

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 683 993**

51 Int. Cl.:

**A61K 47/36** (2006.01)

**C08B 37/08** (2006.01)

**C08L 5/08** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.11.2013 PCT/CZ2013/000156**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.06.2014 WO14082609**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.11.2013 E 13829034 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.05.2018 EP 2934592**

54 Título: **Derivado acilado de C<sub>6</sub>-C<sub>18</sub> de ácido hialurónico, su método de preparación, composición nanomicelar basada en él, su método y preparación y método de preparación de la composición nanomicelar estabilizada, y su uso**

30 Prioridad:

**27.11.2012 CZ 20120842**

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

**01.10.2018**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**SMEJKALOVA, DANIELA;  
HUERTA-ANGELES, GLORIA;  
BOBEK, MARTIN;  
HERMANNOVA, MARTINA;  
VISTEJNOVA, LUCIE;  
NOVOTNY, JAROSLAV;  
PRIKOPOVA, EVA;  
NESPOROVA, KRISTINA;  
NEMCOVA, MIROSLAVA;  
SLEZINGEROVA, KLARA;  
KULHANEK, JAROMIR;  
COZIKOVA, DAGMAR;  
SOGORKOVA, JANA;  
KUCERA, JAN;  
KLEIN, PAVEL y  
VELEBNY, VLADIMIR**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 683 993 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 acilado de C<sub>6</sub>-C<sub>18</sub> de ácido hialurónico, su método de preparación, composición nanomicelar basada en él, su método y preparación y método de preparación de la composición nanomicelar estabilizada, y su uso

**Campo de la invención**

5 La invención se refiere a un método de preparación de ácido hialurónico hidrofobizado y su uso como sustancias vehiculares hidrófobas biológicamente activas, en el que una sustancia biológicamente activa se encapsula en las nanomicelas de hialuronano hidrofobizado. La hidrofobización de hialuronano se lleva a cabo por medio de una reacción de esterificación de hialuronano con ácidos carboxílicos de cadena larga, siendo activados estos últimos por un derivado halogenoide de ácido 2,4,6-triclorobenzoico o por otro cloruro orgánico de R<sub>3</sub>-CO-Cl. En un medio acuoso apropiado, los derivados hidrofobizados solubles en agua pueden formar nanomicelas en las que se pueden unir las sustancias no polares por medio de interacciones físicas no covalentes. El núcleo de una nanomicela está formado por grupos funcionales acilo hidrófobos mientras que la envoltura de una nanomicela está formada por ácido hialurónico. La encapsulación de las sustancias en nanomicelas se puede realizar por medio del método de intercambio de disolvente o por medio de sonicación. Las nanomicelas de hialurónico soportan la penetración de sustancias unidas en aplicaciones tópicas y permiten que las sustancias unidas se transfieran a las células individuales. La invención se refiere adicionalmente a un método para preparar composiciones nanomicelares estabilizadas. Las nanomicelas obtenidas de derivados de hialuronano hidrofobizado son utilizables en aplicaciones cosméticas y farmacéuticas.

**Antecedentes de la invención**

20 El ácido hialurónico es un polisacárido importante que consiste en dos unidades que se repiten de ácido β-(1,3)-D-glucurónico y β-(1,4)-N-acetil-D-glucosamina. Se caracteriza por un alto peso molecular que varía de 5 x 10<sup>4</sup> a 5 x 10<sup>6</sup> g/mol, que depende del método de aislamiento y del material inicial usado. El ácido hialurónico, y particularmente su sal de sodio conocida como hialuronano, es un constituyente esencial de los tejidos conjuntivos y del fluido articular sinovial. Además, desempeña un papel significativo en numerosos procesos biológicos, tales como hidratación, organización de proteoglicanos, diferenciación celular, proliferación y angiogénesis. Este polisacárido, que es fuertemente hidrófilo, es soluble en agua en la forma de sales dentro de toda la escala de pH.

**Sistemas vehiculares basados en ácido hialurónico**

Debido a la naturaleza hidrófila de su forma nativa, el ácido hialurónico no puede servir como un vehículo efectivo para sustancias hidrófobas. Por esta razón, se tienen que unir grupos funcionales hidrófobos a una cadena polimérica de ácido hialurónico. En el caso de que tales grupos funcionales hidrófobos tengan cantidades y longitudes suficientes, se puede iniciar un procedimiento de autoagregación que los implique, dando como resultado la formación de dominios hidrófobos dentro de la estructura del hialuronano. Después, pequeñas moléculas de sustancias insolubles en agua se pueden unir a tales dominios por medio de enlaces no covalentes. La estructura resultante a menudo se denomina nanomicela polimérica en la bibliografía, en la que el núcleo de la micela es hidrófobo, que permite de este modo la disolución de pequeñas moléculas no polares, mientras que la envoltura del mismo es hidrófila, permitiendo de este modo que la propia micela polimérica se disuelva en un entorno acuoso. Una micela polimérica, que no supera los 200 nm de tamaño (diámetro), se puede denominar nanomicela.

