

**(Ejemplo 3-2-3) Cálculo de los parámetros farmacocinéticos**

5 Los parámetros farmacocinéticos se calcularon utilizando WinNonlin Ver 4.0.1/Ver 6.1 (Pharsight). Los datos promedio para cada grupo calculado en el Ejemplo 3-2-2 se sometieron a un análisis independiente del modelo para calcular un aclaramiento (CL) (Tabla 7). Como resultado, en comparación con PEG que tiene permanencia práctica en sangre, todos los derivados de HA de los Ejemplos 1-4-1 a 1-4-19 mostraron valores de CL más bajos, demostrando de este modo que tienen permanencia práctica en la sangre. Asimismo, algunos de los derivados de HA de los Ejemplos Comparativos mostraron valores de CL más altos que PEG, lo que revela que se pueden sintetizar derivados de HA que muestran diferentes permanencias en sangre en función del tipo del compuesto de modificación.

10

[Tabla 7]

Tabla 7 Evaluación de los aclaramientos de los derivados de HA y PEG de la sangre

N.º ej./N.º ej. comp. Compuesto		CL (ml/h/kg)
Ejemplo 1-4-1	HA-Ala/FL	1,0
Ejemplo 1-4-2	HA-Ser/FL	1,1
Ejemplo 1-4-3	HA-Glu/FL	3,0
Ejemplo 1-4-4	HA-Gly/FL	1,4
Ejemplo 1-4-5	HA-Val/FL	1,2
Ejemplo 1-4-6	HA-Leu/FL	1,3
Ejemplo 1-4-7	HA-Ile/FL	1,3
Ejemplo 1-4-8	HA-Thr/FL	1,0
Ejemplo 1-4-9	HA-Asp/FL	2,8
Ejemplo 1-4-10	HA-cACHCA/FL	1,1
Ej. 1-4-11	HA-tACHCA-OEt /FL	1,3
Ej. 1-4-12	HA-Aib/FL	1,1
Ejemplo 1-4-13	HA-AcBuCA-OEt /FL	0,8
Ejemplo 1-4-14	HA-Asn/Rh	1,8
Ejemplo 1-4-15	HA-Ala-NH <sub>2</sub> /Rh	2,0
Ejemplo 1-4-16	HA-Val-NH <sub>2</sub> /Rh	2,5
Ej. 1-4-17	HA-Asn-NH <sub>2</sub> /Rh	2,4
Ej. 1-4-18	HA-Me/FL	1,1
Ej. 1-4-19	HA-Pr/FL	0,9
Ej. comp. 1-1-1	HA-FL	8,4
Ej. comp. 1-1-2	HA-EDOBEA-Ac/FL	0,6
Ej. comp. 1-1-3	HA-Phe/FL	6,0
Ej. comp. 1-1-4	HA-Tyr/FL	14,8
Ej. comp. 1-1-5	HA-MePhe/FL	12,9
Ej. comp. 1-1-6	HA-Pro-OMe/FL	3,7
Ej. comp. 1-1-7	HA-Gly-NH <sub>2</sub> /Rh	6,6
Ej. comp. 1-1-8	HA-Ser-NH <sub>2</sub> /Rh	29,3
Ej. comp. 1-1-9	HA-Leu-NH <sub>2</sub> /Rh	3,6
Ej. comp. 1-1-10	HA-Ile-NH <sub>2</sub> /Rh	3,2

N.º ej./N.º ej. comp. Compuesto		CL (ml/h/kg)
Ej. comp. 1-1-11	HA-Thr-NH <sub>2</sub> /Rh	47,9
Ej. comp. 1-1-12	HA-Gln-NH <sub>2</sub> /Rh	10,6
Ej. comp. 1-3	PEG-FL	3,0

### (Ejemplo 3-3) análisis de las orinas de ratas tratadas con derivados de HA

#### (Ejemplo 3-3-1) Preparación de muestras de análisis

5 Las muestras de orina se descongelaron, se agitaron y se pasaron a través de un filtro de 0,22 µm para recoger los filtrados. Los filtrados se diluyeron con una solución tampón (HA marcados con FL: solución de tampón fosfato (pH 6,5, I=0,15); HA marcados con HA: PBS). Las soluciones de administración se diluyeron con una solución mixta (1:1) de una solución tampón y plasma de rata en blanco para preparar muestras de la curva de calibración.

#### (Ejemplo 3-3-2) Análisis mediante cromatografía de exclusión por tamaño

10 Las muestras preparadas en el Ejemplo 3-3-1 se sometieron a cromatografía de exclusión por tamaño para observar los cambios en la distribución del peso molecular. El análisis por cromatografía de exclusión por tamaño se realizó usando el sistema e HPLC Alliance (Nihon Waters K.K.). Las condiciones de análisis son las siguientes.

15 Condiciones del análisis mediante cromatografía de exclusión por tamaño

20 Columna de análisis: Gel TSK G5000PWXL (Tosoh Corporation)  
 Temperatura de la columna: 25 °C  
 Fase móvil: Solución tampón de fosfato (pH 6,5, I=0,15) (para HA marcados con HA) PBS (para HA marcados con Rh)  
 Caudal: 0,5 ml/min  
 Detección: Ex 495 nm/Em 520 nm (HA marcados con FL)  
 25 Ex 552 nm/Em 595 nm (HA marcados con Rh)

30 Los resultados se muestran en la figura 10. Para cada figura, el panel izquierdo muestra los cromatogramas en el mismo intervalo en los respectivos puntos de tiempo y el panel derecho muestra los cromatogramas en los respectivos puntos de tiempo, que se normalizaron con el pico más fuerte.

35 En cuanto al derivado de HA del Ejemplo Comparativo 1-1-2, no se observó ningún compuesto inyectado con peso molecular reducido en las muestras de orina. Por otro lado, como para todos los derivados de HA de los Ejemplos, se detectaron los compuestos inyectados con peso molecular reducido en las muestras de orina. Esto indica que los derivados de HA de la presente invención tienen biodegradabilidad y son excretados del cuerpo después del tratamiento.

### [Ejemplo 4] Verificación de la propiedad de alteración de la membrana usando liposomas

#### (Ejemplo 4-1) Preparación de un liposoma que encapsula un fósforo y un inactivador

40 En primer lugar, se disolvió la sal trisódica de ácido 8-hidroxipireno-1,3,6-trisulfónico (piramina) (Sigma-Aldrich) en agua destilada a una concentración de 60 µmol/ ml y, continuación, se disolvió bromuro de p-xileno-bis(N-piridinio) (DPX) (Sigma-Aldrich) en agua destilada a una concentración de 85,7 µmol/ ml; a continuación, se mezclaron estas soluciones en cantidades equivalentes para preparar una solución acuosa de piramina/DPX.

45 Se añadió la solución piramina/DPX resultante (2 ml) a un vial COATSOME EL-11A (NOF Corporation) y se mezclaron los componentes, de modo que se preparó una solución de liposomas.

50 A continuación, con el fin de eliminar la piramina y el DPX no encapsulados, la solución se sometió a purificación con columnas PD-10 y purificación por diálisis (Spectra/Por 4, corte del peso molecular (COPM): 12-14 kDa) contra 500 ml de solución fisiológica salina tres veces, de modo que se proporcionó una solución de liposomas.

55 La solución de liposomas se diluyó 5 veces con una solución de tampón de fosfato con una fuerza iónica de 0,15 y un pH de 6 o 7,4; con lo que se preparó una solución de liposomas con cada pH.

#### (Ejemplo 4-2) Evaluación de la propiedad de alteración de la membrana liposómica

Los derivados de HA obtenidos en el Ejemplo 1-5 y el Ejemplo Comparativo 1-2 se disolvieron cada uno en solución fisiológica salina, para dar una concentración de HA-Na de 10 mg/ml y las soluciones respectivas se diluyeron

secuencialmente con solución fisiológica salina para ajustar las concentraciones a 10, 5, 1, 0,5, 0,1, 0,05, y 0,01 mg/ml. Como control positivo, se preparó una solución de Triton X en 10 mg/ml de solución fisiológica salina. Como control negativo, se utilizó solución fisiológica salina. Además, se seleccionó bromhidrato de poli- L-lisina (PLL, MW 15-30 kDa, Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) como sustancia de control positivo con propiedad de alteración de la membrana y se disolvió en solución fisiológica salina, para dar una concentración de 10 mg/ml.

Después de la adición de 25 µl de la solución de liposomas a 200 µl de la solución de tampón fosfato con pH 7,4 o pH 6,0, se añadieron 25 µl de las muestras a cada uno. Después de incubar a 37 °C durante 3 horas, cada mezcla se pasó a través de un filtro de 0,22 µm y se determinó la intensidad de la fluorescencia de 100 µl de los filtrados usando un lector de placas (SPECTRAMax GEMINI) (longitud de onda de excitación 450 nm, longitud de onda de emisión 510 nm). Se determinó PLL únicamente a pH 7,4.

El indicador de una propiedad de alteración de la membrana se calculó como un grado de degradación de liposomas de acuerdo con la siguiente ecuación.

15

$$\begin{array}{c}
 \text{(Grado de degradación de liposomas)} \\
 = \\
 \frac{\text{(Intensidad de fluorescencia de la muestra a la que se ha añadido HA)} - \text{(Intensidad de fluorescencia de la muestra a la que se ha añadido solución salina)}}{\text{(Intensidad de fluorescencia de la muestra a la que se ha añadido Triton X)} - \text{(Intensidad de fluorescencia de la muestra a la que se ha añadido solución salina)}} \times 100
 \end{array}$$

[Fórmula 28]

Los resultados se muestran en la figura 11. Las muestras HA-Nle, HA-tLeu, y HA-pFPhe utilizadas en los Ejemplos no mostraron una propiedad de alteración de la membrana a ningún pH. mientras que las muestras utilizadas en los Ejemplos mostraron una propiedad de alteración de la membrana más alta a pH 6,0 que a pH 7,4. En particular, HA-pcACHCA, HA-Nal, HA-APBA, HA-Cha, HA-AMBA, HA-3AMBA, HA-APhPA, HA-AEB, HA-AMCIBA, HA-AMSA, HA-4AMCHCA, HA-Chg y HA-pHPHg no mostraron propiedad de alteración de la membrana a pH 7,4, pero la mostraron únicamente a pH 6,0. Además, puesto que PLL mostró un grado de degradación de liposomas del 6,6 % a pH 7,4, puede juzgarse que cualquier derivado funciona adecuadamente como una sustancia que tiene una propiedad de alteración de la membrana si muestra un grado de degradación de liposomas de al menos un pequeño porcentaje y, por tanto, se demostró que los derivados de HA de la presente invención tienen una propiedad de alteración de la membrana a pH 6,0.

### [Ejemplo 5] Síntesis de conjugados de derivado de HA-Ala/análogo de PTH

#### (Ejemplo 5-1) Síntesis de una sal de TBA de HA-Aa (HA-Ala-TBA)

Se preparó una solución en DMSO anhidro (5 mg/ml) de HA-TBA sintetizada usando HA-Na (99 kDa) como material de partida en el Ejemplo 1-2. A continuación, se añadió éster etílico de L-alanina en una cantidad de 3 equivalentes molares con respecto a la unidad de HA. Después, se añadió DMT-MM en una cantidad de 3 equivalentes molares con respecto a la unidad de HA y se realizó agitación a temperatura ambiente durante toda la noche. La solución de reacción se dializó (Spectra/Por 4, corte del peso molecular (COPM): 12-14 kDa) contra una solución acuosa de NaCl 0,3 M y agua destilada, en este orden. Se añadió NaOH 5N al dializado resultante para ajustar el pH a, al menos, 12,5 y se realizó agitación durante una hora para efectuar desprotección de carboxi mediante hidrólisis de éster etílico. A continuación, la mezcla se neutralizó con una solución de HCl 5N y se dializó adicionalmente contra agua destilada y agua ultrapura, en este orden. La suspensión de resina de intercambio catiónico convertida en una sal de TBA en el Ejemplo 1-1 se añadió al dializado resultante en una cantidad de 5 equivalentes molares con respecto a la unidad de HA según se ha calculado para la capacidad de intercambio iónico de la resina. Después de agitar durante 15 minutos, la mezcla se pasó a través de un filtro de 0,45 µm y el filtrado se liofilizó, para dar muestras de HA-Ala-TBA en forma de un sólido blanco. Se tomó una parte del producto y se dializó contra una solución acuosa de NaCl 0,3 M y agua destilada, en este orden y el dializado se liofilizó para su uso como una muestra para calcular el grado de modificación con alanina.

La figura 12-1 muestra los espectros de RMN de <sup>1</sup>H obtenidos mediante análisis de la muestra para calcular el grado de modificación con alanina y el producto en las mismas condiciones que se han descrito en el Ejemplo 1-3. El grado de modificación de la unidad de HA con alanina se calculó que era del 98 % mediante el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1-4-1. El contenido de unidades HA por peso en HA-Ala-TBA se cuantificó mediante el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1-3.

#### (Ejemplo 5-2) Síntesis de HA-Ala-EDOBEA

Se añadieron EDOBEA y BOP en este orden a la solución en DMSO anhidro (5 mg/ml) de HA-Ala-TBA sintetizada en el Ejemplo 5-1 en cantidades de 50 y 0,15 equivalentes molares, respectivamente, con respecto a la unidad de

HA, y se realizó agitación a temperatura ambiente durante 6 horas. La solución de reacción se dializó (Spectra/Por 4, corte del peso molecular (COPM): 12-14 kDa) para su purificación contra una solución acuosa de NaCl 0,3 M y agua destilada, en este orden, y el dializado se liofilizó, para dar HA-Ala-EDOBEA en forma de un sólido blanco.

- 5 El producto se sometió a análisis RMN de  $^1\text{H}$  mediante el mismo procedimiento descrito en el Ejemplo Comparativo 1-1-2 y, como resultado, se encontró que el grado de modificación con EDOBEA era del 9,4 %. El contenido de unidades de HA se cuantificó mediante el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1-3. La figura 12-2 muestra el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  del producto.

#### 10 **(Ejemplo 5-3) Síntesis de HA-Ala-EDOBEA-**

La solución acuosa (10 mg/ ml) de HA-Ala-EDOBEA sintetizada en el Ejemplo 5-2 se diluyó 2 veces con una solución de tampón fosfato 100 mM (pH 7,4), se añadió NHS-rhodamina como una solución en 5 mg/ml de DMSO en una cantidad de 0,07 equivalentes molares con respecto a la unidad de HA y se realizó agitación a temperatura ambiente durante 2 horas. La solución de reacción se purificó en una columna desaladora (PD-10, GE Healthcare) equilibrada con agua ultrapura y la fracción de HA se liofilizó, para dar HA-Ala-EDOBEA-Rh en forma de un sólido de color rojo.

La figura 12-3 muestra el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  obtenido mediante análisis del producto en  $\text{D}_2\text{O}$ . El contenido de unidades de HA por peso se cuantificó mediante el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1-3. Asimismo, el producto se disolvió en una solución de tampón carbonato 100 mM (pH 9,0) a una concentración de 0,042 mg/ ml y el contenido de Rh por peso se cuantificó a partir de la absorbancia a 552 nm, por lo que el grado de modificación de la unidad de HA con Rh se calculó en 3,1 %. Adicionalmente, se calculó que el coeficiente de absorción molar del producto resultante era de  $2.690 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

25

#### **(Ejemplo 5-4) Síntesis de un derivado bromoacetilo de HA (HA-Ala-EDOBEA-BA/Rh/Ac)**

La solución acuosa (20 mg/ml) de HA-Ala-EDOBEA-Rh sintetizada en el Ejemplo 5-3 se usó como material de partida. La solución se diluyó 2 veces con una solución de tampón fosfato 100 mM (pH 7,4) se añadió NHS-bromoacetato (NHS- BA, Sigma-Aldrich) como una solución en 50 mg/ml de acetonitrilo en una cantidad de 0,5 equivalentes molares con respecto a la unidad de HA y se realizó agitación a temperatura ambiente durante 2 horas. A continuación, se añadió anhídrido acético en una cantidad de 20 equivalentes molares con respecto a la unidad de HA y se realizó agitación adicional durante una hora para acetilar el amino terminal en exceso de EDOBEA. La solución de reacción se purificó en una columna desaladora (PD-10) equilibrada con agua ultrapura y la fracción de HA fraccionado se concentró aproximadamente 2 veces mediante ultrafiltración centrífuga (Macrosep, COPM 3000, Paul Life Science) para dar HA-Ala-EDOBEA-BA/Rh/Ac como una solución acuosa. La solución acuosa se crioconservó a  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  hasta su uso posterior. Después de liofilizar, se midió una alícuota para determinar su peso para calcular la concentración de sólidos en la solución.

#### 40 **(Ejemplo 5-5) Síntesis de un conjugado de análogo de HA-Ala/PTH (HA-Ala-PTH/Rh)**

La solución acuosa de HA-Ala-EDOBEA-BA/Rh/Ac sintetizada en el Ejemplo 5-4 se usó como material de partida. Se usó PTH-Cys (SVSEIQLMHNGLGKHLNSMERVEWLRKKLQDVHNF, American Peptide Company) que se obtuvo introduciendo cisteína en el extremo C de la PTH humana (1-34) como análogo de PTH. A la solución de HA-Ala-EDOBEA-BA/Rh/Ac se añadieron 3/10 del volumen de acetonitrilo en 1/10 del volumen de una solución de tampón de fosfato 1M (pH 7,4). Después de disolver PTH-Cys en una solución de tampón citrato 10 mM (pH 4,5) a una concentración de 5 mg/ ml, la solución resultante se añadió a la solución de HA-Ala-EDOBEA-BA/Rh/Ac en una cantidad de 0.03 equivalentes molares con respecto a la unidad de HA y la mezcla se incubó a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  durante toda la noche. Se añadió clorhidrato de cisteína monohidrato (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) como una solución en 20 mg/ml de acetonitrilo en una cantidad de 1 equivalente molar con respecto a la unidad de HA y la mezcla se incubó adicionalmente a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 3 horas, y, a continuación, el pH de la mezcla se ajustó a 4,5 con una solución acuosa de hidróxido sódico 1 N. Se especificó que el contenido de unidades de HA por peso era  $1,5 \mu\text{mol/mg}$  y este valor se usó para calcular la unidad de HA.

55 Después, la solución de reacción se purificó mediante ultrafiltración centrífuga (Macrosep, COPM 10000) repitiendo la dilución con una solución DE tampón citrato 2 mM (pH 4,5) y UNA concentración DE cuatro veces para preparar un concentrado DE HA-Ala-PTH/Rh. El concentrado resultante se diluyó 100 veces con una solución de tampón carbonato 100 mM (pH 9,0) y se determinó la dilución para su absorbancia a 552 nm, por lo que se calculó que la concentración de HA era de  $24,3 \mu\text{mol/ml}$  usando el coeficiente de absorción de HA-Ala-EDOBEA-Rh calculado en el Ejemplo 5-3. Se realizó el análisis de aminoácidos mediante el método AccQ-Tag (Waters), de modo que se calculó que la concentración de PTH era de  $141,75 \text{ nmol/ml}$  y se determinó que el grado de modificación con PTH era de 0,58 %. En el análisis de aminoácidos, la hidrólisis y la derivatización se realizaron utilizando la estación de trabajo Pico-Tag y el paquete de química AccQ-Tag conforme al manual adjunto al paquete. El análisis de HPLC se realizó usando el Módulo de Separación Waters 2690 y el Detector de Fluorescencia Waters 474 y el análisis para calcular la concentración de aminoácidos se basó en la concentración de residuos de lisina.

65

**[Ejemplo 6] Confirmación *in vivo* de la permanencia en sangre y biodegradabilidad del conjugado de derivado de HA-Ala/análogo de PTH****(Ejemplo 6-1) Muestras biológicas de ratas tratadas con derivados de HA**

5 El compuesto obtenido en el Ejemplo 5-5 se administró por vía intravenosa a ratas a una dosis única de 10 mg/kg. Después de 5 minutos, y 2, 7, 24, 48, 72, 168, 240 y 312 horas de tratamiento, se obtuvieron muestras de sangre de la vena yugular usando jeringas tratadas con heparina sódica y se sometieron a centrifugación para obtener plasma. Las muestras de plasma se crioconservaron por debajo de -20 °C hasta el análisis. Las muestras de orina se  
10 recogieron utilizando jaulas metabólicas de 0 a 24 horas, 24 a 48 horas, 48 a 72 horas, 72 a 96 horas, 144-168 horas, 216-240 horas, y 288-312 horas después del tratamiento. Se midieron las cantidades de orina y una parte de las respectivas muestras se crioconservaron por debajo de -20 °C hasta el análisis.

**(Ejemplo 6-2) Análisis de las muestras de plasma de ratas tratadas con derivados de HA****15 (Ejemplo 6-2-1) Preparación de muestras de análisis**

Las muestras de análisis se prepararon mediante el procedimiento descrito en el Ejemplo 3-2-1.

**20 (Ejemplo 6-2-2) Determinación de la concentración**

Utilizando las muestras preparadas en el Ejemplo 6-2-1 las concentraciones del compuesto en plasma de los individuos respectivos en los respectivos puntos de tiempo se calcularon mediante el procedimiento descrito en el Ejemplo 3-2-2. Los promedios de las concentraciones plasmáticas se muestran en la figura 13, y los gráficos para  
25 los cursos temporales de dichos promedios se muestran en la figura 14.

**(Ejemplo 6-2-3) Cálculo de los parámetros farmacocinéticos**

Utilizando los datos promedio calculados en el Ejemplo 6-2-2 se calculó que el aclaramiento (CL) era 1,0 mediante el procedimiento descrito en el Ejemplo 3-2-3. El derivado de ácido hialurónico biodegradable mostró una permanencia  
30 práctica en la sangre, también en forma del conjugado con el fármaco.

**(Ejemplo 6-3) Análisis de las muestras de orina de ratas tratadas con derivados de HA****35 (Ejemplo 6-3-1) Preparación de muestras de análisis**

Las muestras de análisis se prepararon mediante el procedimiento descrito en el Ejemplo 3-3-1.

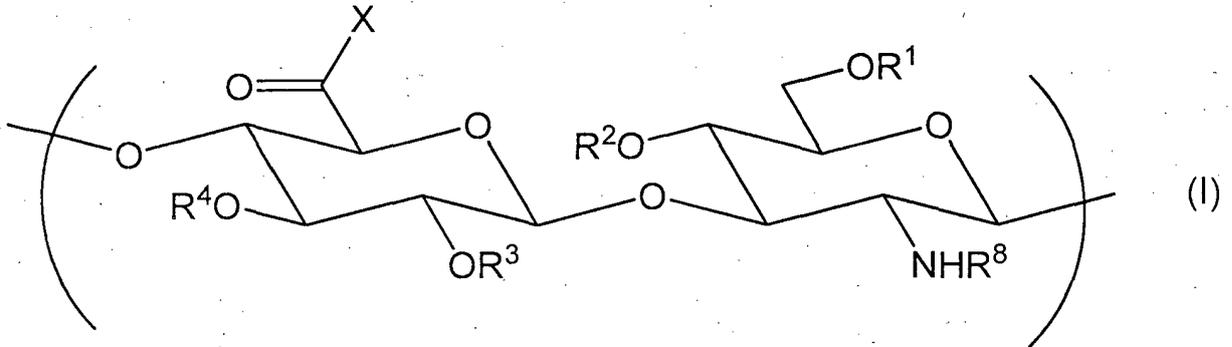
**(Ejemplo 6-3-2) Análisis mediante cromatografía de exclusión por tamaño**

40 La figura 15 muestra los resultados del análisis de las muestras preparadas en el Ejemplo 6-3-1 mediante el procedimiento descrito en el Ejemplo 3-3-2. En esta figura, el panel izquierdo muestra los cromatogramas en el mismo intervalo en los respectivos puntos de tiempo y el panel derecho muestra los cromatogramas en los respectivos puntos de tiempo, que se normalizaron con el pico más fuerte.

45 Se detectó un compuesto con peso molecular reducido en las muestras de orina de los individuos tratados con el compuesto del Ejemplo 5-5. Esto indica que el conjugado entre el derivado de ácido hialurónico biodegradable y el fármaco mantiene su biodegradabilidad y se excreta del cuerpo después del tratamiento.

REIVINDICACIONES

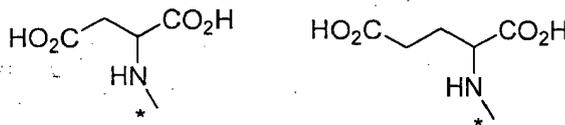
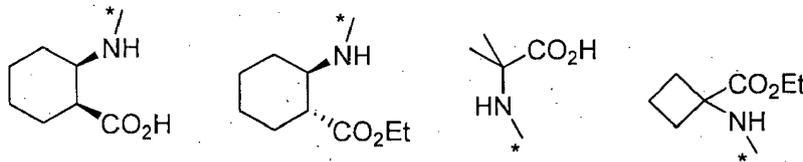
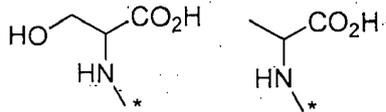
1. Un derivado de ácido hialurónico que comprende unidades de disacárido representadas por la Fórmula (I):

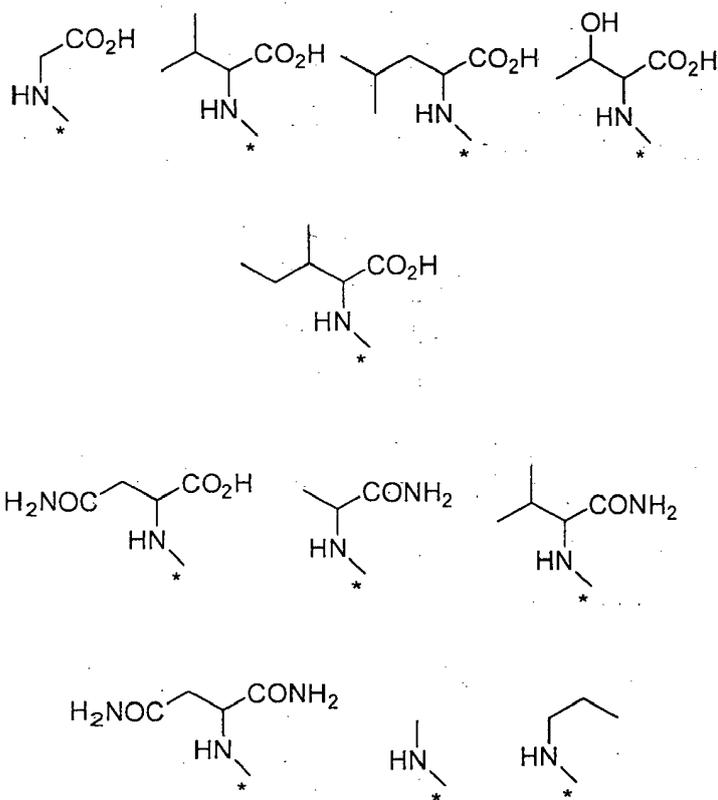


5

donde

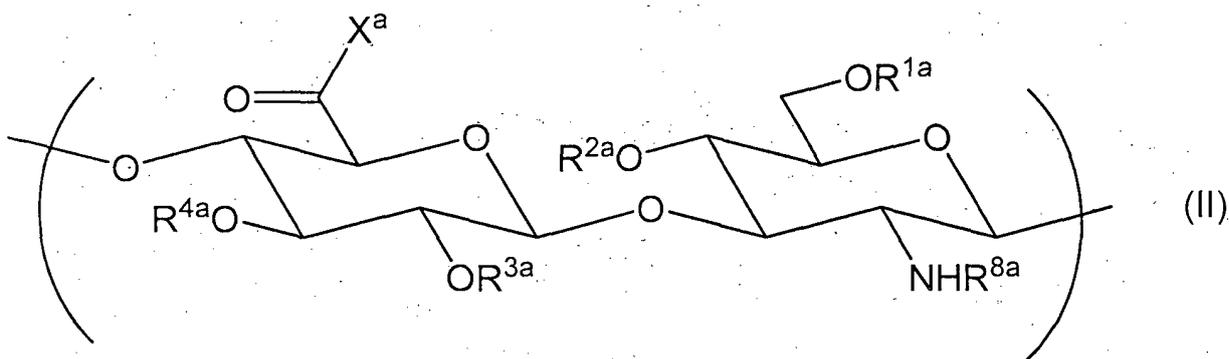
10 R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, y R<sup>4</sup> se seleccionan cada uno independientemente de entre un átomo de hidrógeno, alquilo C<sub>1-6</sub>, formilo y alquilcarbonilo C<sub>1-6</sub>;  
 R<sup>8</sup> es un átomo de hidrógeno, formilo o alquilcarbonilo C<sub>1-6</sub>; X está representado por las siguientes fórmulas:





5 "\*" representa una posición de unión al carboxi en el derivado de ácido hialurónico, donde la proporción de las unidades de disacárido de Fórmula (I) con respecto a las unidades de repetición de disacárido presentes en el derivado de ácido hialurónico es, al menos, de 70 %.

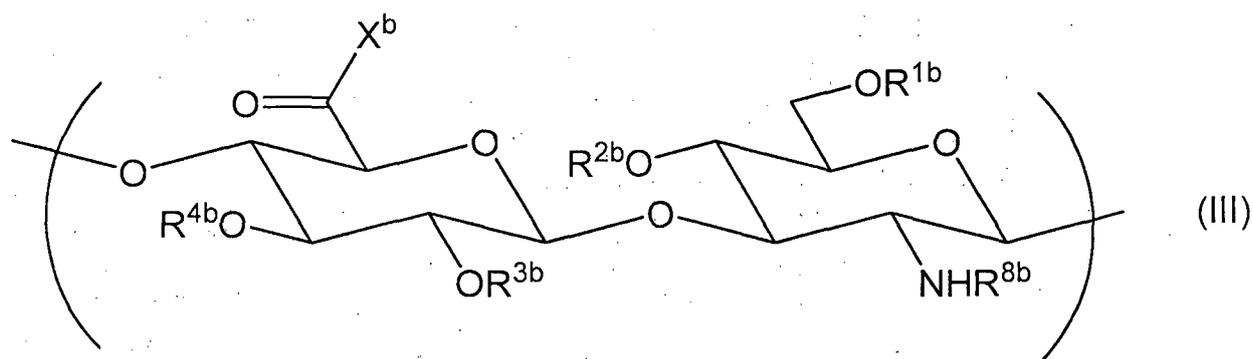
2. El derivado de ácido hialurónico de acuerdo con la reivindicación 1, que además comprende unidades de disacárido representadas por la fórmula (II):



10 donde

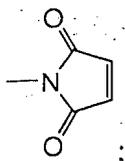
15 R<sup>1a</sup>, R<sup>2a</sup>, R<sup>3a</sup>, y R<sup>4a</sup> se seleccionan cada uno independientemente de entre un átomo de hidrógeno, alquilo C<sub>1-6</sub>, formilo y alquilcarbonilo C<sub>1-6</sub>;  
 R<sup>8a</sup> es un átomo de hidrógeno, formilo o alquilcarbonilo C<sub>1-6</sub>;  
 X<sup>a</sup> se selecciona de entre hidroxilo y -OQ<sup>+</sup>, donde Q<sup>+</sup> representa a contracación. <sup>3</sup>

20 3. El derivado de ácido hialurónico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, que además comprende unidades de disacárido representadas por la fórmula (III):



donde

- 5  $R^{1b}$ ,  $R^{2b}$ ,  $R^{3b}$ , y  $R^{4b}$  se seleccionan cada uno independientemente de entre un átomo de hidrógeno, alquilo  $C_{1-6}$ , formilo y alquilcarbonilo  $C_{1-6}$ ;  
 $R^{8b}$  es un átomo de hidrógeno, formilo o alquilcarbonilo  $C_{1-6}$ ;  
 $X^b$  es un grupo representado por  $-NR^e-Y^b-R^d$ ; donde  
 $R^e$  es un átomo de hidrógeno o alquilo  $C_{1-6}$ ;  
10  $R^d$  es un átomo de hidrógeno, alquilo  $C_{1-6}$ ,  $-\text{CO}-\text{C}(\text{R}^7)=\text{CH}_2$ , o  $-\text{CO}-\text{G}^4-\text{X}^c$ ;  
 $\text{R}^7$  es un átomo de hidrógeno o metilo;  
 $\text{G}^4$  se selecciona de entre fenileno, cicloalquileo  $\text{C}_{3-8}$  y  $-\text{G}^5-(\text{alquileo } \text{C}_{1-10})-\text{G}^6$ , donde el resto de alquileo  $\text{C}_{1-10}$  puede tener de uno a tres fenilenos o cicloalquilenos  $\text{C}_{3-8}$  insertados en el mismo;  
 $\text{G}^5$  y  $\text{G}^6$  se seleccionan cada uno independientemente de entre un enlace directo, fenileno o cicloalquileo  $\text{C}_{3-8}$   
15  $\text{X}^c$  es mercapto, un átomo de halógeno o un grupo representado por la fórmula:



- 20  $Y^b$  es  $-\text{CH}_2-(\text{CHR}^5)_{1-2}-\text{CH}_2-\text{NH}-$ ,  $-\text{CH}_2-(\text{CHR}^6)_{p-2}-\text{CH}_2-\text{O}-$ ,  $-(\text{CH}_2)_j-\text{S}-$ , o  $-(\text{CH}_2)_a-(Y^1-(\text{CH}_2)_b)_c-\text{G}-$ ;  
1, p y j son cada uno independientemente un número entero seleccionado de entre 2 y 10,  $\text{R}^5$  y  $\text{R}^6$  son cada uno independientemente un átomo de hidrógeno o hidroxilo;  
a es un número entero seleccionado de entre 2 y 10;  
cada b es independientemente un número entero seleccionado de entre 2 y 10;  
c es un número entero seleccionado de entre 1 y 200;  
25  $Y^1$  es un átomo de oxígeno o  $-\text{NR}^n-$ ;  
G es un átomo de oxígeno, un átomo de azufre o  $-\text{NH}-$ ;  
 $\text{R}^n$  es un átomo de hidrógeno, alquilo  $\text{C}_{1-6}$ ,  $-\text{CO}-(\text{CH}_2)_d-\text{R}^o$ ,  $-(\text{CH}_2)_e-\text{R}^p$  o  $-(\text{CH}_2)_f(\text{Y}^2-(\text{CH}_2)_g)_h-\text{R}^q$ ;  
cada g es independientemente un número entero seleccionado de entre 2 y 10;  
d, e, f y h son cada uno independientemente un número entero seleccionado de entre 2 y 10;  
30  $\text{R}^o$ ,  $\text{R}^p$  y  $\text{R}^q$  se seleccionan cada uno independientemente de entre un átomo de hidrógeno, hidroxilo, carboxilo o  $-\text{NHR}^r$ ;  
 $Y^2$  es un átomo de oxígeno o  $-\text{NH}-$ ; y  
 $\text{R}^r$  es un átomo de hidrógeno, formilo o  $\text{C}_{1-6}$  alquilcarbonilo.

35 4. El derivado de ácido hialurónico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que se prepara usando ácido hialurónico compuesto exclusivamente por las unidades de disacárido representadas cada una por la Fórmula (II) como se expone en la reivindicación 2, donde, cuando  $\text{R}^{1a}$ ,  $\text{R}^{2a}$ ,  $\text{R}^{3a}$ , y  $\text{R}^{4a}$  son todos átomos de hidrógeno,  $\text{R}^{8a}$  es acetilo y  $\text{X}^a$  es  $-\text{O}^-\text{Na}^+$ , el peso molecular promedio en peso está en el intervalo de 20-120 kilodalton.

40 5. El derivado de ácido hialurónico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde un ácido hialurónico no derivatizado correspondiente al derivado de ácido hialurónico en términos de la estructura principal tiene un peso molecular promedio en peso de 20-120 kilodalton, donde el ácido hialurónico no derivatizado es ácido hialurónico compuesto exclusivamente por unidades de disacárido de fórmula (II) como se expone en la  
45 reivindicación 2, donde  $\text{R}^{1a}$ ,  $\text{R}^{2a}$ ,  $\text{R}^{3a}$  y  $\text{R}^{4a}$  son átomos de hidrógeno,  $\text{R}^{8a}$  es acetilo y  $\text{X}^a$  es  $-\text{O}^-\text{Na}^+$ .

6. Una composición farmacéutica que comprende el derivado de ácido hialurónico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 como vehículo.

7. Un conjugado de derivado de ácido hialurónico/fármaco, donde uno o más fármacos se conjugan con el derivado de ácido hialurónico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
8. Un vehículo de fármaco biodegradable que comprende el derivado de ácido hialurónico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.

FIG. 2 Ejemplo 1-3  
HA-FL/TBA

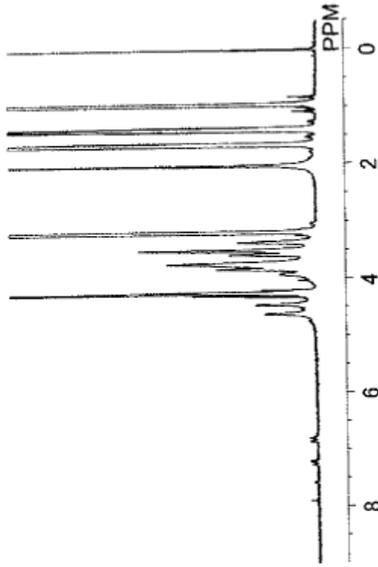


FIG. 1 Ejemplo 1-2  
HA-TBA

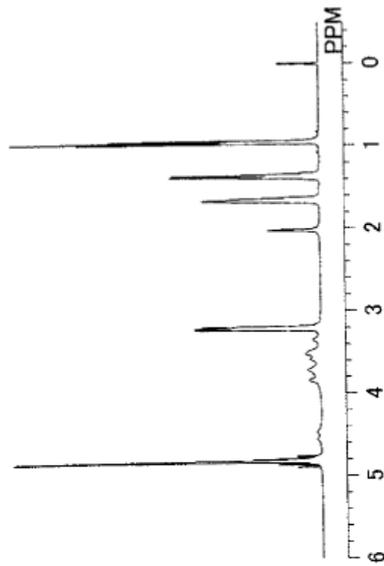


FIG. 3-2 Ejemplo 1-4-2  
HA-Ser/FL (arriba), HA-Ser-OEt/FL (abajo)

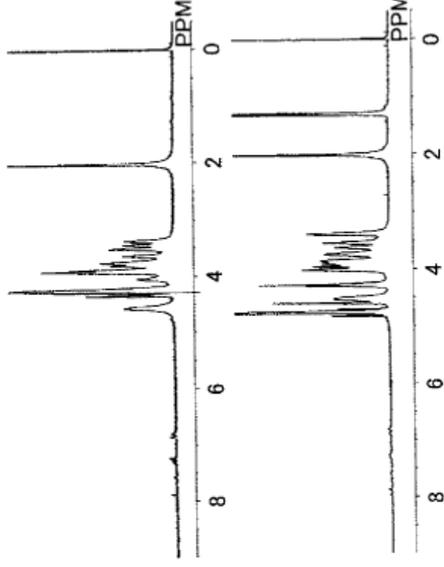


FIG. 3-1 Ejemplo 1-4-1  
HA-Ala/FL

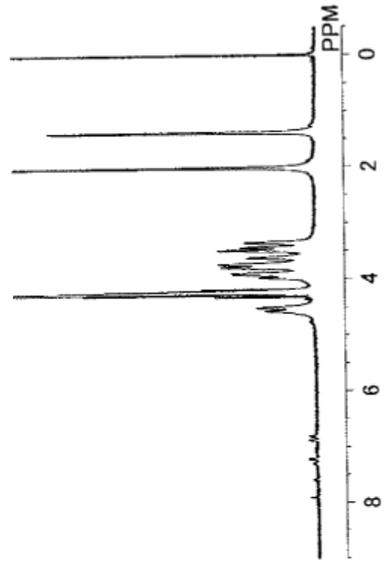


FIG. 3-3  
Ejemplo 1-4-3  
HA-Glu/FL

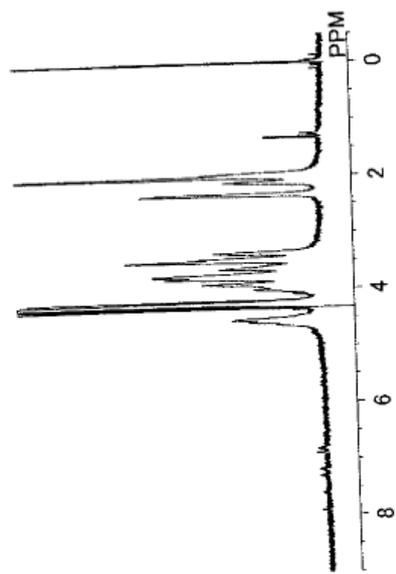


FIG. 3-4  
Ejemplo 1-4-4  
HA-Gly/FL (upper), HA-Gly-OEt/FL (abajo)