Los sistemas vehiculares formados por micelas poliméricas en base a ácido hialurónico modificado se conocen de conjugados de hialuronano con alquilaminas (Liu et al., 2011) y ácido fólico. Sin embargo, la presencia de formamida altamente tóxica y teratogénica se considera que es esencial para la preparación del derivado de hialuronano anterior. Se empleó un método similar de preparación de micelas poliméricas para obtener micelas sensibles a redox (Li et al., 2011). Es obvio que tales sistemas micelares no son utilizables en aplicaciones biológicas debido a la presencia de reactivos altamente tóxicos.

La conjugación de ácido hialurónico con otros polímeros (tales como los de ácidos láctico o glicólico) por medio del enlace mediado por el grupo carboxílico de ácido D-glucurónico y posiblemente mediante la incorporación de sustancias de bajo peso molecular se reivindica en la patente US 7.767.806 en la que los autores mencionan la biocompatibilidad del polímero que, sin embargo, no ha sido descrita ni probada mediante ensayos. En otro caso, el hialuronano de bajo peso molecular (9-45 kDa) se modificó covalentemente (en la posición del grupo carboxílico del ácido glucurónico) con aminas hidrófobas que tienen varias longitudes de cadena y con espermina cargada positivamente usada como segmento catiónico (Shen, Li, Tu & Zhu, 2009). El propósito de este último era preparar un vehículo para genes. Sin embargo, el uso de espermina para el propósito anterior está restringido debido a su toxicidad aguda y subaguda (Til, Falke, Prinsen & Willems, 1997). Se determinó que la concentración micelar crítica de las micelas poliméricas formadas que tienen 125-555 nm de diámetro era mayor de 0,04 mg/ml. Además del hecho de que el valor de la concentración micelar crítica es demasiado alto y por consiguiente no permite conseguir una dilución extrema del sistema micelar (por ejemplo, en el torrente sanguíneo), las micelas que tienen el tamaño mencionado anteriormente no se consideran candidatos apropiados para la distribución pasiva de medicinas dentro del cuerpo humano porque el tamaño de una micela polimérica es determinante de la capacidad de la misma para llegar a una localización de tumor o lesión de infarto a través de una pared venosa alterada. En tales casos, se

prefieren las micelas poliméricas que tienen 20-100 nm de diámetro (Wang, Mongayt & Torchilin, 2005)

La modificación del grupo carboxílico de ácido glucurónico se utilizó para la preparación de micelas de hialuronano poliméricas en base a la interacción electrostática entre el ácido hialurónico cargado negativamente y estirilpiridinio cargado positivamente (Tao, Xu, Chen, Bai & Liu, 2012). Sin embargo, el uso de tales micelas poliméricas in vivo está restringido debido al hecho de que las interacciones de estirilpiridinio con las terminaciones nerviosas y receptores de muscarina no se han aclarado suficientemente hasta el momento, aunque tales interacciones juegan un papel importante en relación con la regulación de neurotransmisores de liberación de neuronas (Mazzone, Mori, Burman, Palovich, Belmonte & Canning, 2006).