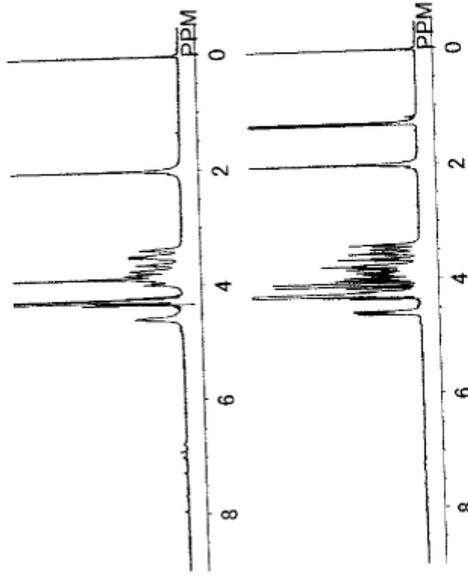


FIG. 3-5  
Ejemplo 1-4-5  
HA-Val/FL

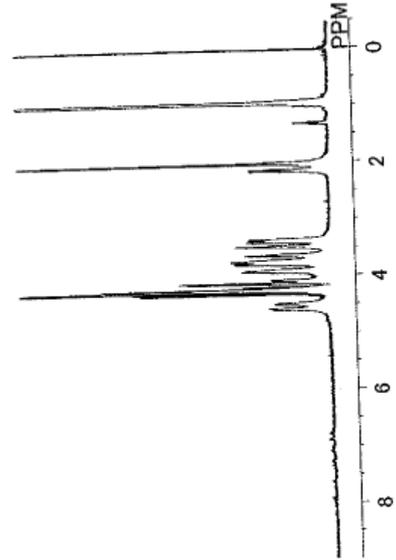


FIG. 3-6  
Ejemplo 1-4-6  
HA-Leu/FL

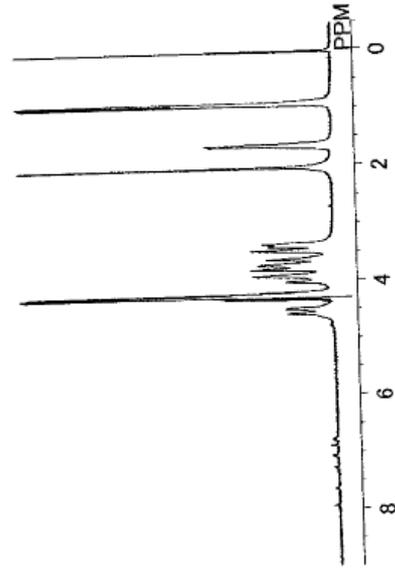


FIG. 3-8 Ejemplo 1-4-8  
HA-Thr/FL

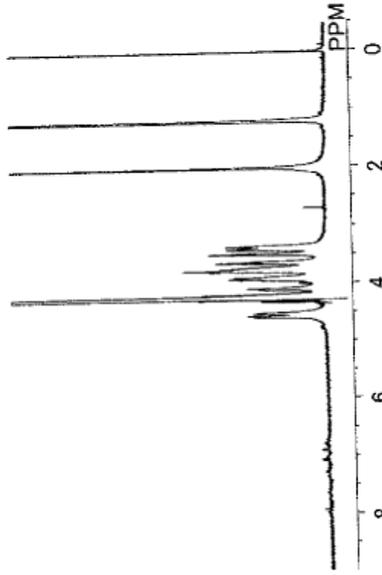


FIG. 3-10 Ejemplo 1-4-10  
HA-cACHCA/FL

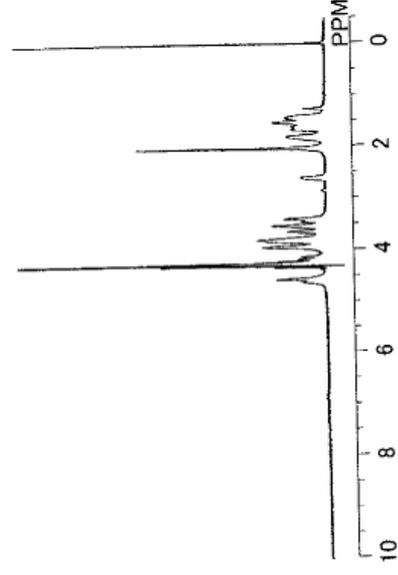


FIG. 3-7 Ejemplo 1-4-7  
HA-Ile/FL

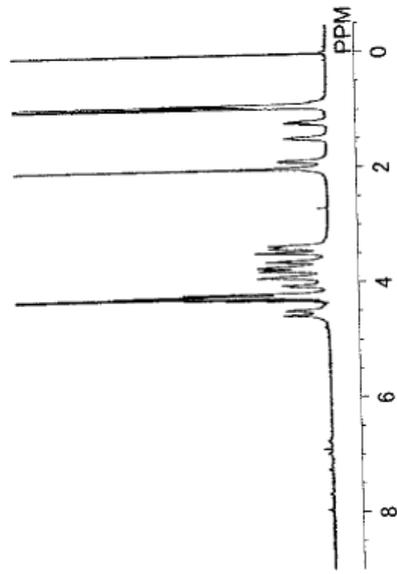


FIG. 3-9 Ejemplo 1-4-9  
HA-Asp/FL

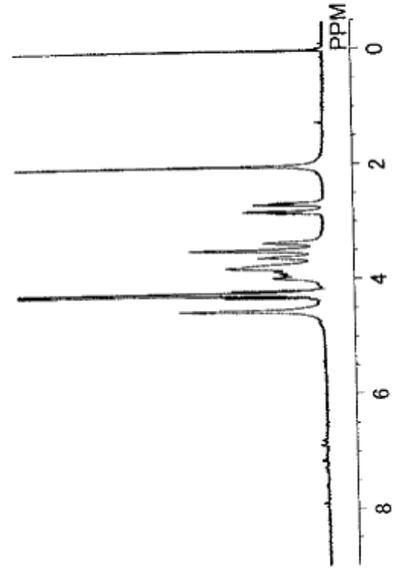


FIG. 3-11 Ejemplo 1-4-11  
HA-tACHCA-OEt/FL

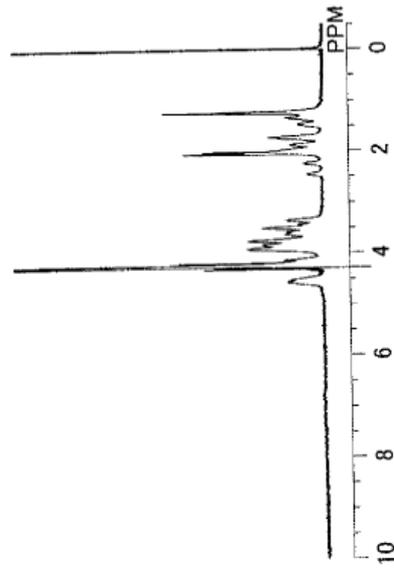


FIG. 3-12 Ejemplo 1-4-12  
HA-Aib/FL

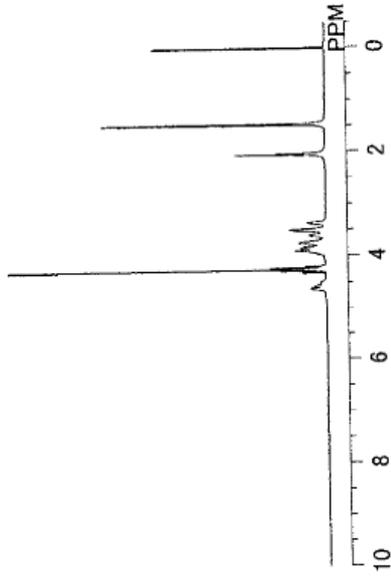


FIG. 3-13 Ejemplo 1-4-13  
HA-ACBuCA-OEt/FL

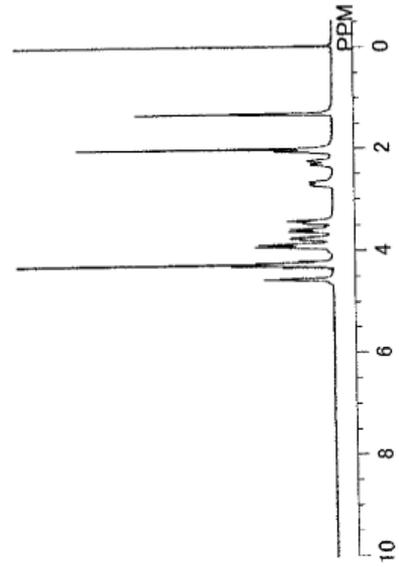


FIG. 3-14 Ejemplo 1-4-14  
HA-Asn/Rh

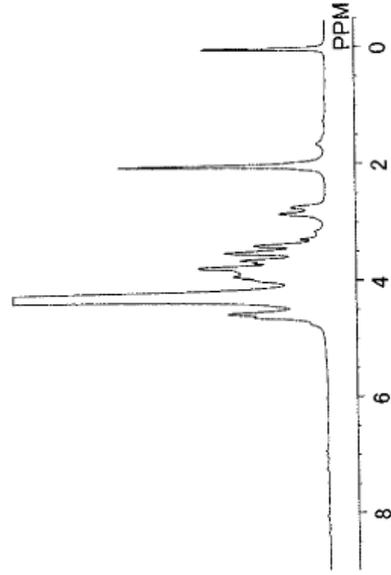


FIG. 3-16 Ejemplo 1-4-16  
HA-Val-NH<sub>2</sub>/Rh

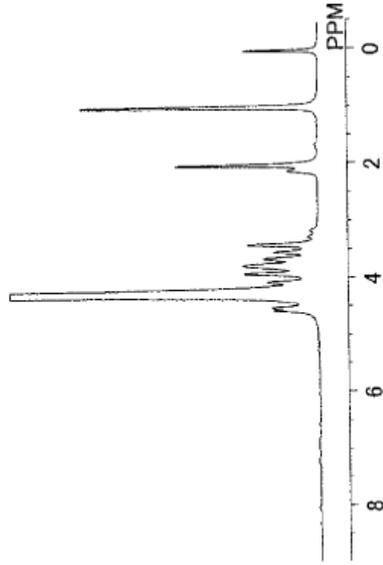


FIG. 3-15 Ejemplo 1-4-15  
HA-Ala-NH<sub>2</sub>/Rh

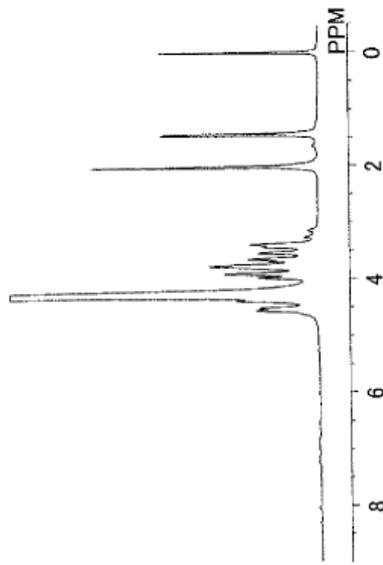


FIG. 3-18 Ejemplo 1-4-18  
HA-Me (arriba), HA-Me/FL (abajo)

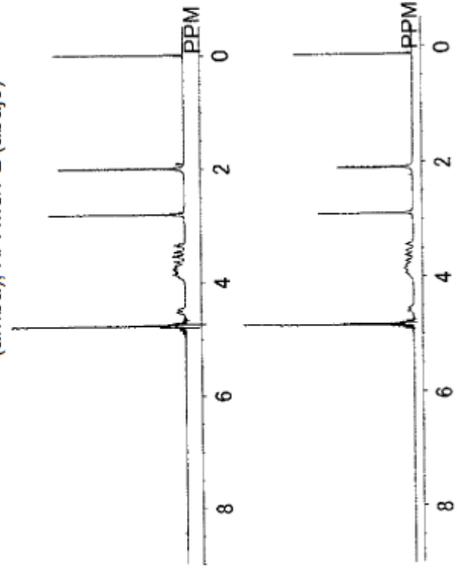


FIG. 3-17 Ejemplo 1-4-17  
HA-Asn-NH<sub>2</sub>/Rh

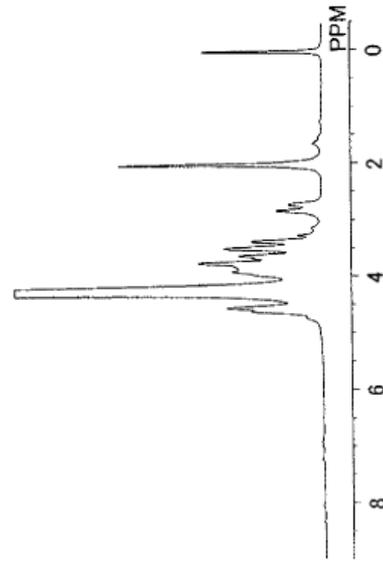


FIG. 4-1 Ejemplo 1-5-1  
HA-AMCHCA

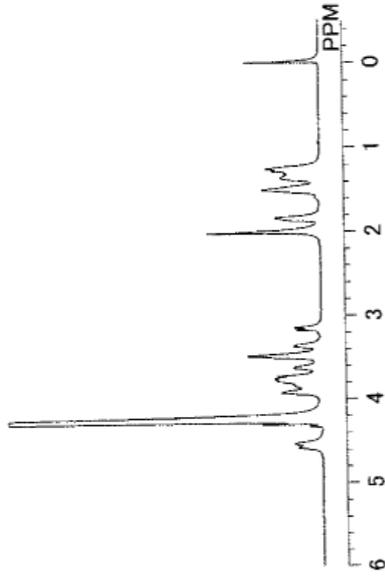


FIG. 4-3 Ejemplo 1-5-3  
HA-Nal

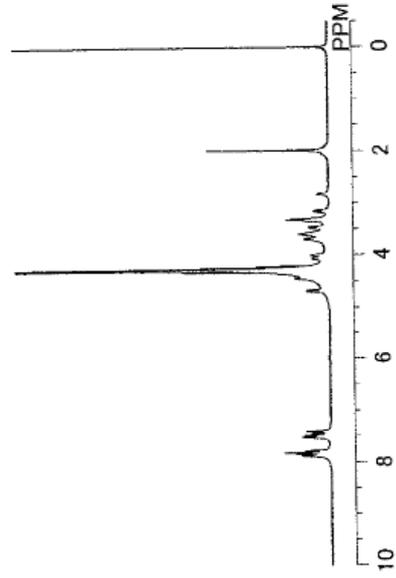


FIG. 3-19 Ejemplo 1-4-19  
HA-Pr (arriba), HA-Pr/FL (abajo)

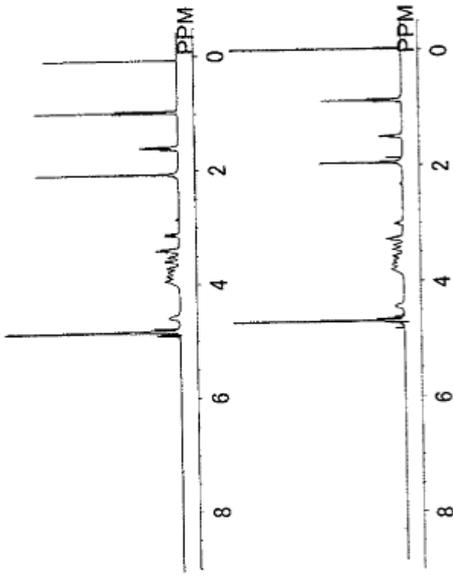


FIG. 4-2 Ejemplo 1-5-2  
HA-pcACHCA

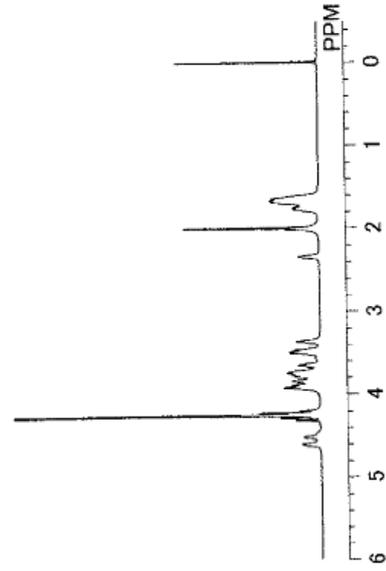


FIG. 4-5 Ejemplo 1-5-5  
HA-Cha

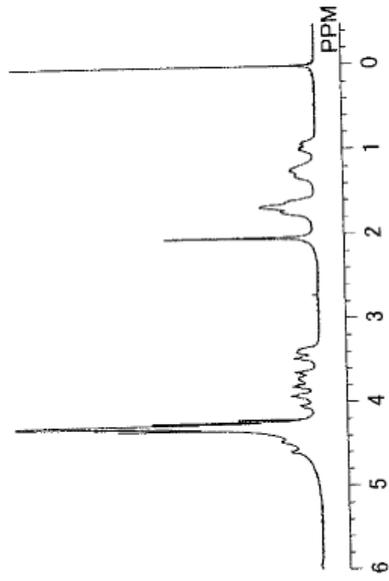


FIG. 4-7 Ejemplo 1-5-7  
HA-3AMBA

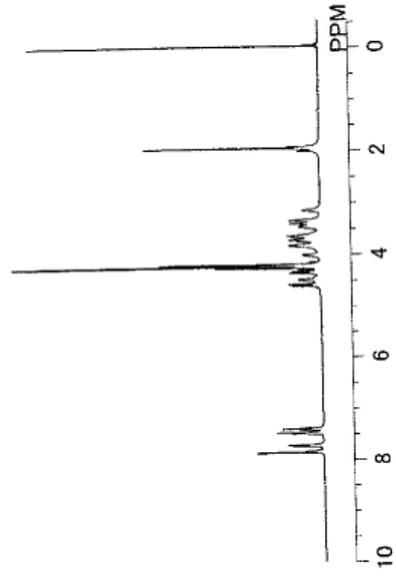


FIG. 4-4 Ejemplo 1-5-4  
HA-APBA

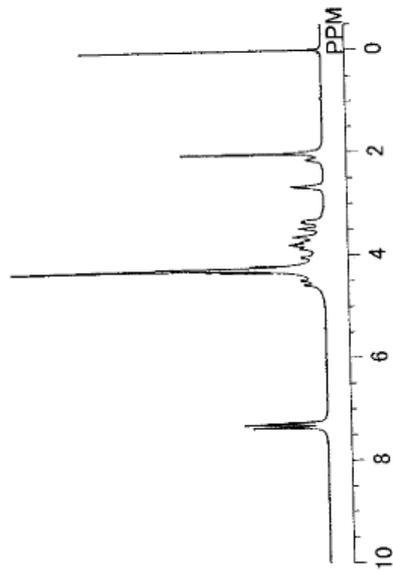


FIG. 4-6 Ejemplo 1-5-6  
HA-AMBA

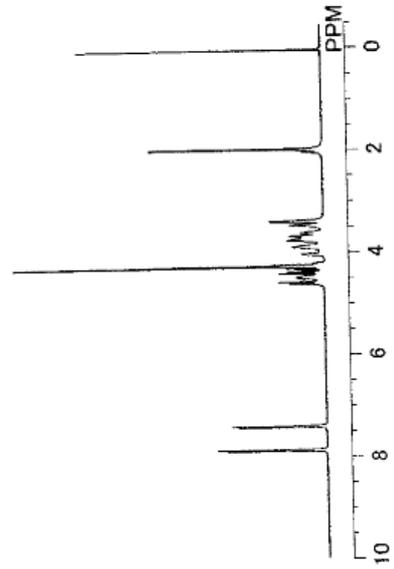


FIG. 4-9 Ejemplo 1-5-9  
HA-AEBA

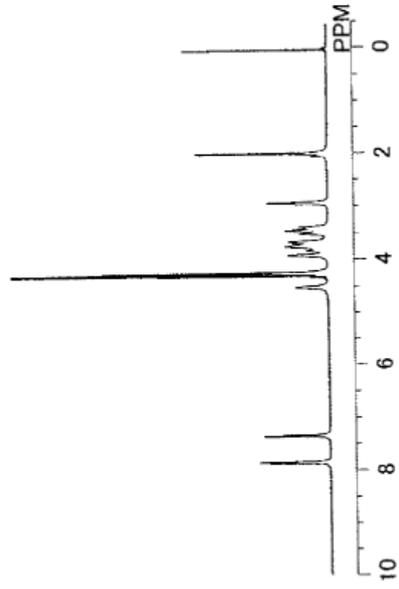


FIG. 4-11 Ejemplo 1-5-11  
HA-AMSA

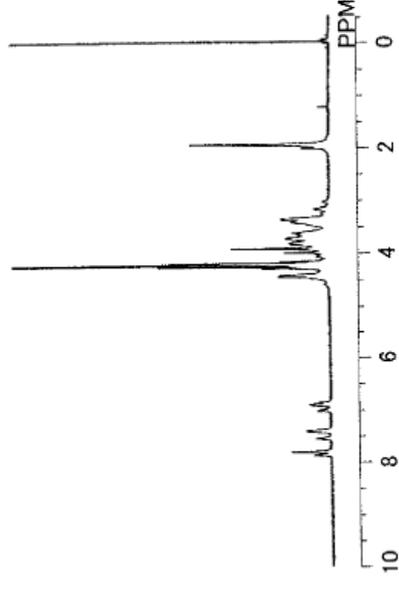


FIG. 4-8 Ejemplo 1-5-8  
HA-APhPA

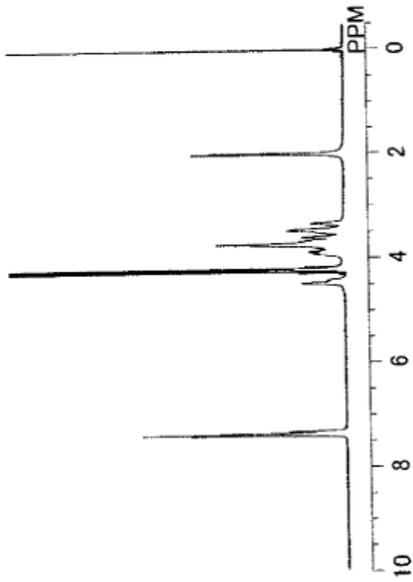


FIG. 4-10 Ejemplo 1-5-10  
HA-AMCIBA

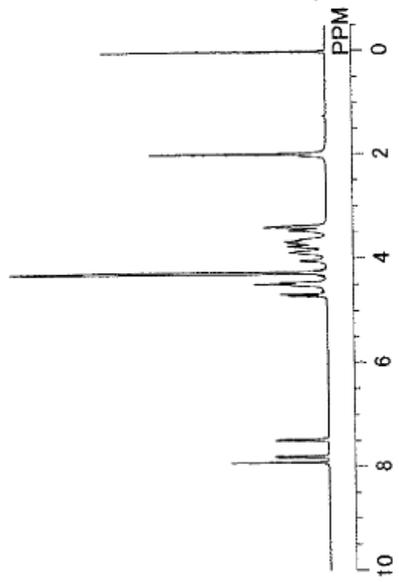


FIG. 4-13 Ejemplo 1-5-13  
HA-Chg

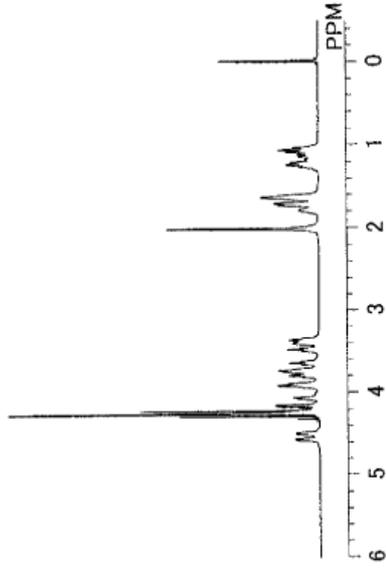


FIG. 4-12 Ejemplo 1-5-12  
HA-4AMCHCA

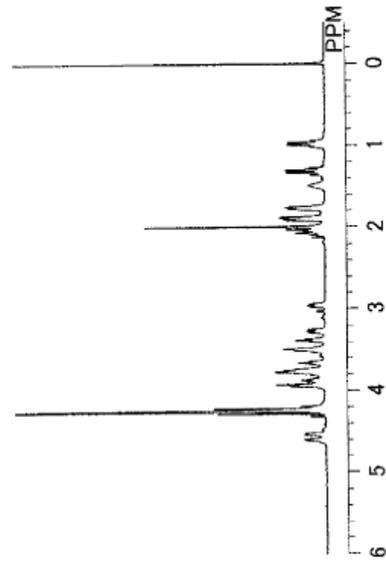


FIG. 5-1 Ejemplo comparativo 1-1-1  
HA-FL (arriba),  
HA-EDOBEA con un grado de modificación bajo (abajo)