En los documentos de patente U.S. 7.993.678 y WO 2007/033677, se reivindica el método de preparación de derivados de alquil/aril-succínicos de hialuronano, siendo también utilizables dichos derivados para la encapsulación de sustancias no polares activas. En el último caso, la modificación implica los grupos hidroxilo primarios de hialuronano mientras que el grupo carboxílico permanece sin cambios. Una desventaja de la reacción de modificación anterior es el intervalo de pH alcalino (pH 8,5-9,0) en el que tiene lugar la reacción de anhídridos cíclicos con hialuronano. De hecho, tales valores de pH alcalino pueden iniciar la hidrólisis de anhídridos y, por consiguiente, provocar que disminuya la eficacia del procedimiento de modificación. Esto sería particularmente considerable a escala industrial. En los derivados de alquil/aril-succínicos de hialuronano, que se habían preparado de la manera anterior y tenían un grado de sustitución del 44%, la capacidad de formar micelas (para agregar) en un medio acuoso se demostró cuando la concentración respectiva era superior a 0,003-0,004 mg/ml<sup>-1</sup>. El tamaño observado de las micelas poliméricas variaba entre 50 y 200 nm. La desventaja de tales derivados, sin embargo, consiste en el aumento de la carga negativa total de hialuronano causado por la presencia de un grupo COO<sup>-</sup> adicional en el grupo funcional de alquil/aril-succínico de modificación. La carga negativa de la molécula puede tener una influencia desfavorable significativa en la interacción entre las células y el sistema vehicular respectivo (Wang, Mongayt & Torchilin, 2005). Uno de los factores limitantes para la aplicación de inyección de los derivados preparados de la manera anterior consiste en su baja solubilidad (Eenschooten, Guillaumie, Kontogeorgis, Stenby & Schwach-Abdellaoui, 2010). Otra desventaja de tales derivados consiste en la inestabilidad de los enlaces éster durante los procedimientos de esterilización térmica, tales como los de autoclave. En los documentos de patente U.S. 7.993.678 y WO 2007/033677, se describe simplemente el método de disolución directa de sustancias no polares en las disoluciones de derivados alquil/aril-succínicos de hialuronano, que incluye la formación de una emulsión estable. La principal desventaja del método directo de encapsulación de sustancias no polares consiste en la baja capacidad de unión resultante de las micelas poliméricas (Kedar, Phutane, Shidhaye & Kadam, 2010). Aunque las patentes anteriores reivindican la utilización de la estructura de hialuronano modificado para los sistemas vehiculares, no proporcionan ninguna otra manera posible de unir una sustancia hidrófoba a la estructura dada de hialuronano además del sistema de emulsión. Por esta razón, la provisión de un sistema vehicular polimérico que tiene una capacidad de unión suficiente está completamente ausente, lo que sería una de las características básicas requeridas para una evaluación realista de la aplicabilidad. Además, no se mencionan detalles relacionados con la citotoxicidad e interacciones celulares y, por consiguiente, no es posible llegar a una conclusión sobre si la estructura reivindicada es realmente aplicable para una transferencia activa de sustancias hidrófobas a células, conclusión que es esencial en aplicaciones farmacéuticas.

En una publicación adicional (Smejkalova, Hermannova, Sulakova, Prusova, Kucerik & Velebny, 2012) se describen dominios hidrófobos de hialuronano que se originan a partir de la agregación de cadenas de acilo de C<sub>6</sub> unidas a hialuronano por enlaces covalentes. Los derivados descritos en la última publicación, sin embargo, no están completamente libres de disolventes residuales. Además de eso, ni la formación ni la caracterización de micelas poliméricas se discuten en la publicación anterior. Además, los anhídridos simétricos mencionados en la publicación anterior no son utilizables para la formación de enlaces entre cadenas de alquilo largas. Los ácidos carboxílicos que tienen cadenas alifáticas largas son muy costosos y, además de eso, se pierde por lo menos un mol de ácido durante la preparación de un mol del reactivo final. La publicación tampoco discute la citotoxicidad de los derivados preparados.

La preparación de ésteres butíricos de polisacáridos que incluye una composición farmacéutica correspondiente se reivindica en la patente EP 0941253. La metodología de preparación reivindicada, sin embargo, permite conseguir solo grados muy bajos de sustitución (máx. 3%). La cantidad de la sustancia hidrófoba, que está unida a los derivados preparados por medio de un enlace no covalente, está influenciada desfavorablemente por tan bajo grado de sustitución. Los ésteres butíricos de hialuronano se prepararon adicionalmente según la patente WO 2005/092929 en la que, sin embargo, se requerían condiciones no acuosas. En consecuencia, la transformación de hialuronano en una sal de amonio cuaternario puede ir acompañada de la degradación del hialuronano. El grado de sustitución alcanzado es inferior al 0,1% y, por lo tanto, tales derivados de éster no son apropiados para la preparación de sistemas vehiculares. Se obtuvieron resultados similares cuando se llevó a cabo la esterificación simultánea de hialuronano con el anhídrido de ácido butírico y el cloruro de ácido retinoico (documento WO 2004/056877).

Una composición de micelas poliméricas en base a hialuronano modificado (HA)-[O(C=O)NH-M]<sub>p</sub>, en la que M representa una unidad modificadora que comprende el grupo funcional alquilo de C<sub>2-16</sub> y p representa un múltiplo de 3-4, y moléculas farmacéuticamente activas se reivindica por el patentes US 2010/0316682 y EP1538166A1. El principal inconveniente de tales derivados consiste en que el laurato de dibutilestaño, que se conoce como una

sustancia que tiene un potencial inmunotóxico y teratogénico, se usa para realizar la modificación de hialuronano. Esta última sustancia se usa principalmente en los procedimientos de modificación relacionados con la producción de adhesivos y está incluida en la lista de la Agencia Europea del Medio Ambiente debido a su toxicidad aguda (Boyer, 1989). Otro inconveniente de los derivados reivindicados consiste en su conjugación con polímeros, por ejemplo, con polietilenglicol, que son extraños en relación con el cuerpo humano y pueden causar reacciones inflamatorias o dar lugar a productos de degradación citotóxica cuando se usan para aplicaciones intravenosas o tópicas. Además, la aplicación repetida de micelas poliméricas, en las que el polietilenglicol formaba el segmento hidrófilo, condujo a la eliminación acelerada de esas micelas del torrente sanguíneo debido a la formación de anticuerpos IgM anti-PEG (Gong, Chen, Zheng, Wang & Wang, 2012).

El paclitaxel se incorporó con éxito en las micelas de hialuronano modificado por medio de ácido poli-láctico-co-glicólico (PLGA) (Kim, Lee, Jang & Park, 2009). La incorporación se llevó a cabo con el uso de un método de diálisis en el que tanto el polímero como la sustancia unida respectiva se disolvieron en DMSO y la disolución resultante se dializó frente a H<sub>2</sub>O. En el último caso, se obtuvo la capacidad de unión de micelas poliméricas preparadas de 4,5% en peso. La principal desventaja de tales sistemas vehiculares consiste en la presencia de polímeros de PLGA, que son extraños con respecto al cuerpo humano y pueden no representar un sistema completamente biodegradable. Otra desventaja consiste en la presencia de DMSO residual en los productos finales.

#### Modificación de hialuronano con ácidos carboxílicos de cadena larga

La modificación de polisacáridos con ácidos carboxílicos requiere principalmente un anhídrido comercialmente disponible del ácido dado (documentos WO 1996/035720, WO 2007/033677 (Smejkalova, Hermannova, Sulakova, Priisova, Kucerik & Velebny, 2012), EP 0893451). Las principales desventajas de tales anhídridos comercialmente disponibles consisten en su susceptibilidad a la hidrólisis y en la posible presencia de impurezas. Además, los anhídridos de algunos ácidos (por ejemplo, ácidos undecanocarboxílicos) no están disponibles comercialmente. Algunos de los anhídridos disponibles son muy caros (por ejemplo, los de los ácidos oleico, linoleico o linolénico). De este modo, la falta de disponibilidad, el alto precio y la inestabilidad de dichos anhídridos hacen difícil la preparación a gran escala de polisacáridos modificados.

Los anhídridos de ácido pueden ser sustituidos con otros derivados de ácido que son utilizables para la esterificación de hialuronano. La patente WO 2010/105582 reivindica el método de activación de ácidos carboxílicos por medio de cloroformiato de etilo en condiciones no acuosas, en el que se forman carbonatos de O-acil-O'-alquilo que subsecuentemente son utilizables para la esterificación de hialuronano. La desventaja de tal activación consiste en la formación de gases tóxicos y potencialmente explosivos. Un método similar de activación con cloroformiato de etilo se describe en las patentes U.S. 3.720.662 y CZ 20060605.

Otro método conocido se basa en la esterificación de polisacáridos con ácidos carboxílicos en presencia de imidazol (documento U.S. 2012/0172587). Sin embargo, el método de preparación reivindicado requiere altas temperaturas de reacción (90-200°C) que no son aplicables a hialuronano debido a su degradación a temperaturas elevadas.

La patente europea EP 0893451 reivindica la esterificación de polisacáridos con anhídridos de ácidos carboxílicos mediante el método de extracción supercrítica. Las desventajas del último procedimiento de esterificación consisten en la alta presión necesaria y en el alto coste del equipo.

Por las razones anteriores, es muy importante encontrar un método alternativo de activación de ácidos carboxílicos de cadena larga, método que sería uno aplicable in situ. Una de las posibles soluciones técnicas se basa en la activación de ácidos carboxílicos con un derivado del ácido 2,4,6-triclorobenzoico acompañada de la formación de un anhídrido. Por primera vez, se usó un anhídrido de ácido 2,4,6-triclorobenzoico en combinación con el catalizador de DMAP para una esterificación rápida de sustancias macrocíclicas en condiciones de reacción moderadas (Inanaga, Hirata, Saeki, Katsuki & Yamaguchi, 1979). Este método de esterificación, sin embargo, todavía no se ha aplicado a la modificación de polisacáridos, particularmente de ácido hialurónico, debido a la posible reacción exotérmica acompañada de degradación del polisacárido respectivo.