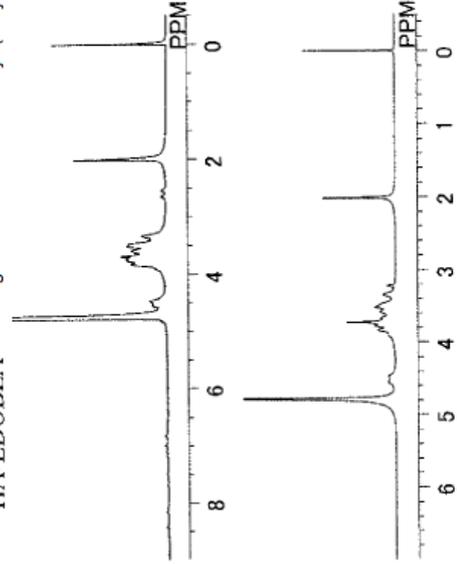


FIG. 4-14 Ejemplo 1-5-14  
HA-pHPHg

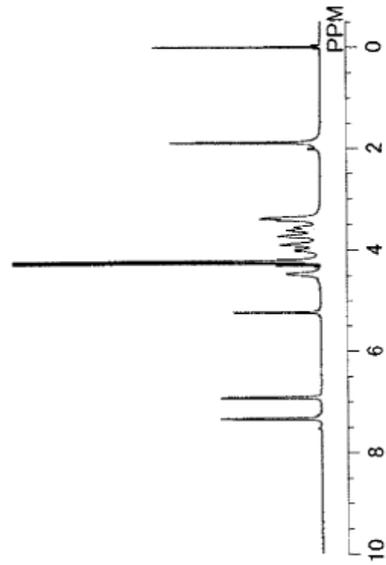


FIG. 5-2 Ejemplo comparativo 1-1-2  
 HA-EDOBEA-Ac/FL (arriba)  
 HA-EDOBEA con un grado de modificación alto (abajo)

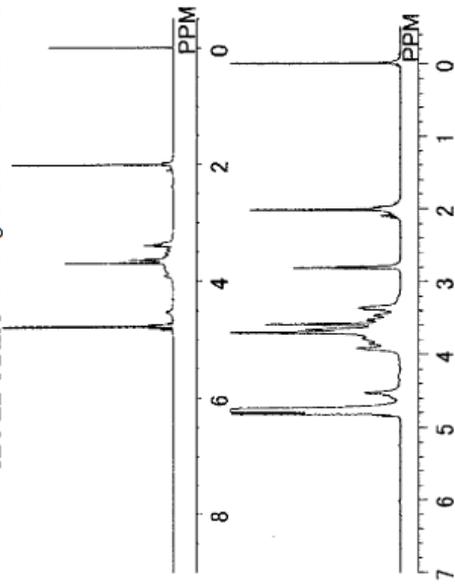


FIG. 5-3 Ejemplo comparativo 1-1-3  
 HA-Phe/FL

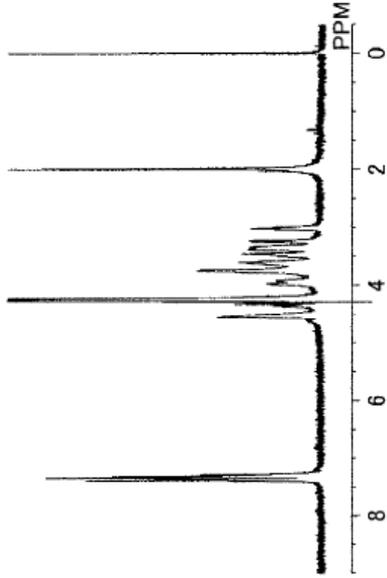


FIG. 5-4 Ejemplo comparativo 1-1-4  
 HA-Tyr/FL

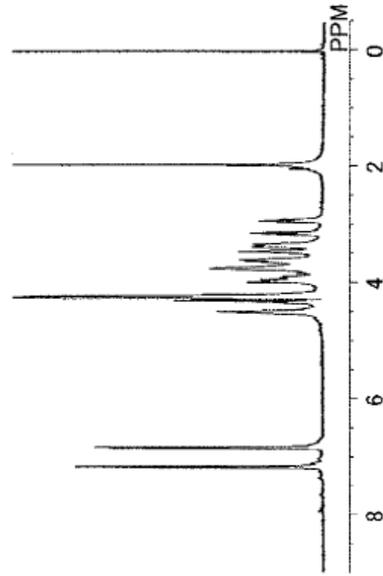


FIG. 5-5 Ejemplo comparativo 1-1-5  
 HA-McPhe/FL

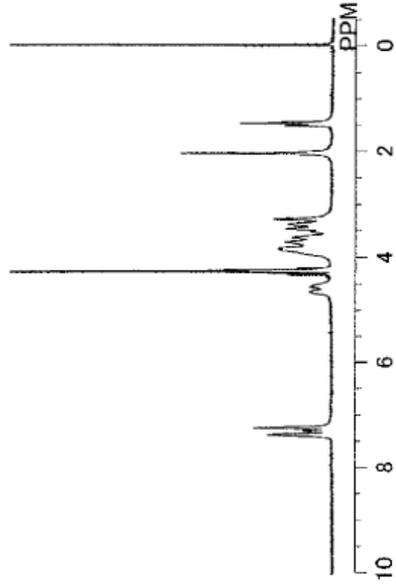


FIG. 5-7 Ejemplo comparativo 1-1-7  
HA-Gly-NH<sub>2</sub>/Rh

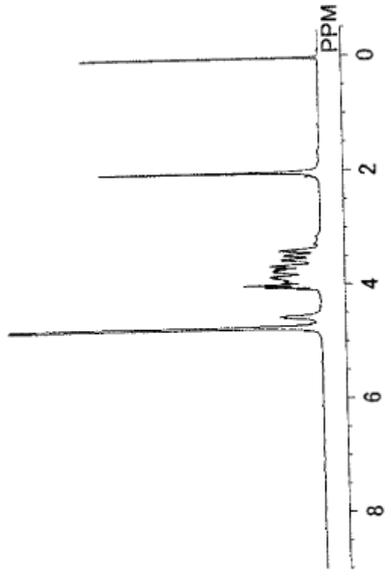


FIG. 5-6 Ejemplo comparativo 1-1-6  
HA-Pro-OMe/FL

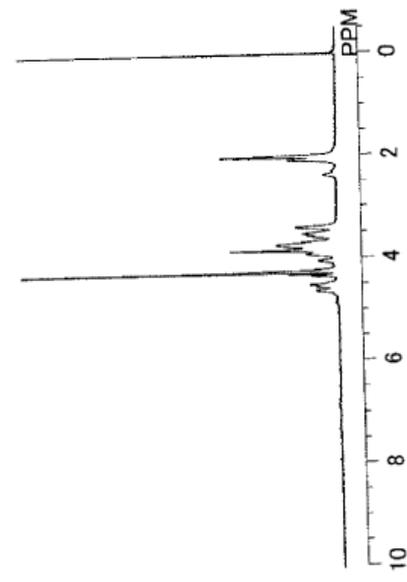


FIG. 5-9 Ejemplo comparativo 1-1-9  
HA-L.eu-NH<sub>2</sub>/Rh

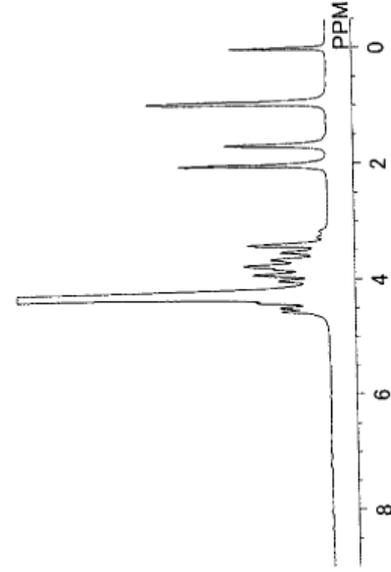


FIG. 5-8 Ejemplo comparativo 1-1-8  
HA-Ser-NH<sub>2</sub>/Rh

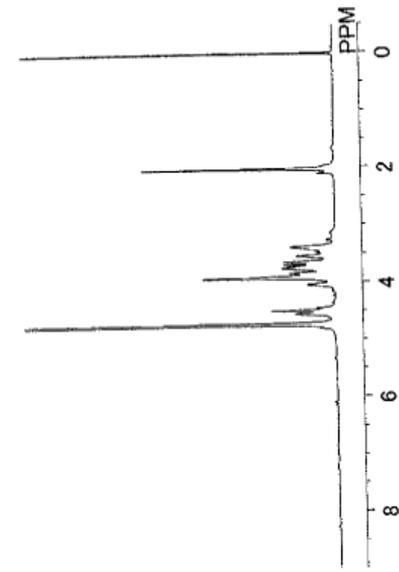


FIG. 5-11 Ejemplo comparativo 1-1-11  
HA-Thr-NH<sub>2</sub>/Rh

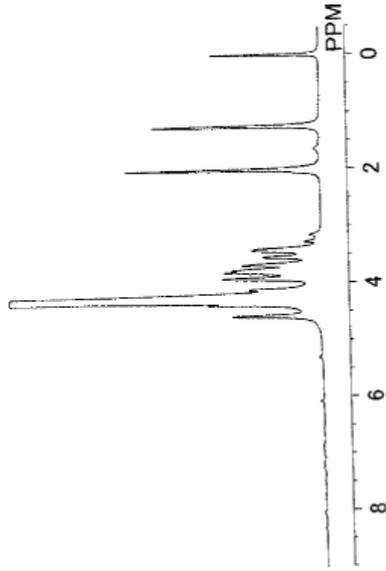


FIG. 6-1 Ejemplo comparativo 1-2-1  
HA-Nle

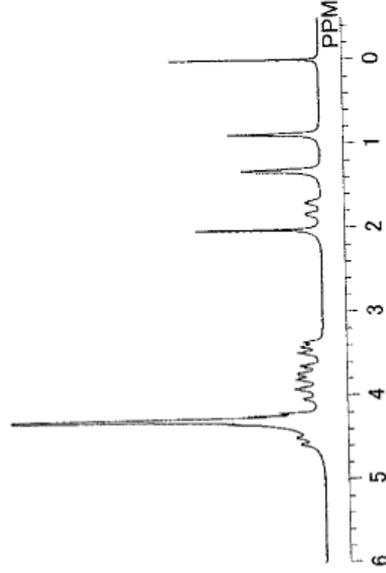


FIG. 5-10 Ejemplo comparativo 1-1-10  
HA-Ile-NH<sub>2</sub>/Rh

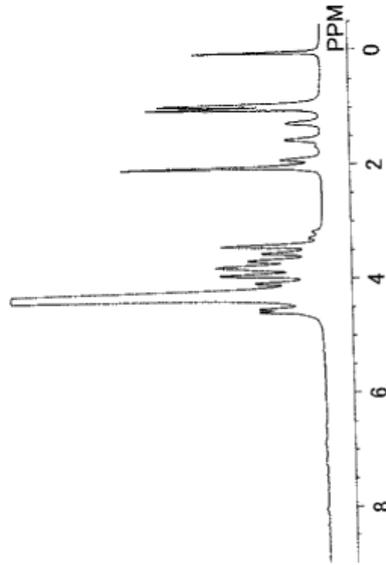


FIG. 5-12 Ejemplo comparativo 1-1-12  
HA-Gln-NH<sub>2</sub>/Rh

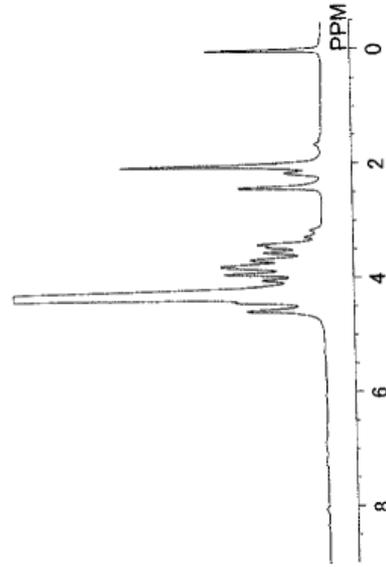


FIG. 6-3 Ejemplo comparativo 1-2-3  
HA-pFPhe

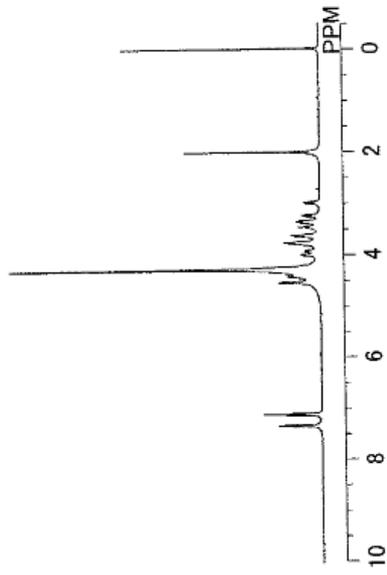


FIG. 6-2 Ejemplo comparativo 1-2-2  
HA-ti.eu

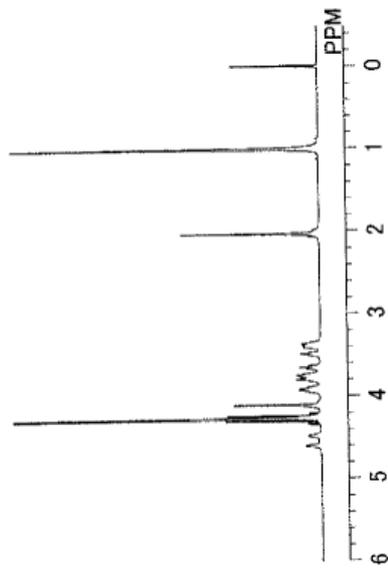


FIG. 7 Ejemplo comparativo 1-3  
PEG-FL

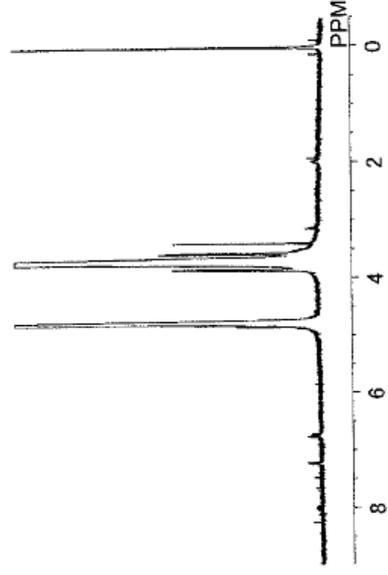


FIG. 6-4 Ejemplo comparativo 1-2-4  
HA-Phg

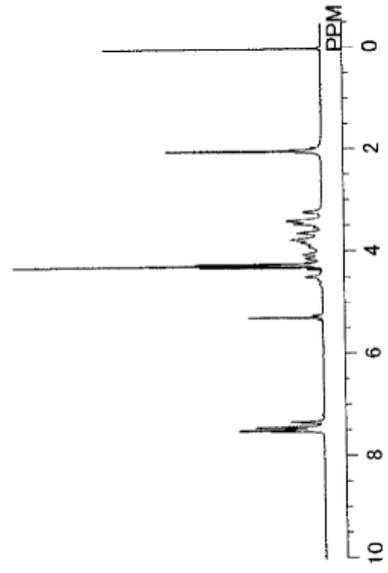


FIG. 8 Ejemplo 3-2-2  
Cursos de tiempo de las concentraciones de la muestra en plasma de rata (promedio del grupo; ug/ml)

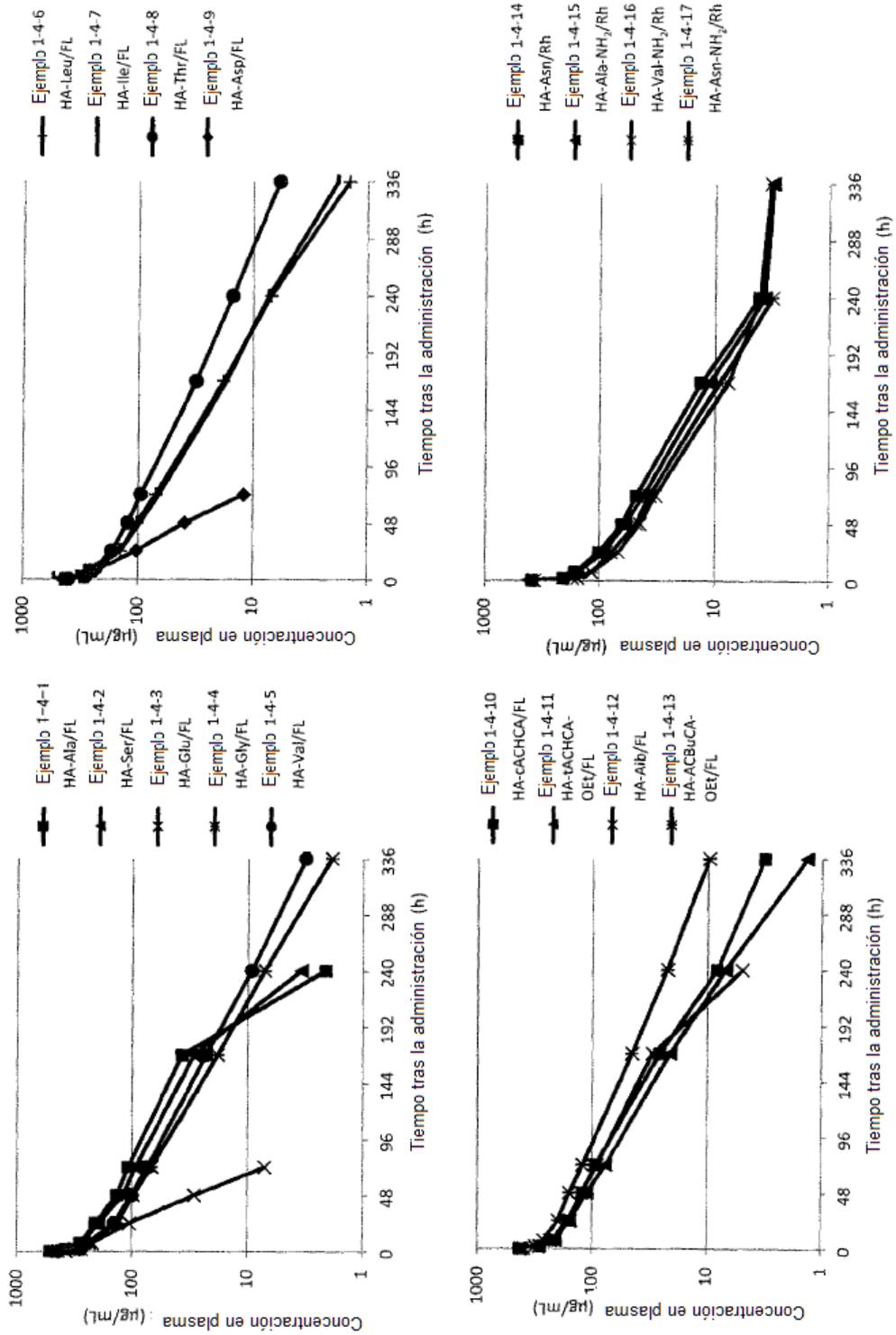
N.º ej.	1-4-1	1-4-2	1-4-3	1-4-4	1-4-5	1-4-6	1-4-7	1-4-8	1-4-9	1-4-10	1-4-11	1-4-12	1-4-13
Tempo tras la dosis (h)	HA-Ala/FL	HA-Ser/FL	HA-Glu/FL	HA-Gly/FL	HA-Val/FL	HA-Leu/FL	HA-Ile/FL	HA-Thr/FL	HA-Asp/FL	HA-cACHCA/FL	HA-tACHCA-OE/FL	HA-Alb/FL	HA-AcBuCA-OE/FL
0.0833	509.27	487.25	430.40	371.75	428.23	469.33	536.32	399.01	448.19	430.05	433.85	398.04	423.97
2	367.09	341.71	305.54	275.36	276.60	316.35	333.18	284.64	288.66	286.51	299.38	290.16	316.17
7	281.01	267.23	220.92	234.70	241.32	250.13	283.30	251.23	234.68	224.89	210.06	231.64	267.37
24	207.98	196.04	105.97	135.21	143.21	140.86	141.87	168.15	103.54	163.92	158.41	155.24	200.69
48	136.66	120.60	29.29	98.54	101.59	102.12	95.52	122.62	39.61	121.97	111.63	124.03	159.18
72	108.44	93.03	7.11	68.70	73.86	70.21	66.27	94.72	12.00	93.08	76.08	90.86	121.59
168	37.47	29.59	BLQ	18.36	23.30	18.24	17.19	31.69	BLQ	25.52	20.82	29.50	44.44
240	2.10	3.41	BLQ	7.13	9.24	6.99	7.32	15.21	BLQ	8.32	7.03	4.99	22.04
336	BLQ	BLQ	BLQ	1.87	3.14	1.44	1.81	5.88	BLQ	3.21	1.36	BLQ	9.80
LOQ	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2

N.º ej.	1-4-14	1-4-15	1-4-16	1-4-17	1-4-18	1-4-19
Tempo tras la dosis (h)	HA-Asn/Rh	HA-Ala-NH <sub>2</sub> /Rh	HA-Val-NH <sub>2</sub> /Rh	HA-Asn-NH <sub>2</sub> /Rh	HA-Met/FL	HA-Pr/FL
0.0833	390.30	418.18	370.98	373.53	469.81	543.44
2	206.99	214.62	154.76	171.68	270.29	379.55
7	165.19	154.87	115.79	117.97	224.48	262.91
24	100.56	90.66	67.95	78.46	146.32	159.37
48	62.86	58.98	43.88	47.19	96.93	105.20
72	47.13	40.55	32.15	36.01	75.15	91.62
168	13.01	11.14	7.78	9.16	27.36	34.51
240	4.21	3.74	4.10	3.19	14.87	17.41
336	BLQ	3.14	3.28	BLQ	9.76	10.53
LOQ	2.5	2.5	2.5	2.5	1.2	1.2

N.º Ej. comp.	1-1-1	1-1-2	1-1-3	1-1-4	1-1-5	1-1-6	1-1-7	1-1-8	1-1-9	1-1-10	1-1-11	1-1-12	1-3
Tempo tras la dosis (h)	HA-FL	HA-EDOBEA-Ac/FL	HA-Phe/FL	HA-Tyr/FL	HA-MePhe/FL	HA-Pro-OMe/FL	HA-Gly-NH <sub>2</sub> /Rh	HA-Ser-NH <sub>2</sub> /Rh	HA-Leu-NH <sub>2</sub> /Rh	HA-Ile-NH <sub>2</sub> /Rh	HA-Thr-NH <sub>2</sub> /Rh	HA-Gln-NH <sub>2</sub> /Rh	PEG-FL (30kDa)
0.0833	507.01	456.19	385.57	355.36	412.48	517.02	308.71	206.63	341.83	357.65	186.73	272.66	291.56
2	305.83	361.18	230.30	172.63	178.11	390.82	97.73	28.73	132.79	151.47	20.70	72.73	172.55
7	118.84	300.31	157.31	65.93	58.50	229.13	61.43	12.33	89.38	105.09	8.81	41.47	102.62
24	BLQ	251.73	37.47	BLQ	6.35	67.09	28.08	4.86	45.75	55.05	2.67	18.63	32.95
48	BLQ	181.60	3.27	BLQ	BLQ	9.50	16.44	3.09	28.06	35.57	BLQ	10.21	8.99
72	BLQ	142.96	BLQ	BLQ	BLQ	1.17	11.06	BLQ	18.29	22.74	BLQ	5.94	4.37
168	BLQ	58.21	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	5.19	5.89	BLQ	BLQ	1.20
240	BLQ	24.81	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	2.70	3.05	BLQ	BLQ	0.97
336	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	2.23	BLQ	BLQ	BLQ	0.66
LOQ	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	2.5	2.5	2.0	2.0	2.0	2.0	0.5

\*1) BLQ: Por debajo del LOQ  
\*2) -: No hay datos disponibles

FIG. 9-1 Ejemplo 3-2-2 Cursos de tiempo de las concentraciones de las muestras en plasma de rata (gráficos)



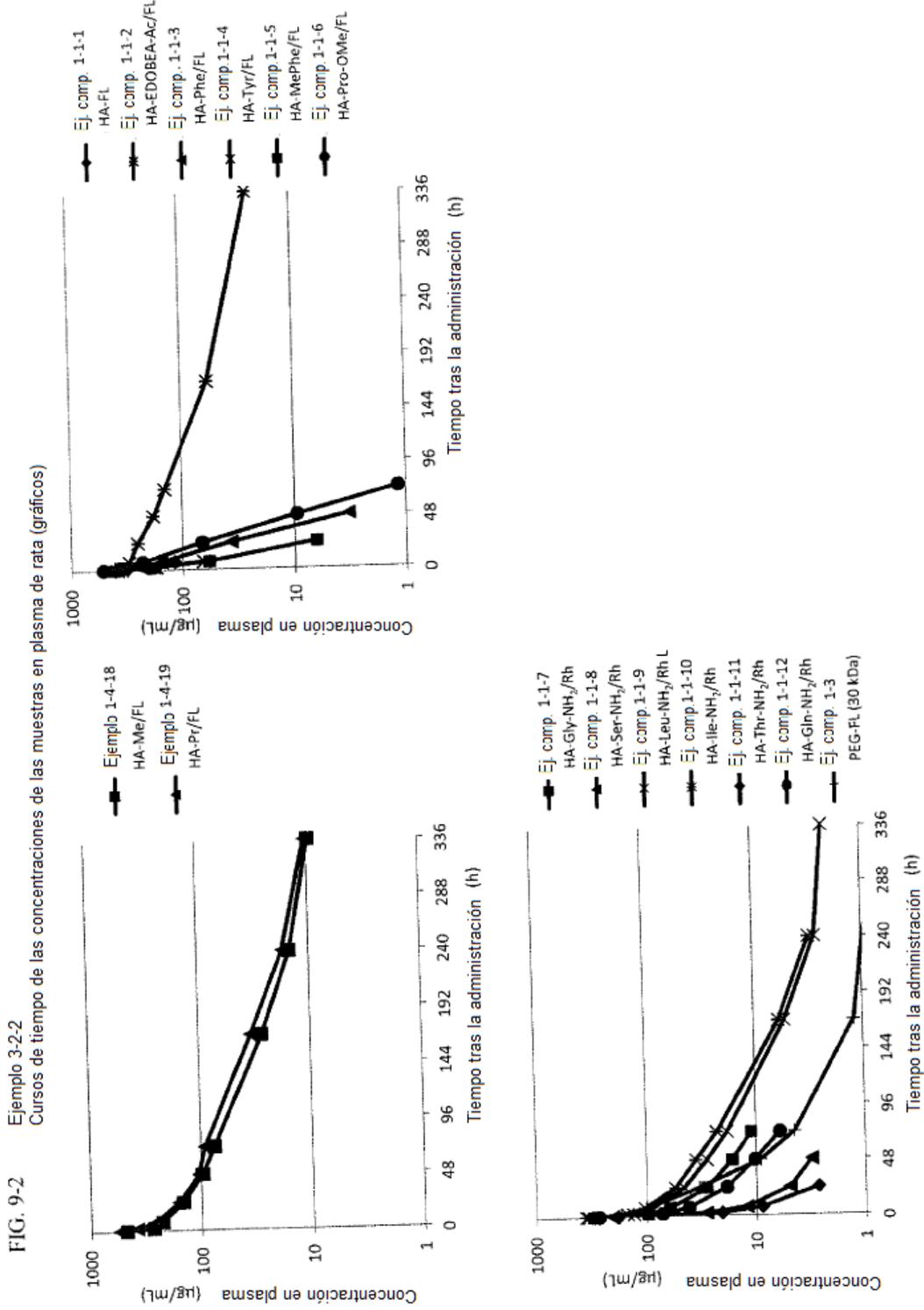


FIG. 10-1  
Ejemplo 3-3-2  
Cromatogramas SEC de orinas de rata

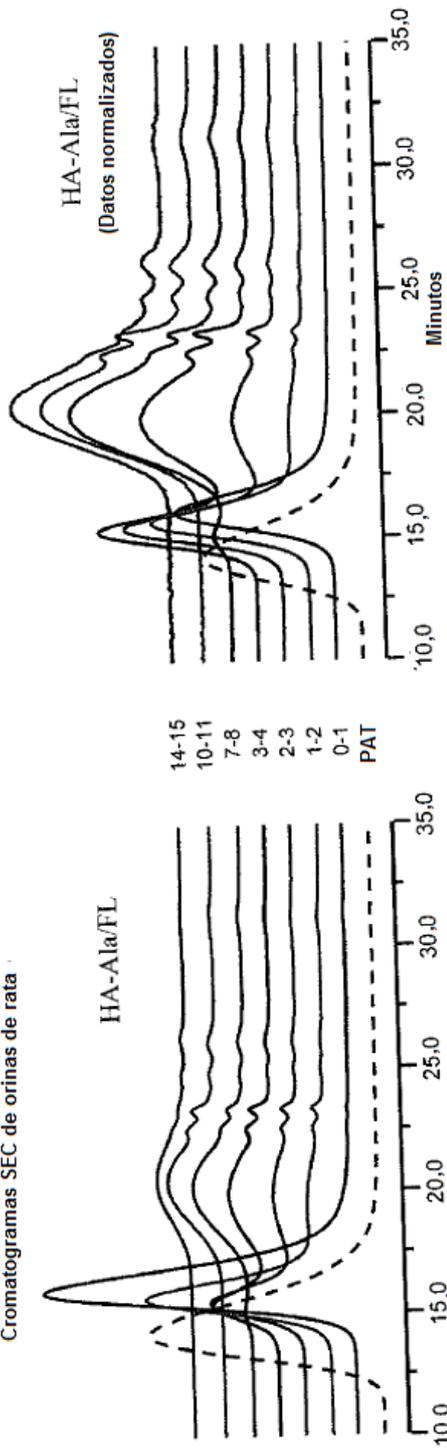


FIG. 10-2  
Ejemplo 3-3-2  
Cromatogramas SEC de orinas de rata

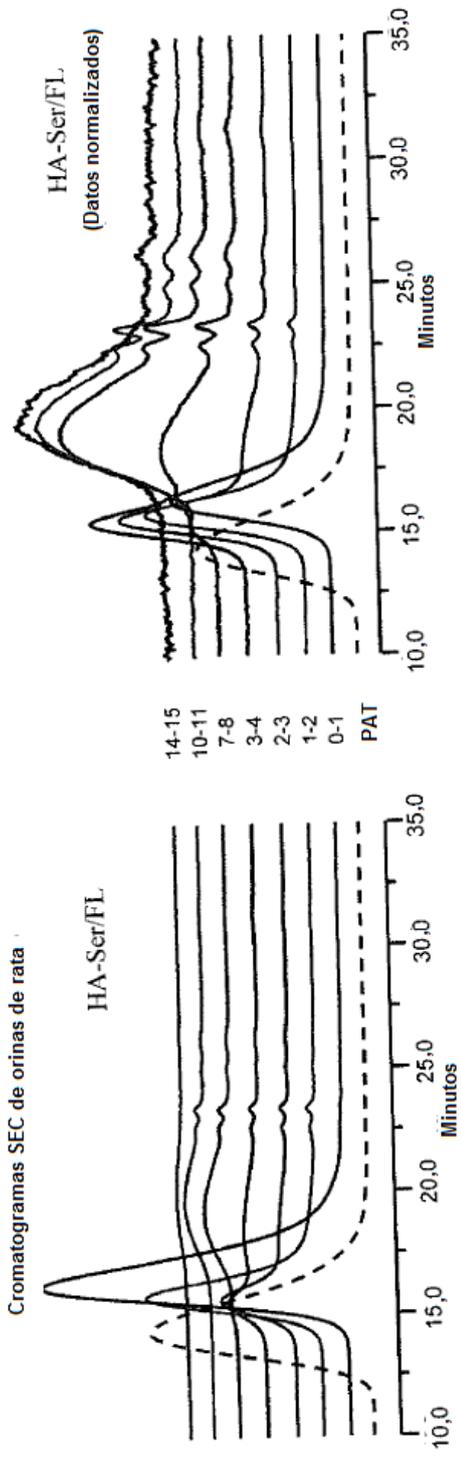


FIG. 10-3 Ejemplo 3-3-2  
Cromatogramas SEC de orinas de rata

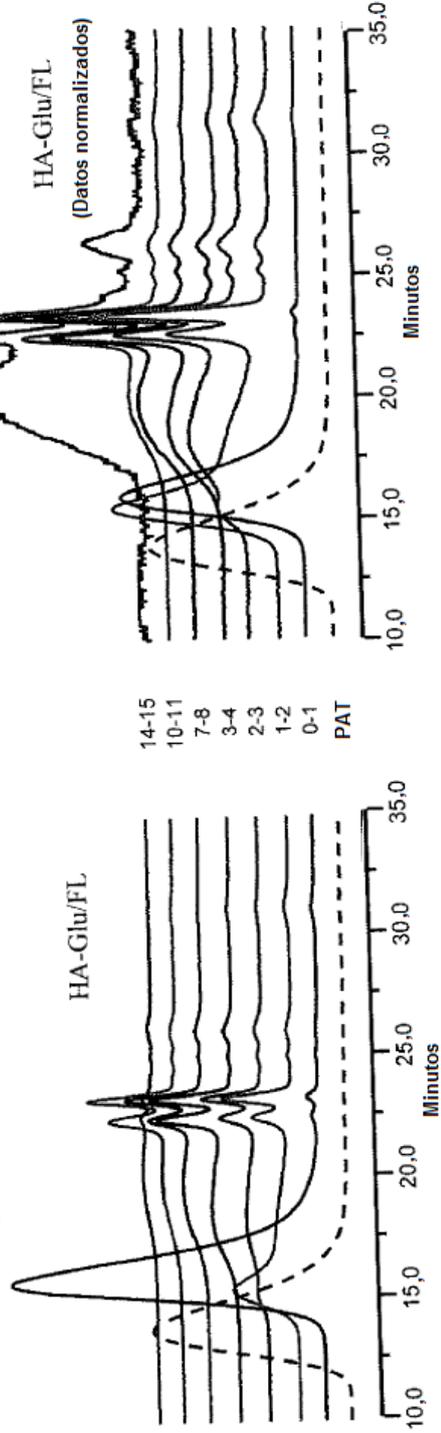


FIG. 10-4 Ejemplo 3-3-2  
Cromatogramas SEC de orinas de rata

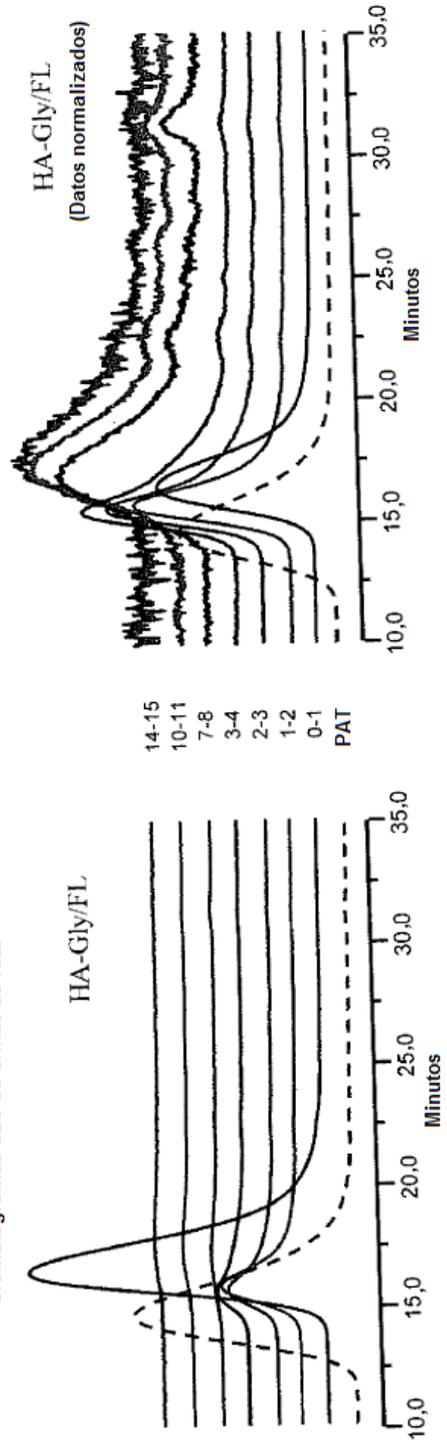


FIG. 10-5 Ejemplo 3-3-2 Cromatogramas SEC de orinas de rata

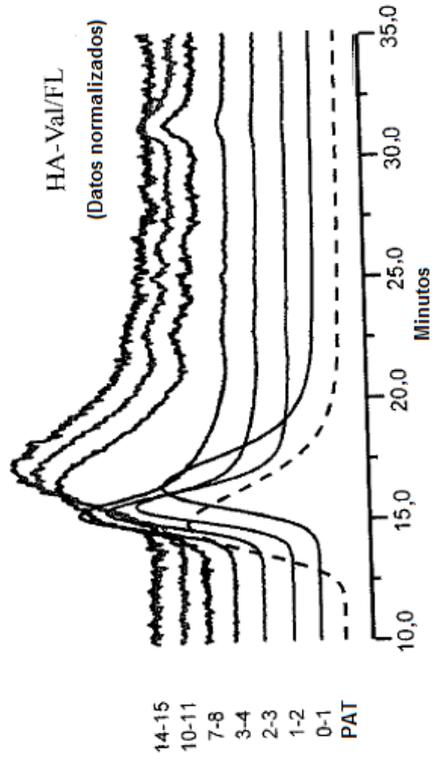
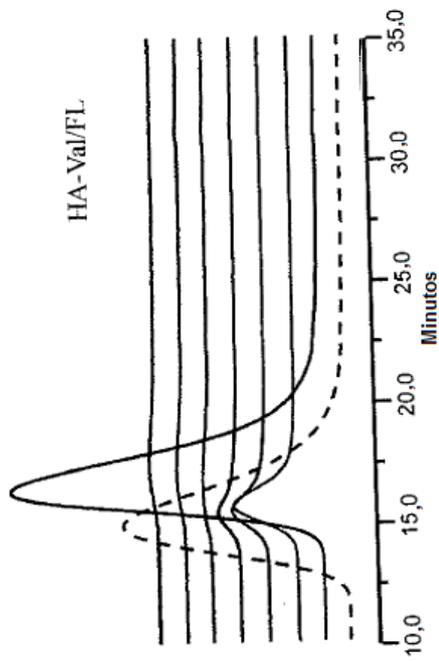