#### Sumario de la invención

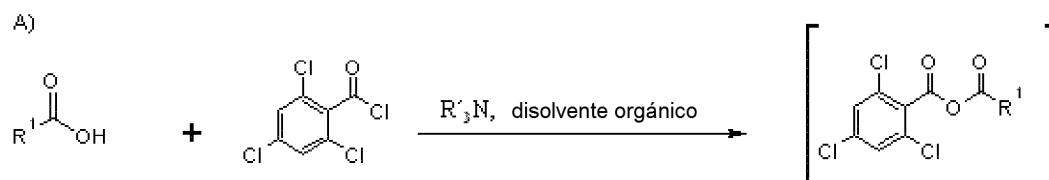
La materia de estudio de la presente invención es la síntesis de un derivado hidrofobizado de ácido hialurónico y la aplicación de dicho derivado en forma de un sistema vehicular polimérico para sustancias hidrófobas biológicamente activas en un medio acuoso, en el que el carácter nativo y la actividad biológica de las sustancias unidas deben permanecer sin cambios.

La hidrofobización de hialuronano con ésteres alifáticos de cadena larga (C<sub>6</sub>-C<sub>18</sub>) se basa en la activación directa de ácidos carboxílicos de cadena larga acompañada de la formación de un anhídrido de ácido 2,4,6-triclorobenzoico (Esquema 1). En la siguiente etapa, el anhídrido resultante reacciona con el ácido hialurónico para formar un derivado acilado de ácido hialurónico. La principal ventaja de dicha activación consiste en la posibilidad de la aplicación directa de ácidos carboxílicos alifáticos. A diferencia de las reacciones hidrofobizantes similares de hialuronano, que constituyen la técnica anterior, la modificación presentada no requiere que se use ningún anhídrido comercialmente disponible. Otra ventaja de la activación presentada consiste en el hecho de que la reacción respectiva puede tener lugar en condiciones moderadas (desde la temperatura ambiente hasta 50°C) y tiene una

duración corta. Además, la activación presentada no requiere, a diferencia del método descrito en la solicitud de patente WO 2010/105582, ni una cantidad excesiva de ácidos alifáticos ni condiciones anhidras especiales. El reactivo de activación es estable y, a diferencia del cloroformiato de etilo, no provoca la producción de gases tóxicos o explosivos cuando se usa en la reacción. Otra ventaja del reactivo de activación presentado consiste en que el reactivo no forma subproductos de reacción y no induce reacciones de reticulación.

5

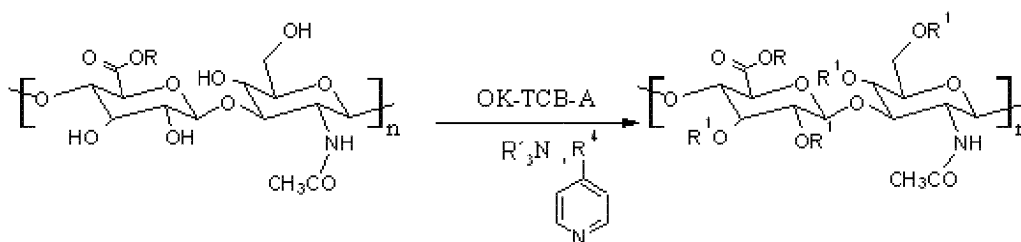
La activación de ácidos carboxílicos con un derivado de ácido 2,4,6-triclorobenzoico con la subsecuente aplicación del producto activado resultante para la esterificación del ácido hialurónico se representa en el esquema 1 a continuación:



OK-TCB-A

OK-TCB-A = anhídrido de ácido orgánico y ácido 2,4,6-triclorobenzoico

B)



$R = Na^+ \text{ o } H^+, R^1 = H \text{ o } -C(=O)C_xH_y \text{ o } -C(=O)CH=CH\text{-het,}$

$R^4 = -H, -N(CH_3)_2, R^3 = -CH_2CH_3$

Esquema 1

10 Además, la invención se refiere al uso de ácido hialurónico hidrofobizado para la preparación de sistemas nanomicelares y a la aplicación de las sustancias unidas en las nanomicelas del ácido hialurónico para el tratamiento de la piel, el pelo y las membranas mucosas, siendo también posibles otras aplicaciones tópicas. Las sustancias biológicamente activas encapsuladas se unen en las nanomicelas de hialuronano mediante interacciones físicas no covalentes con grupos funcionales hidrófobos del vehículo polimérico. Cuando se encapsulan de la manera anterior, tales sustancias penetran efectivamente en la capa superficial de la piel (epidermis), en toda la estructura de los pelos y en el epitelio de las membranas mucosas. Una de las ventajas consiste en que la profundidad de penetración de las sustancias activas unidas en las nanomicelas es mayor que la de las mismas sustancias cuando estas últimas se disuelven directamente en disolventes no polares.