FIG. 10-6 Ejemplo 3-3-2 Cromatogramas SEC de orinas de rata

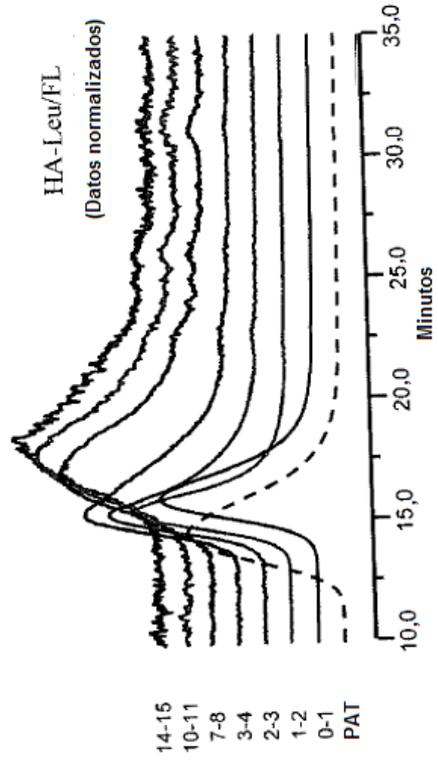
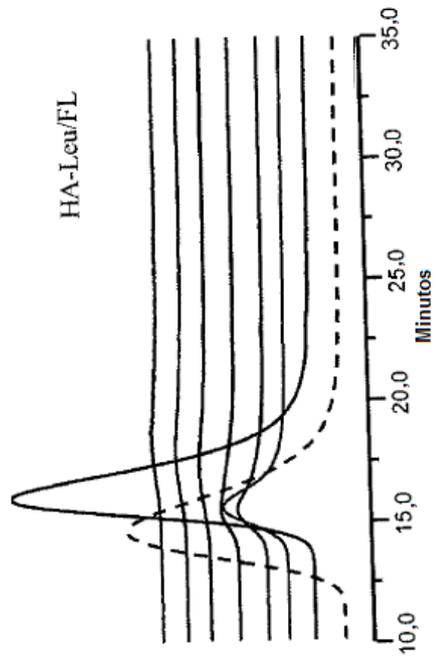


FIG. 10-7 Ejemplo 3-3-2  
Cromatogramas SEC de orinas de rata

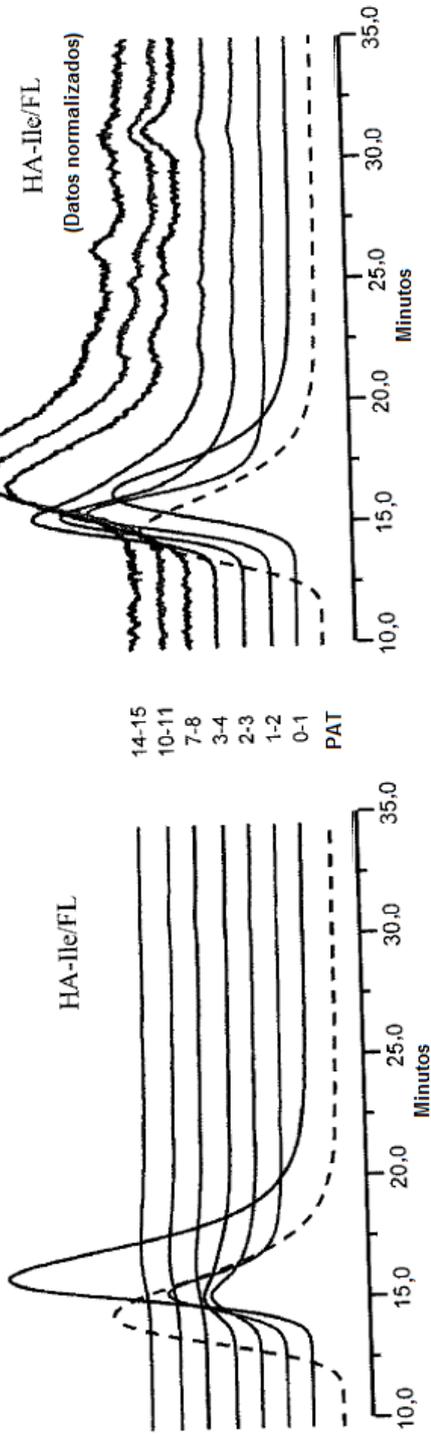


FIG. 10-8 Ejemplo 3-3-2  
Cromatogramas SEC de orinas de rata

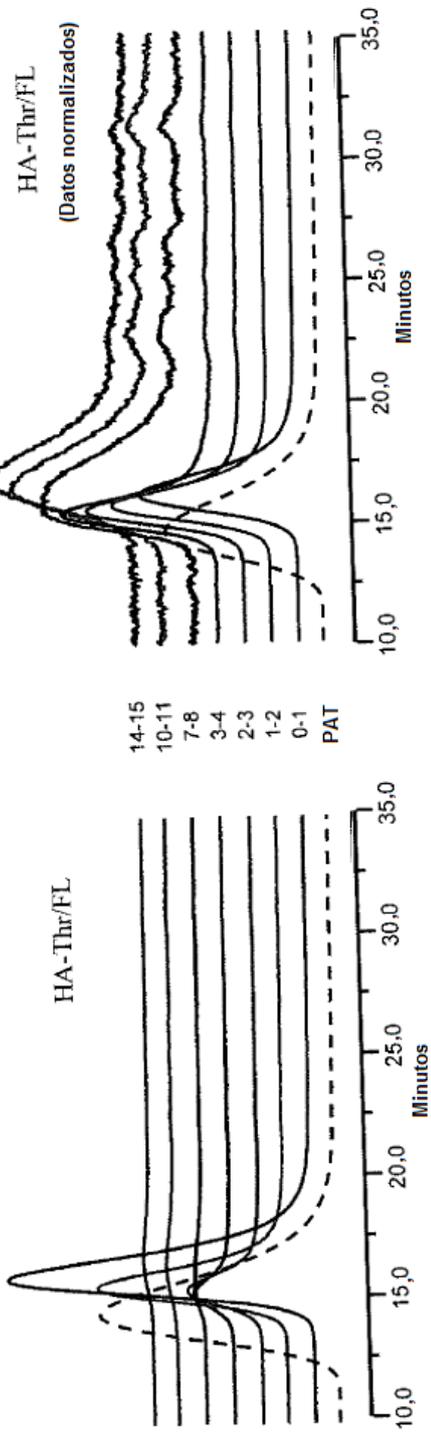


FIG. 10-9 Ejemplo 3-3-2  
Cromatogramas SEC de orinas de rata

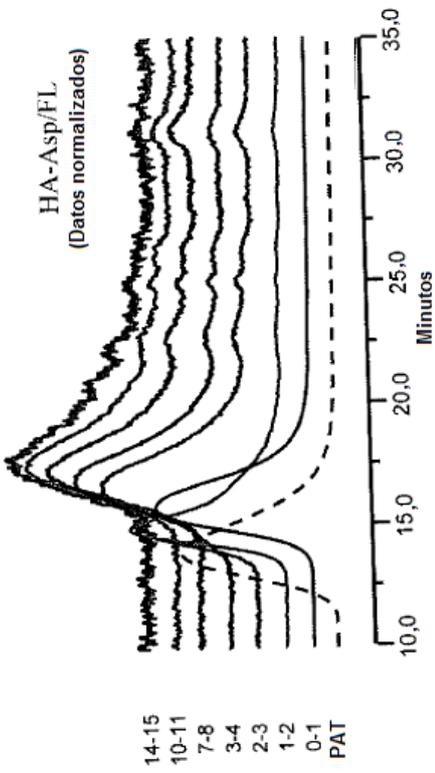
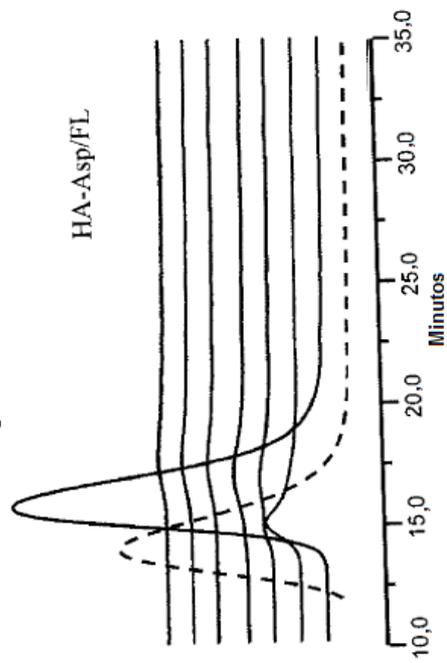


FIG. 10-10 Ejemplo 3-3-2  
Cromatogramas SEC de orinas de rata

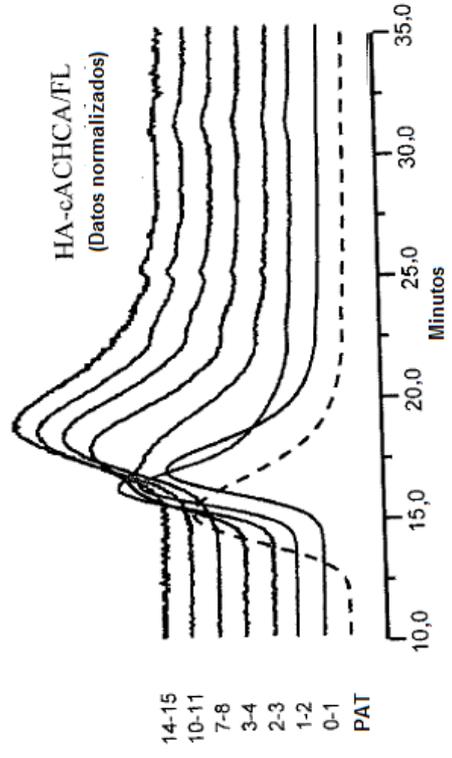
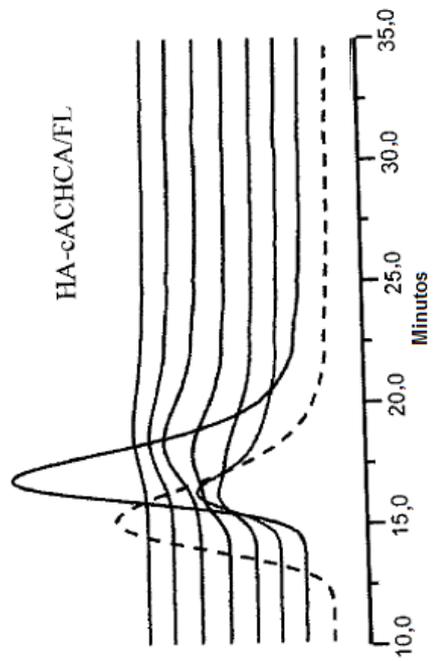


FIG. 10-11 Ejemplo 3-3-2  
Cromatogramas SEC de orinas de rata

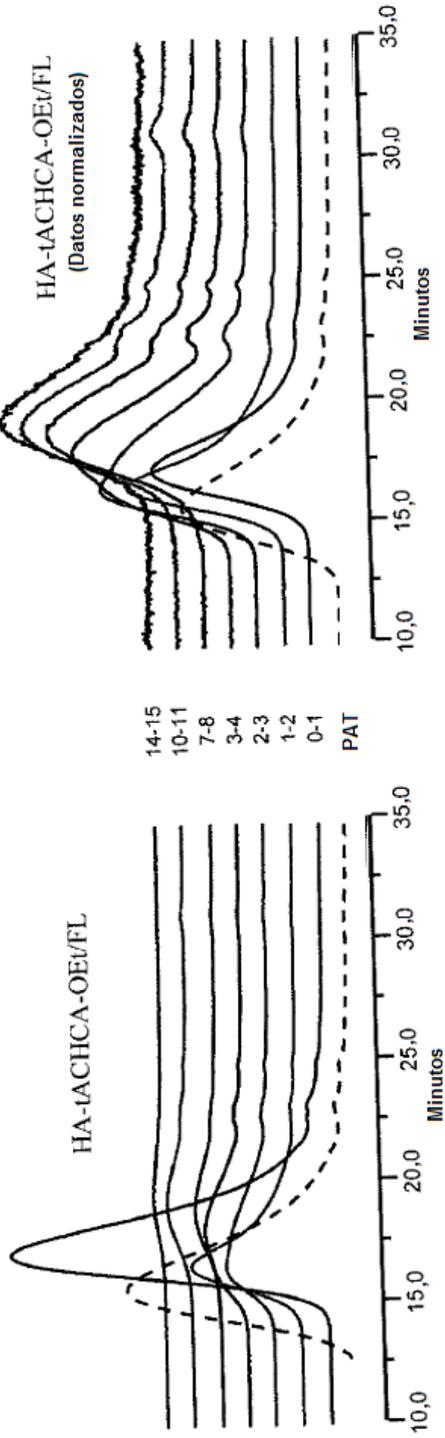


FIG. 10-12 Ejemplo 3-3-2  
Cromatogramas SEC de orinas de rata

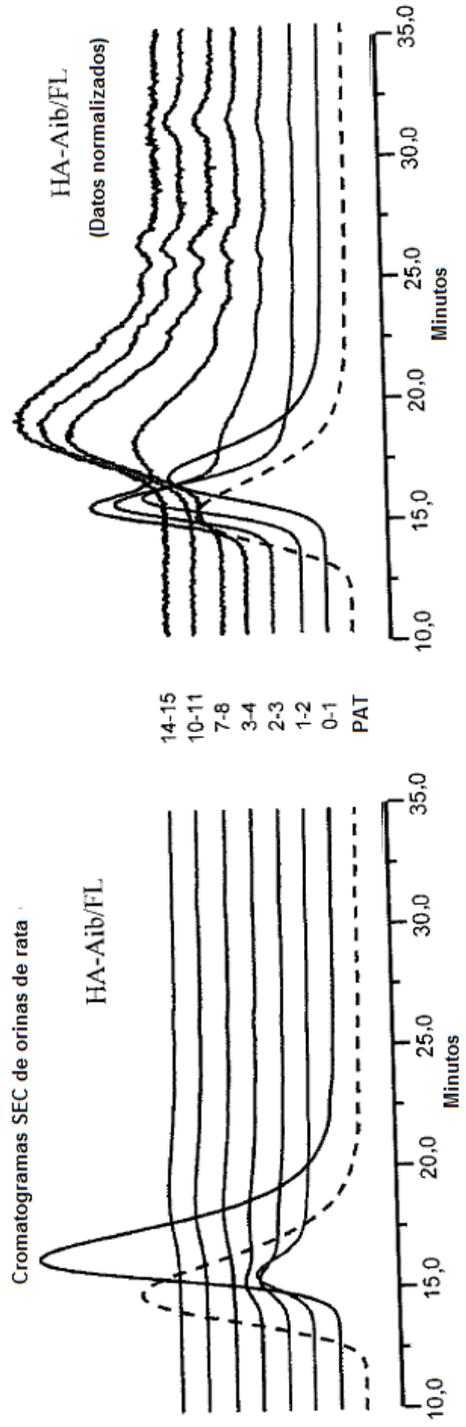


FIG. 10-13 Ejemplo 3-3-2  
Cromatogramas SEC de orinas de rata

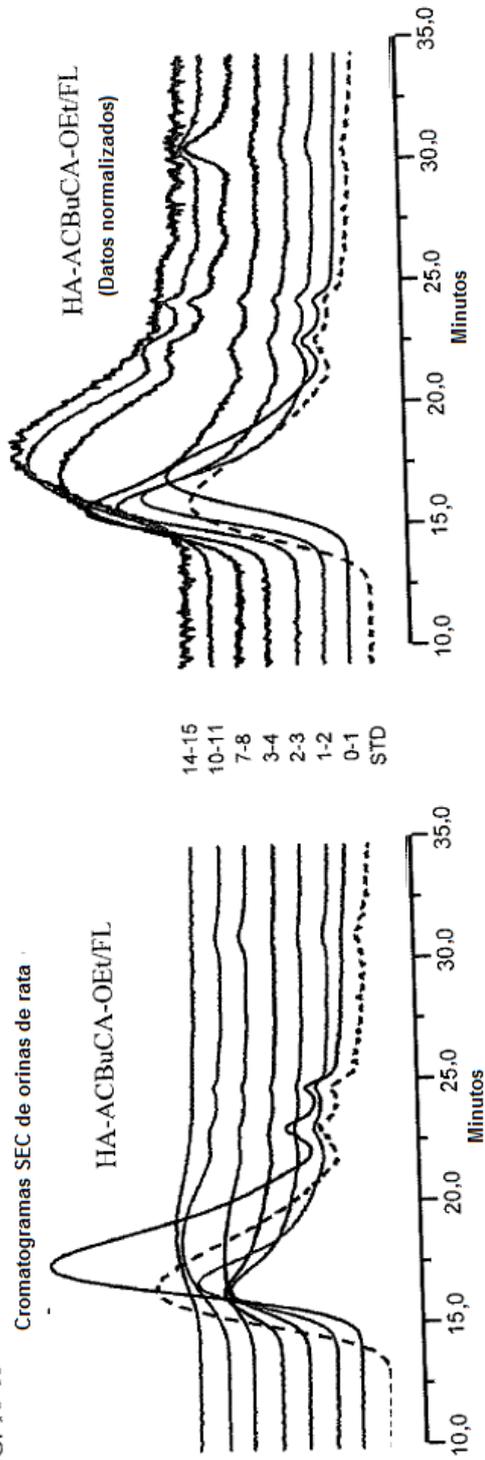


FIG. 10-14 Ejemplo 3-3-2  
Cromatogramas SEC de orinas de rata

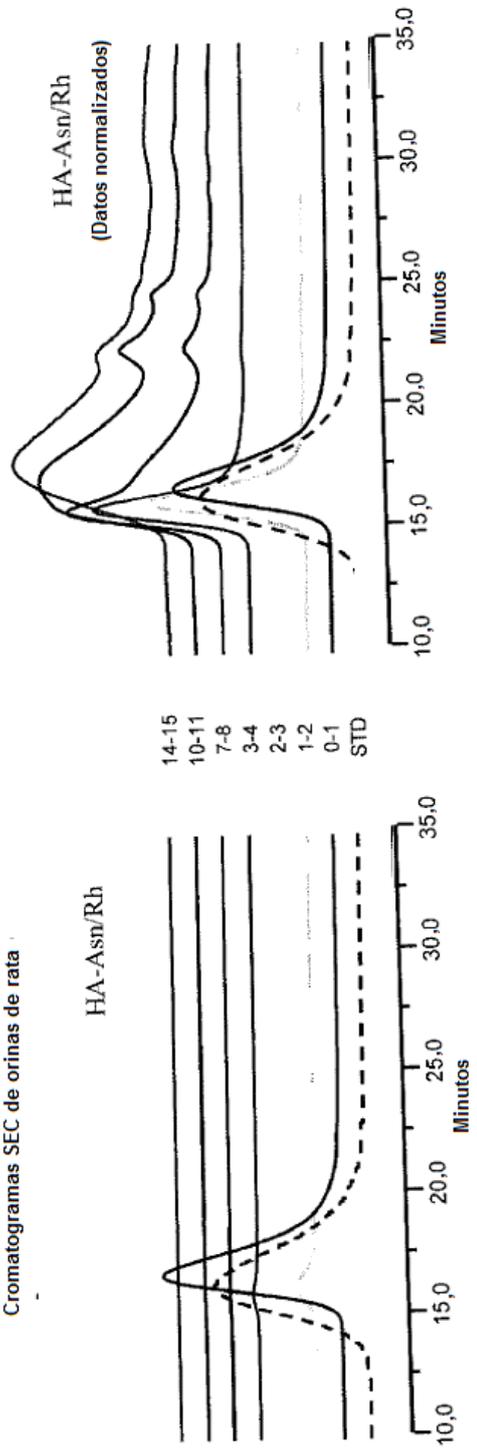


FIG. 10-15 Ejemplo 3-3-2  
Cromatogramas SEC de orinas de rata

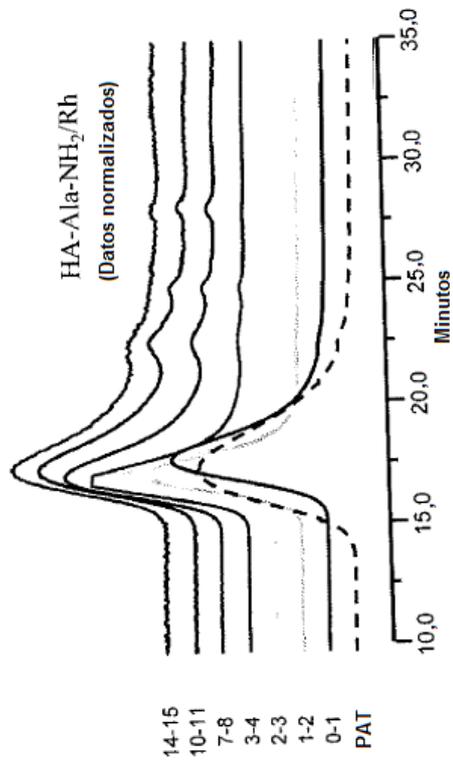


FIG. 10-16 Ejemplo 3-3-2  
Cromatogramas SEC de orinas de rata

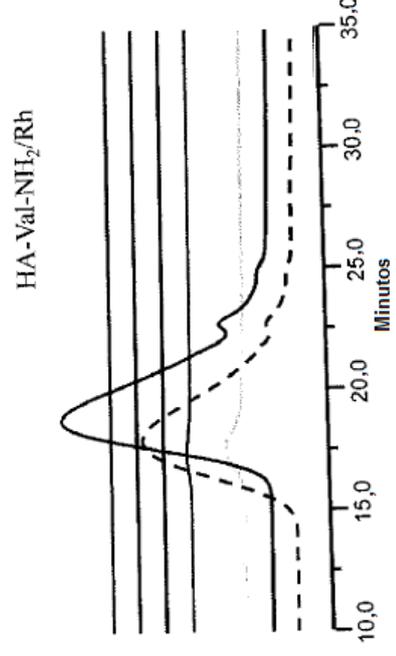
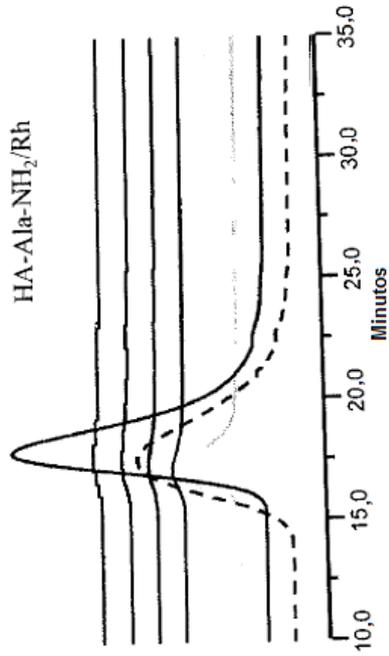
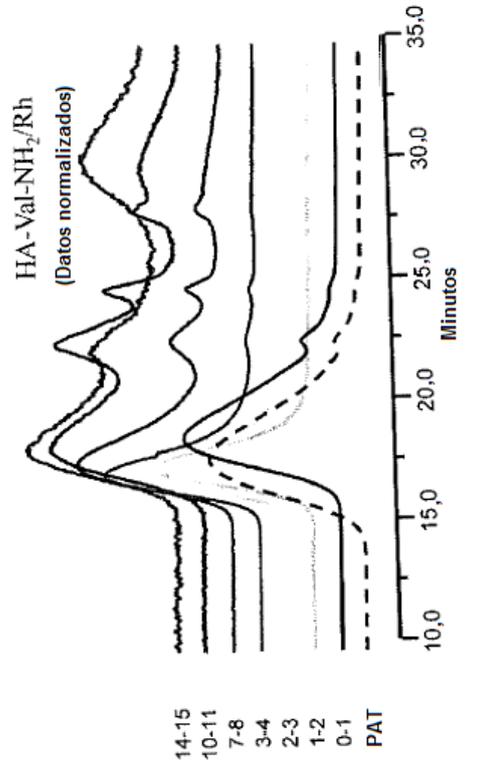


FIG. 10-17 Ejemplo 3-3-2  
Cromatogramas SEC de orinas de rata

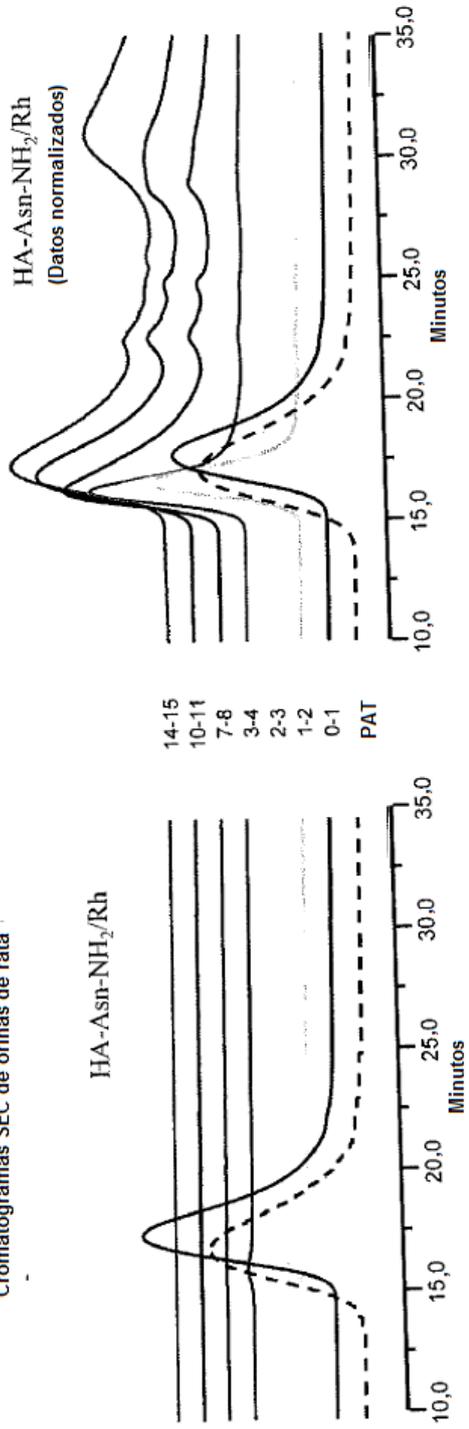


FIG. 10-18 Ejemplo 3-3-2  
Cromatogramas SEC de orinas de rata

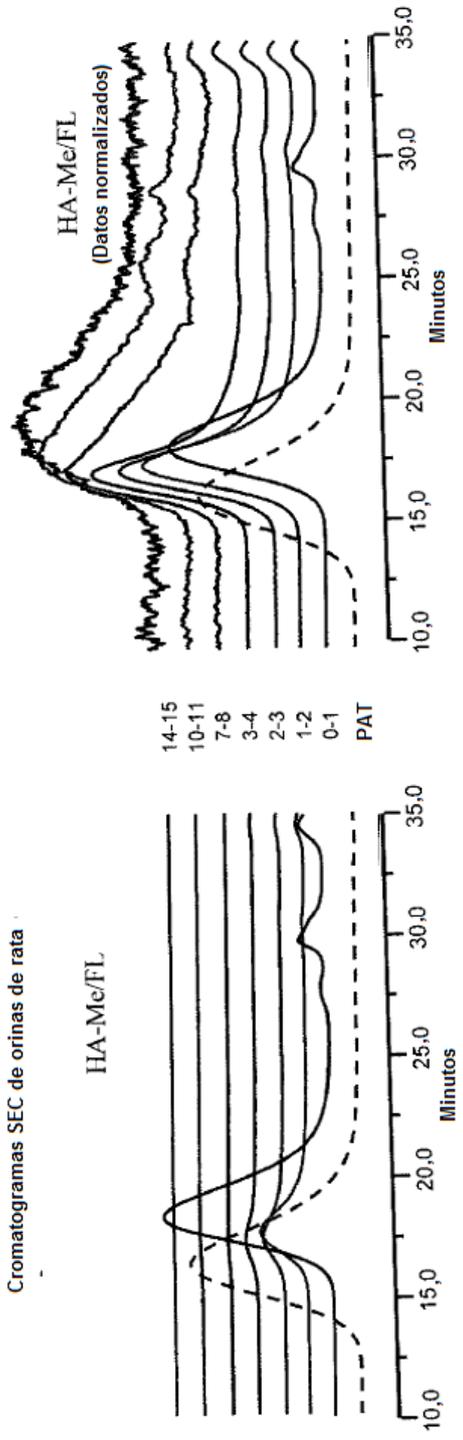
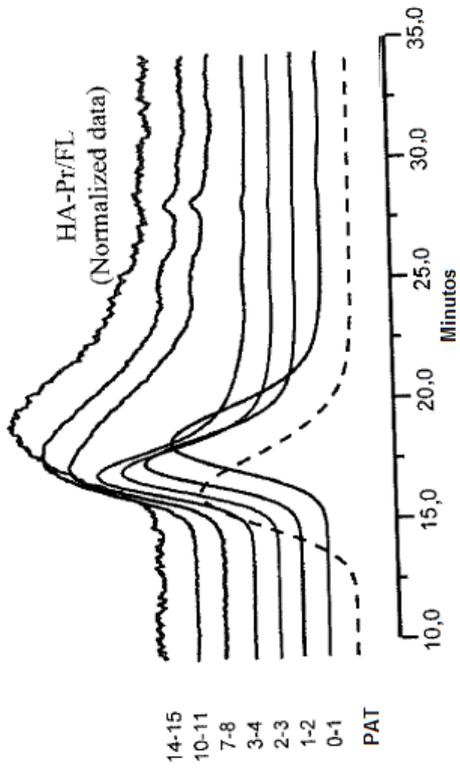


FIG. 10-19 Ejemplo 3-3-2  
Cromatogramas SEC de orinas de rata



[FIG. 10-20 Ejemplo 3-3-2  
Cromatogramas SEC de orinas de rata

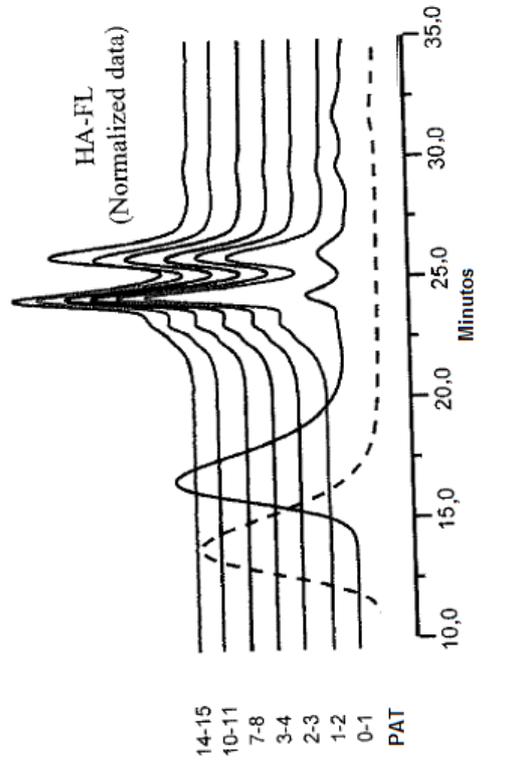


FIG. 10-21 Ejemplo 3-3-2  
Cromatogramas SEC de orinas de rata

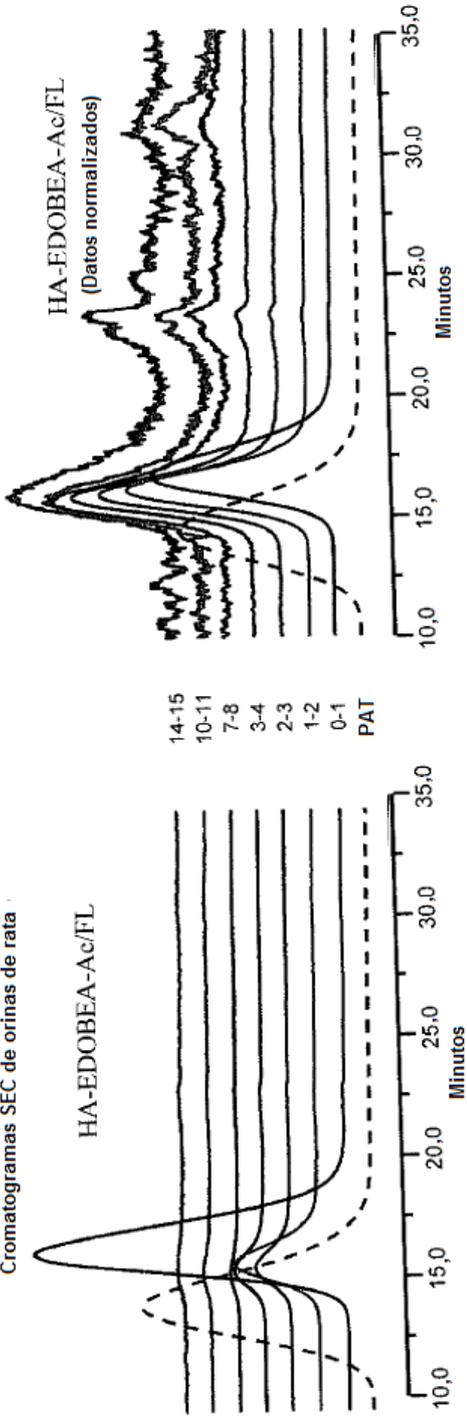


FIG. 10-22 Ejemplo 3-3-2  
Cromatogramas SEC de orinas de rata

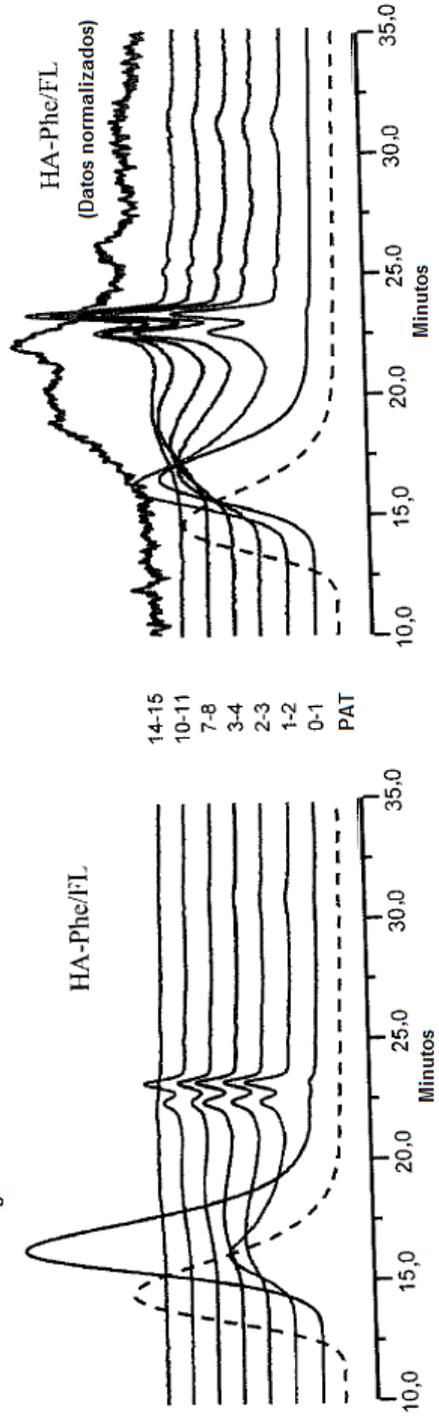


FIG. 10-23 Ejemplo 3-3-2  
Cromatogramas SEC de orinas de rata

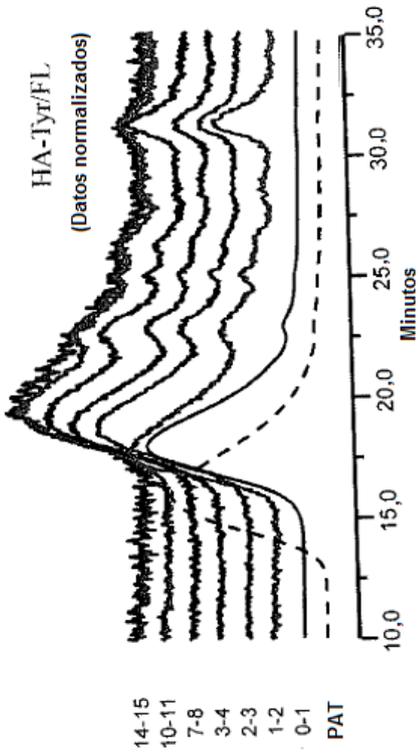
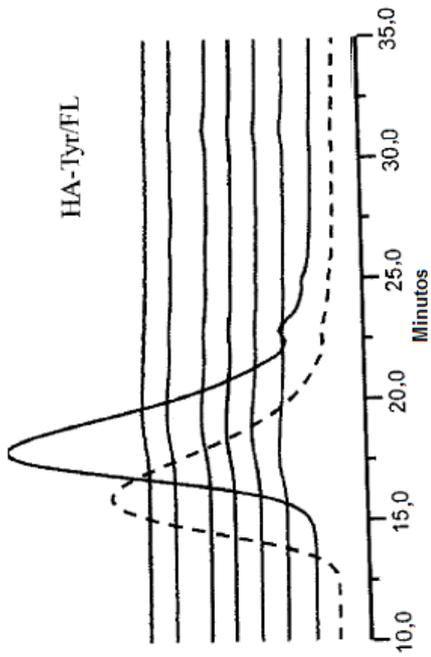


FIG. 10-24 Ejemplo 3-3-2  
Cromatogramas SEC de orinas de rata

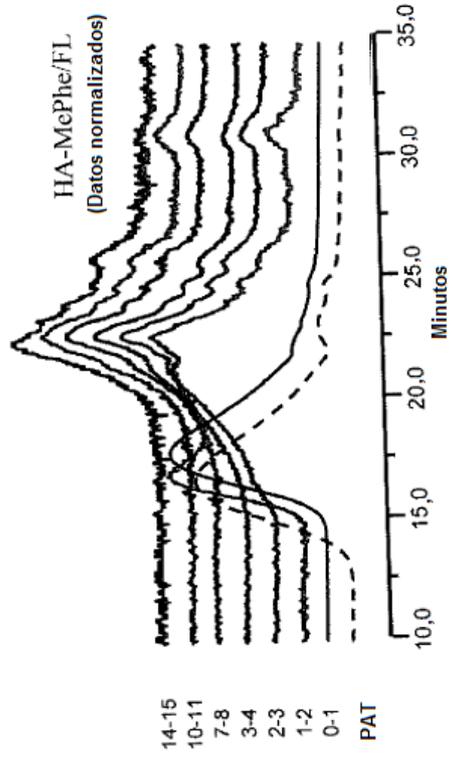
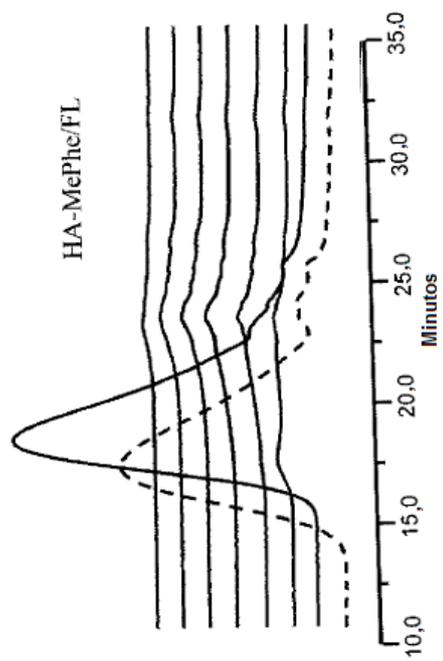


FIG. 10-25 Ejemplo 3-3-2

Cromatogramas SEC de orinas de rata

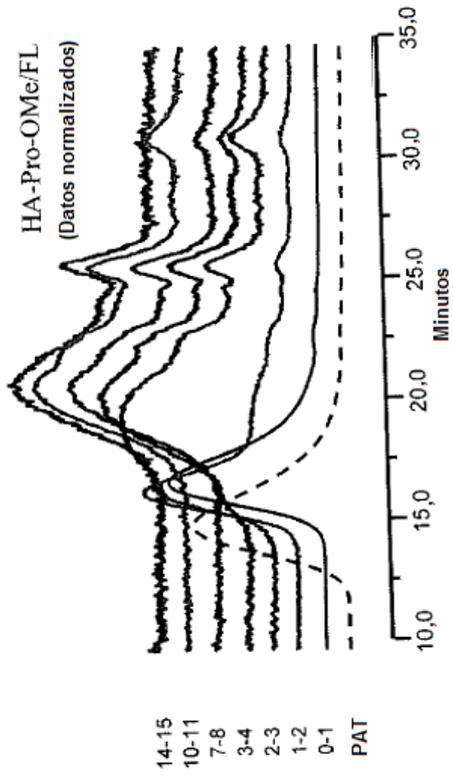
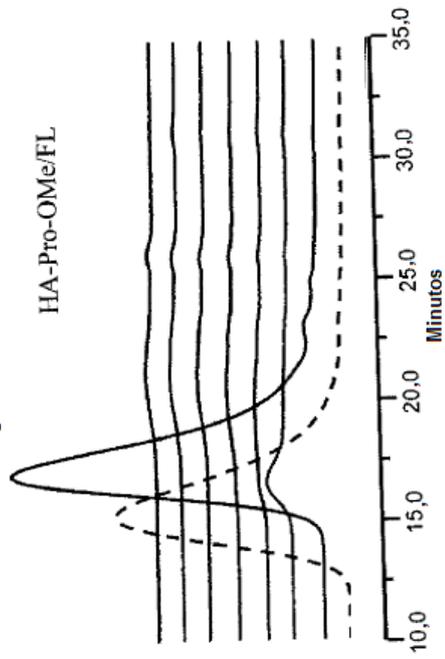