20 En comparación con sistemas poliméricos similares (tales como los descritos en las patentes US 7.993.678 y WO 2007/033677), los conjugados nanomicelares de hialuronano han mostrado inesperadamente una concentración micelar crítica de 3 veces a 10 veces menor y, simultáneamente, una relativamente alta estabilidad en medios salados y acuosos. Tal valor muy bajo de la concentración micelar crítica es particularmente ventajoso en relación con posibles aplicaciones intravenosas de micelas de hialuronano. Contrariamente a los sistemas similares basados en la mayoría de otros polímeros conocidos, como se describe con referencia a la técnica anterior, la alta estabilidad de las micelas de hialuronano puede ser ventajosa en relación con la liofilización de diversos materiales porque la encapsulación deseada se puede conservar sin añadir ningún lioprotector a la disolución antes de la congelación.

30 Otra ventaja de los derivados de hialuronano hidrofobizados reivindicados se relaciona con la ausencia de polímeros sintéticos (PLGA, PEG, etc.) y copolímeros que si no son necesarios a menudo para la formación de nanomicelas y que pueden desencadenar la creación de anticuerpos cuando se administran repetidamente (Gong Chen, Wang & Wang).

Contrariamente a los sistemas micelares poliméricos similares, la formación de nanomicelas no se basa en un hialuronano modificado que tiene una carga negativa total aumentada, y de este modo la interacción entre el sistema vehicular con las células no está desfavorablemente influenciada por tal carga.

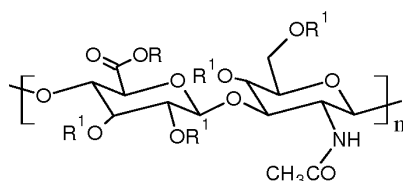
5 Algunas de las estructuras nanomicelares, particularmente aquellas que contienen cadenas de acilo más largas ligadas a hialuronano pueden formar una fase de gel en un medio acuoso. Tal fase de gel se puede usar ventajosamente en ciertas aplicaciones que requieren una viscosidad incrementada del sistema vehicular respectivo.

10 Las dimensiones de los sistemas nanomicelares preparados varían principalmente entre 20 y 100 nm, que es un tamaño óptimo para aplicaciones farmacéuticas en las que se saca provecho del efecto de permeabilidad y retención mejorado (efecto EPR). Tal tamaño puede no ser siempre alcanzable en micelas poliméricas descritas con referencia a la técnica anterior.

Otra ventaja de las micelas de hialuronano está relacionada con la transferencia de sustancias unidas desde los dominios hidrófobos de una nanomicela dentro de una célula.

15 El método de encapsulación innovado se basa en la preparación de una mezcla de hialuronano disuelto en agua y una sustancia biológicamente activa disuelta en un disolvente orgánico, seguido de la rotura energética de la envoltura de hidratación del hialuronano y la subsecuente retirada del disolvente de la disolución. A diferencia de los procedimientos de encapsulación comunes, el método anterior no se basa en la solubilidad de los polímeros en un disolvente orgánico y, por consiguiente, no requiere que se suprima el carácter nativo del ácido hialurónico y que se modifique en gran medida la cadena polimérica, particularmente en la localización de los grupos carboxílicos importantes que permiten que el hialuronano sea reconocido por los receptores celulares. Un disolvente orgánico preferido es aquel que tiene un punto de ebullición más bajo que el agua. La capacidad de unión de las nanomicelas de hialuronano aumenta notablemente mediante la evaporación completa de la fase acuosa residual con la subsecuente rehidratación de las nanomicelas. Una sustancia biológicamente activa no unida se puede eliminar en un procedimiento de filtración y las nanomicelas resultantes se pueden liofilizar directamente y almacenar en estado seco hasta el momento de la rehidratación subsecuente.