FIG. 10-26 Ejemplo 3-3-2

Cromatogramas SEC de orinas de rata

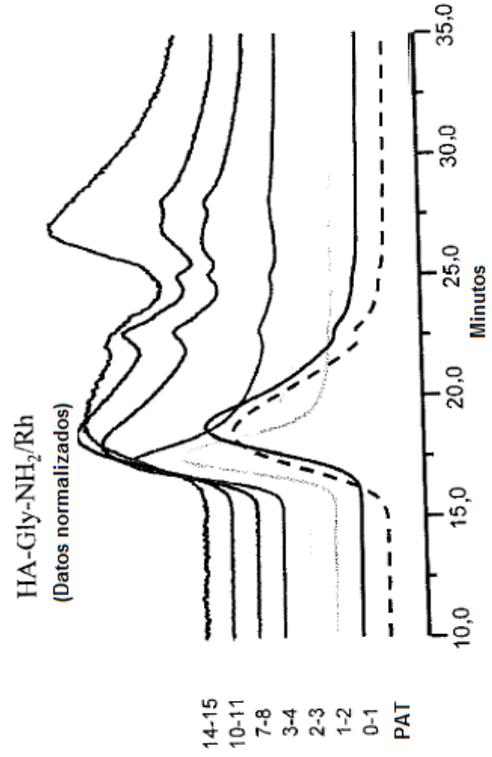
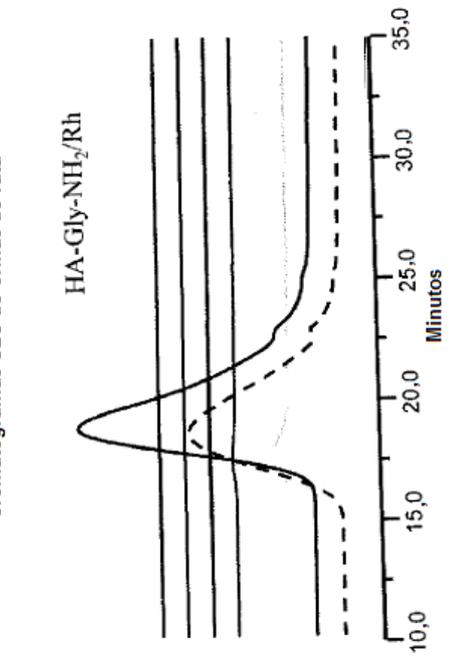


FIG. 10-27 Ejemplo 3-3-2

Cromatogramas SEC de orinas de rata

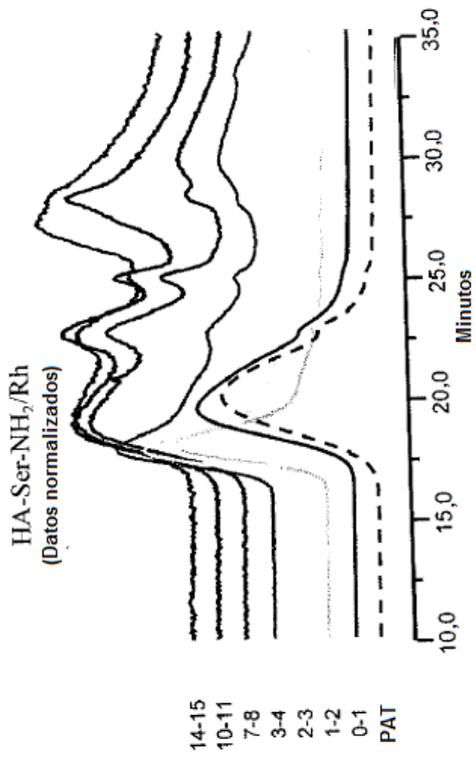
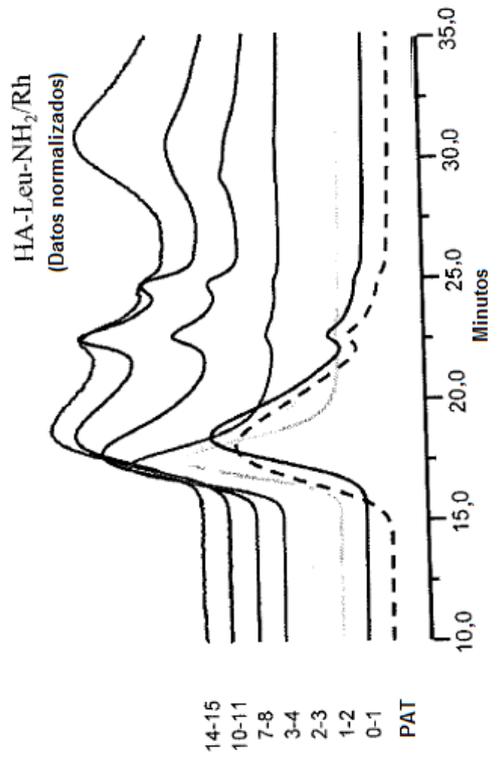


FIG. 10-28 Ejemplo 3-3-2

Cromatogramas SEC de orinas de rata



HA-Ser-NH<sub>2</sub>/Rh

HA-Leu-NH<sub>2</sub>/Rh

FIG. 10-29 Ejemplo 3-3-2  
Cromatogramas SEC de orinas de rata

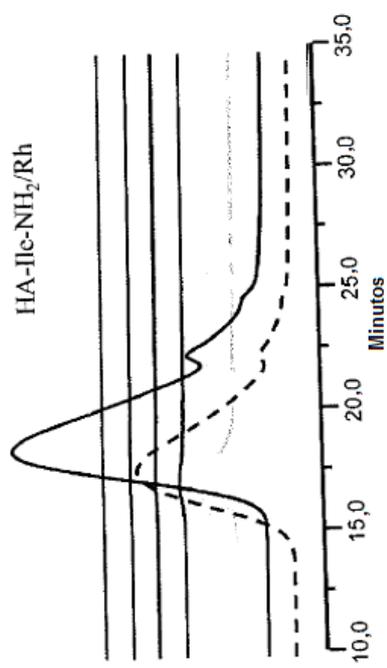
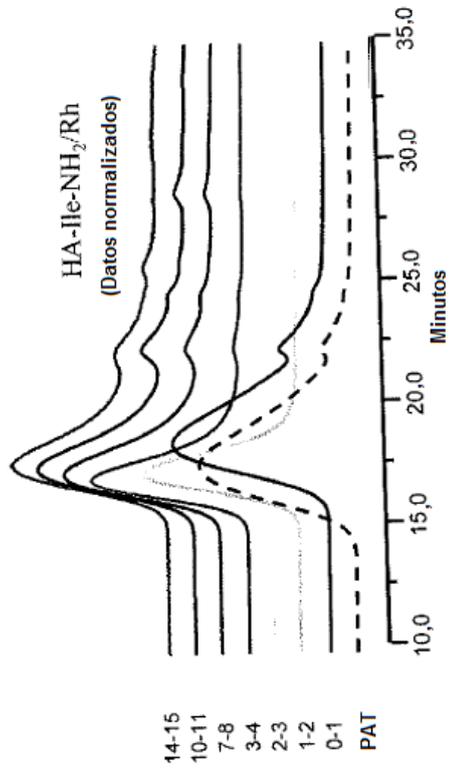


FIG. 10-30 Ejemplo 3-3-2  
Cromatogramas SEC de orinas de rata

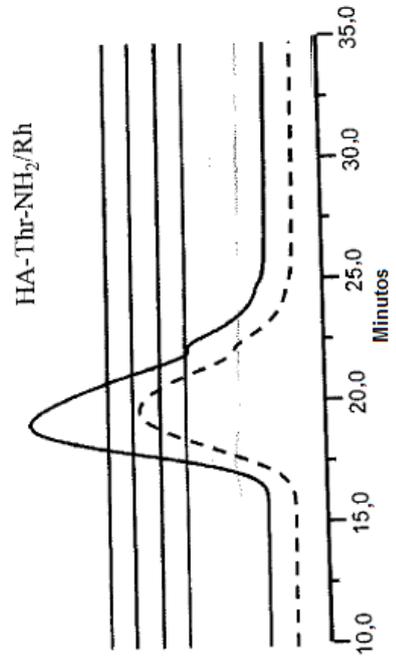
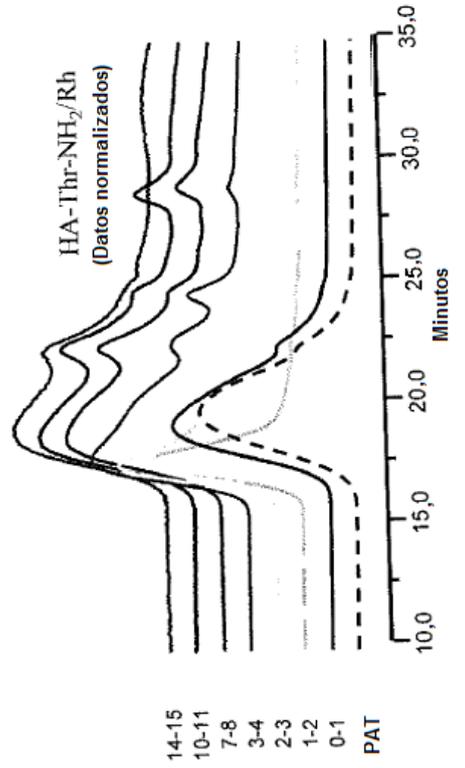


FIG. 10-31 Ejemplo 3-3-2

Cromatogramas SEC de orinas de rata

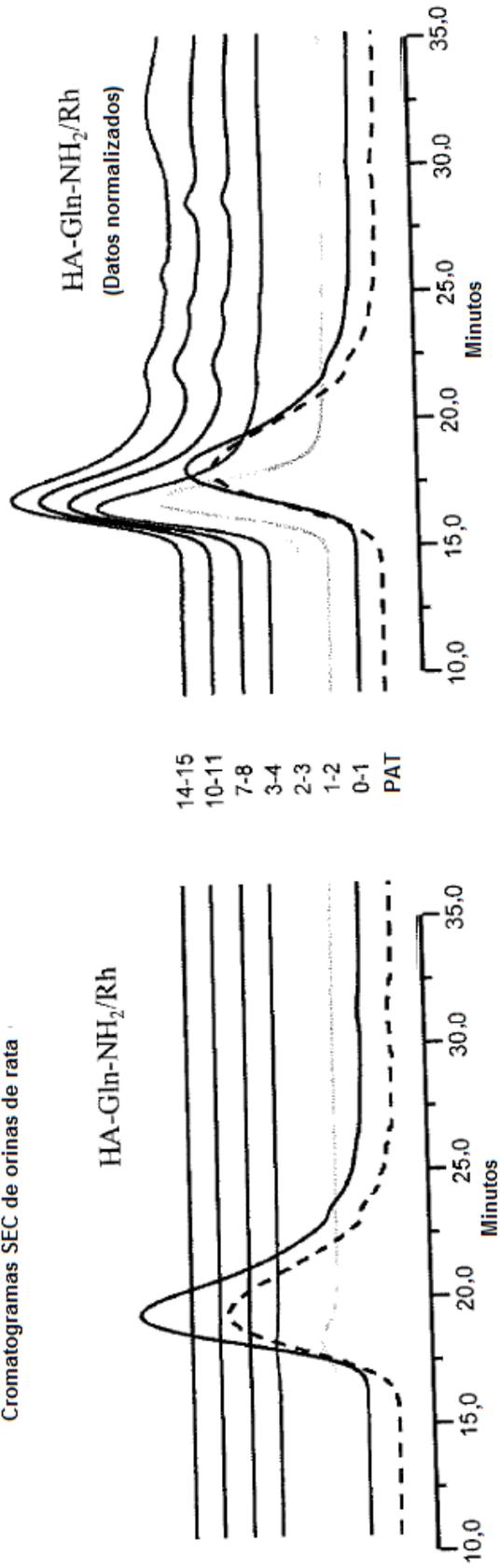


FIG. 11  
Ejemplo 4-2  
Grado de degradación del liposoma

pH	n.º ej. comp. n.º ej. comp.	Ejemplo 1-5-1		Ejemplo 1-5-2		Ejemplo 1-5-3		Ejemplo 1-5-4		Ejemplo 1-5-5		Ejemplo 1-5-6		Ejemplo 1-5-7		Ejemplo 1-5-8			
		99kDa	25kDa	99kDa	25kDa	Nil	25kDa	99kDa	25kDa	99kDa	25kDa	99kDa	25kDa	99kDa	25kDa	99kDa	25kDa		
6.0	1000	83.5%	27.1%	93.4%	30.9%	5.43	4.76	6.06	5.87	3.81	19.4%	108.2%	31.4%	15.9%	105.1%	35.7%	19.4%		
		6.52	29.91	7.63	5.09	0.90	6.27	5.69	n.d.	n.d.	5.81	1.15	6.48	n.d.	10.27	1.06	7.09		
		26.30	5.85	26.56	5.23	1.09	6.46	3.98	n.d.	n.d.	7.94	5.81	n.d.	4.96	n.d.	0.92	4.02	1.05	
		n.d.	n.d.	14.37	n.d.	1.83	n.d.	6.58	2.56	n.d.	n.d.	6.57	n.d.	6.70	n.d.	1.77	n.d.	n.d.	3.12
		11.27	n.d.	11.18	n.d.	5.38	2.55	n.d.	2.95	n.d.	n.d.	1.77	5.13	n.d.	5.74	n.d.	0.23	n.d.	n.d.
7.4	500	93.5%	27.1%	93.4%	30.9%	5.43	4.76	6.06	5.87	3.81	19.4%	108.2%	31.4%	15.9%	105.1%	35.7%	19.4%		
		6.52	29.91	7.63	5.09	0.90	6.27	5.69	n.d.	n.d.	5.81	1.15	6.48	n.d.	10.27	1.06	7.09		
		26.30	5.85	26.56	5.23	1.09	6.46	3.98	n.d.	n.d.	7.94	5.81	n.d.	4.96	n.d.	0.92	4.02	1.05	
		n.d.	n.d.	14.37	n.d.	1.83	n.d.	6.58	2.56	n.d.	n.d.	6.57	n.d.	6.70	n.d.	1.77	n.d.	n.d.	3.12
		11.27	n.d.	11.18	n.d.	5.38	2.55	n.d.	2.95	n.d.	n.d.	1.77	5.13	n.d.	5.74	n.d.	0.23	n.d.	n.d.
7.4	500	93.5%	27.1%	93.4%	30.9%	5.43	4.76	6.06	5.87	3.81	19.4%	108.2%	31.4%	15.9%	105.1%	35.7%	19.4%		
		6.52	29.91	7.63	5.09	0.90	6.27	5.69	n.d.	n.d.	5.81	1.15	6.48	n.d.	10.27	1.06	7.09		
		26.30	5.85	26.56	5.23	1.09	6.46	3.98	n.d.	n.d.	7.94	5.81	n.d.	4.96	n.d.	0.92	4.02	1.05	
		n.d.	n.d.	14.37	n.d.	1.83	n.d.	6.58	2.56	n.d.	n.d.	6.57	n.d.	6.70	n.d.	1.77	n.d.	n.d.	3.12
		11.27	n.d.	11.18	n.d.	5.38	2.55	n.d.	2.95	n.d.	n.d.	1.77	5.13	n.d.	5.74	n.d.	0.23	n.d.	n.d.

\*1) n.d. representa que no se pudo calcular el grado de degradación porque la concentración de piramina estaba por debajo del límite de cuantificación  
 \*2) El guion representa que no se realizó determinación

FIG. 12-2 Ejemplo 5-2  
HA-Ala-EDOBEA

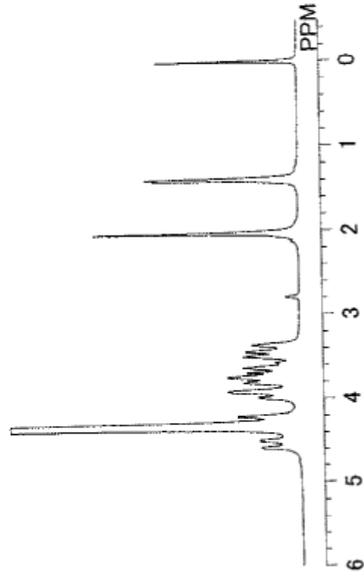


FIG. 12-1 Ejemplo 5-1  
Muestras para calcular el grado de modificación  
con alanina (arriba), HA-Ala-TBA (abajo)

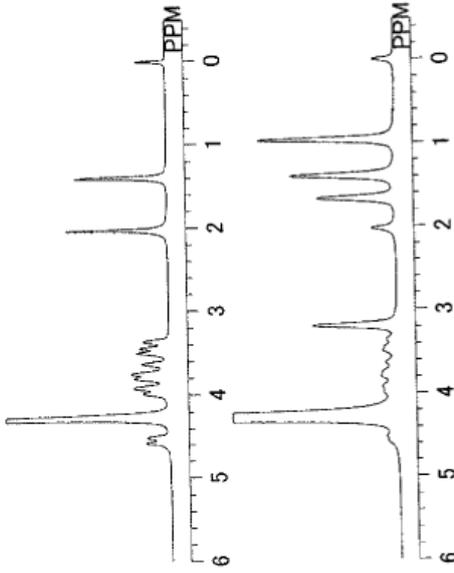


FIG. 12-3 Ejemplo 5-3  
HA-Ala-EDOBEA-Rh

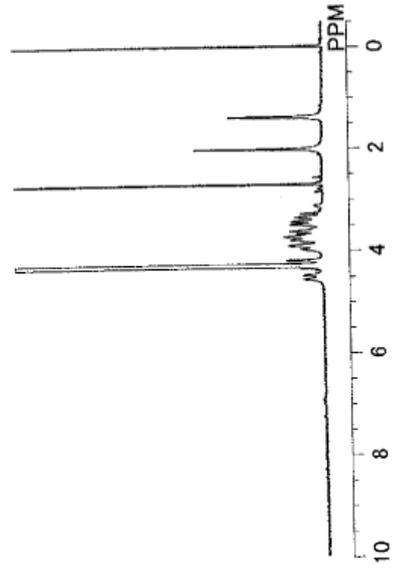


FIG. 13 Ejemplo 6-2-2  
Transición de las concentraciones de muestras en plasma de rata (promedio del grupo; ug/ml)

N.º de ejemplo	5-5
Tiempo tras la administración (h)	HA-Ata-PTH/Rh
0,08333	212,16
2	170,83
7	149,00
24	92,52
48	64,64
72	48,14
168	8,23
240	3,22
312	1,91

FIG. 14 Ejemplo 6-2-2  
Curso de tiempo de las concentraciones de la muestra en plasma de rata (gráfico)

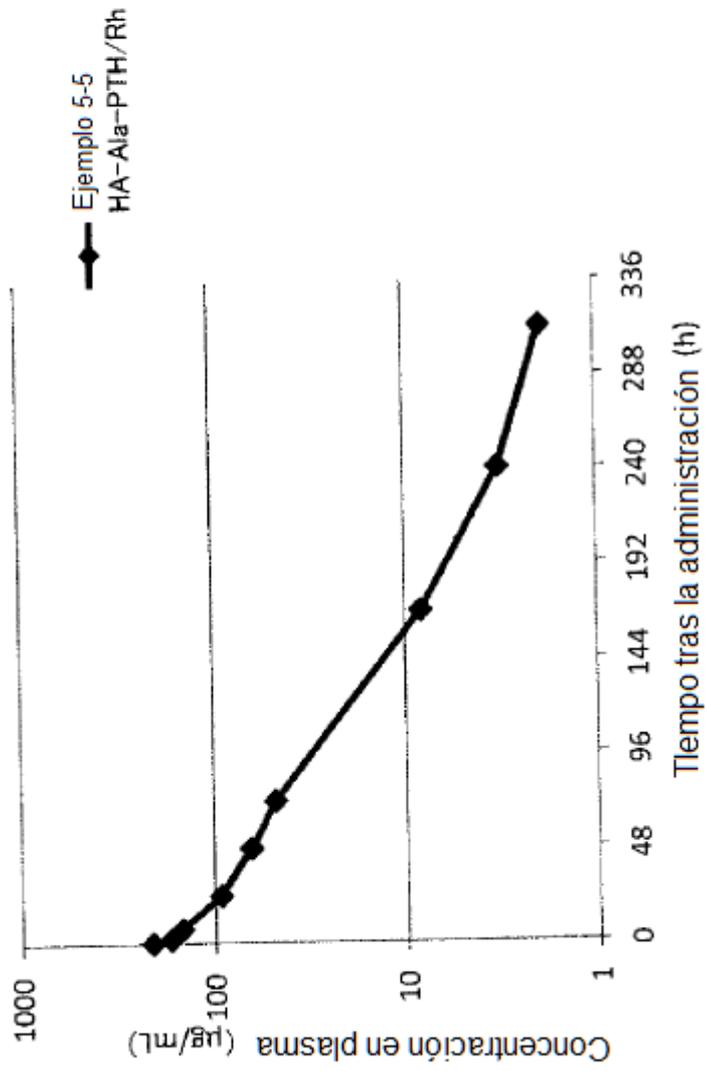


FIG. 15 Ejemplo 6-3-2  
Cromatogramas SEC de orinas de rata