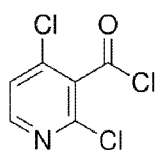
25 Específicamente, la invención se refiere a un derivado acilado de C<sub>6</sub>-C<sub>18</sub> de ácido hialurónico según la fórmula general (I):



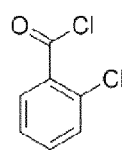
(I),

30 en la que R representa H<sup>+</sup> o Na<sup>+</sup> y R<sup>1</sup> representa H o -C(=O)C<sub>x</sub>H<sub>y</sub> o -C(=O)CH=CH-het, en la que x es un número entero que varía entre 5 y 17 e y es un número entero que varía entre 11 y 35 y C<sub>x</sub>H<sub>y</sub> es una cadena de C<sub>5</sub>-C<sub>17</sub> lineal o ramificada, saturada o insaturada y het es un grupo heterocíclico o heteroaromático que tiene un contenido seleccionable de átomos de N, S u O, siendo por lo menos una unidad que se repite uno o más grupos R<sup>1</sup>-C(=O)C<sub>x</sub>H<sub>y</sub> o -C(=O)CH=CH-het, y en la que n varía entre 12 y 4.000. En una realización preferida de la invención el derivado acilado de C<sub>6</sub>-C<sub>18</sub> es un derivado de oleilo lo que quiere decir que R representa H<sup>+</sup> o Na<sup>+</sup> y R<sup>1</sup> representa -C(=O)(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>-CH=CH-(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>-CH<sub>3</sub> en la fórmula (I).

35 Además, la invención se refiere al método de preparación del derivado anterior de ácido hialurónico, en el que el ácido hialurónico reacciona con ácido carboxílico de C<sub>6</sub>-C<sub>18</sub> activado con un cloruro de ácido 2,4,6-triclorobenzoico o activado con un cloruro orgánico de R<sub>3</sub>-CO-Cl en presencia de una base y un catalizador en una mezcla de agua y un disolvente aprótico miscible en agua, en la que R<sub>3</sub> es un alquilo de C<sub>1</sub>-C<sub>30</sub> alifático o ramificado que contiene ocasionalmente grupos funcionales heteroaromáticos o aromáticos. Un ejemplo de grupo funcional heteroaromático puede ser piridina junto con sus derivados (por ejemplo, según la fórmula (i)), un grupo funcional aromático ejemplar puede ser benceno junto con sus derivados halogenados (por ejemplo, según la fórmula (ii)).



(i)



(ii)

El ácido hialurónico puede asumir la forma ácida libre o la forma de una sal farmacéuticamente aceptable, tal como una sal de Na, K, Ca, Mg, Zn o Li, y tener un peso molecular que varía preferentemente entre  $5 \times 10^3$  g/mol y  $1,6 \times 10^6$  g/mol, más preferentemente entre  $15 \times 10^3$  g/mol y  $250 \times 10^3$  g/mol, y lo más preferentemente entre  $15 \times 10^3$  y  $50 \times 10^3$  g/mol. El método de preparación según la invención consiste en que el ácido hialurónico se disuelve en una mezcla de agua y un disolvente aprótico miscible en agua, siendo este último un disolvente orgánico polar, estando el contenido de agua en el intervalo entre 10 y 99% en volumen, preferentemente 50% en volumen. El disolvente aprótico miscible en agua puede ser, por ejemplo, dimetilsulfóxido (DMSO), tetrahidrofurano (THF), acetona, acetonitrilo o isopropanol (IPA). La mezcla de reacción contiene una base  $R'_3N$ , en la que  $R'$  es una cadena hidrocarbonada de  $C_nH_m$  lineal o ramificada, en la que  $n$  es un número entero que varía entre 1 y 4 y  $m$  es un número entero que varía entre 3 y 9, por ejemplo, trietilamina, en la cantidad de 0,01 a 20 equivalentes, preferentemente 6 equivalentes, respecto a un dímero de ácido hialurónico, y el catalizador se selecciona del grupo que comprende piridinas sustituidas, tales como dimetilaminopiridina, en la cantidad de 0,01 a 1 equivalente, preferentemente 0,05 equivalente, con relación a un dímero de ácido hialurónico. En el método de preparación según la invención, primero la activación del ácido carboxílico de  $C_6-C_{18}$  se realiza en un disolvente orgánico polar en presencia de una base y de ácido 2,4,6-triclorobenzoico o sus derivados o en presencia de una base y un cloruro orgánico y subsecuentemente la mezcla que contiene ácido carboxílico de  $C_6-C_{18}$  activado se añade al ácido hialurónico, que se disolvió en una mezcla de agua, un disolvente orgánico, una base y un catalizador, siendo el producto de la reacción resultante el derivado según la fórmula general (I). Dicho ácido carboxílico de  $C_6-C_{18}$  se selecciona del grupo que contiene ácidos caproico, enántico, caprílico, cáprico, palmítico, esteárico, oleico, linoleico y linolénico. La cantidad de ácido carboxílico de  $C_6-C_{18}$  activado varía entre 0,01 y 5 equivalentes, preferentemente entre 0,5 y 2 equivalentes, con respecto a un dímero de ácido hialurónico. La activación del ácido carboxílico de  $C_6-C_{18}$  tiene lugar durante 5 a 120 minutos, preferentemente durante 30 minutos, a una temperatura entre 20 y 60°C, preferentemente a una temperatura inferior a 25°C. La reacción del ácido hialurónico con el ácido carboxílico de  $C_6-C_{18}$  activado tiene lugar durante 1 a 24 horas, preferentemente durante 2 a 3 horas, a una temperatura entre 20 y 60°C, preferentemente a una temperatura inferior a 25°C. El derivado acilado de  $C_6-C_{18}$  del ácido hialurónico se puede separar subsecuentemente de la mezcla de reacción, lavar, secar y liofilizar. El derivado se puede separar de la mezcla de reacción mediante precipitación usando NaCl y alcohol. Subsecuentemente, el derivado se puede lavar con alcohol, particularmente con isopropanol o etanol.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a una composición nanomicelar basada en un derivado acilado de  $C_6-C_{18}$  de ácido hialurónico según la fórmula general (I), cuya composición contiene nanomicelas que comprenden un núcleo hidrófobo formado por grupos acilo de  $C_6-C_{18}$  unidos a ácido hialurónico y una envoltura hidrófila formada por grupos funcionales hidrófilos de ácido hialurónico, estando una o más sustancias biológicamente activas unidas físicamente en cada nanomicela. La composición además contiene agua y también puede contener sales (por ejemplo, NaCl al 0,9%). En una realización preferida, la composición nanomicelar contiene de 0,3 a 50% en peso de una sustancia biológicamente activa con relación al contenido en masa del derivado acilado de  $C_6-C_{18}$  de ácido hialurónico, seleccionándose la sustancia biológicamente activa de un grupo que comprende sustancias farmacéutica y cosméticamente activas, en particular vitaminas, medicinas, citostáticos, fitoextractos, fitocomplejos o sustancias fitoactivas, aceites minerales o vegetales, o una mezcla de los mismos. Los ejemplos de sustancias biológicamente activas aplicables incluyen, por ejemplo, tocoferol, paclitaxel, fosfatidilcolina o coenzima Q10. En una realización preferida, la composición contiene un derivado acilado de  $C_6-C_{18}$  de ácido hialurónico en una concentración que es mayor que su concentración de agregación crítica. La concentración del derivado acilado de  $C_6-C_{18}$  del ácido hialurónico oscila entre  $0,0001 \text{ mg/ml}^{-1}$  y  $30 \text{ mg/ml}^{-1}$ , preferentemente entre 1 y  $20 \text{ mg/ml}^{-1}$ , cuando la composición está en una disolución acuosa. En otra realización preferida, la sustancia biológicamente activa es un aceite mineral o vegetal contenido en la cantidad de 0,05 a 40% en peso, preferentemente de 1 a 20% en peso, con relación al contenido en masa del derivado acilado de  $C_6-C_{18}$  de ácido hialurónico. En otra realización preferida más, la composición contiene una sustancia biológicamente activa que es líquida e insoluble en agua, conteniendo dicha sustancia una sustancia biológicamente activa adicional disuelta en ella. Tal sustancia biológicamente activa, que es líquida e insoluble en agua, puede ser, por ejemplo, un aceite mineral o vegetal, y la sustancia biológicamente activa adicional puede pertenecer, por ejemplo, a sustancias farmacéutica o cosméticamente activas, particularmente vitaminas, medicinas, citostáticos, fitoextractos, fitocomplejos o sustancias fitoactivas, o mezclas de los mismos. La composición nanomicelar según la invención puede asumir la forma de una disolución, nanoemulsión, microemulsión, coacervado o gel.

La invención se refiere además al método de preparación de la composición nanomicelar como se define anteriormente, en el que el derivado acilado de  $C_6-C_{18}$  de ácido hialurónico según la fórmula general (I) se disuelve en agua, la sustancia biológicamente activa se disuelve en un disolvente, las disoluciones resultantes se mezclan juntas y después se retira el disolvente orgánico. El disolvente orgánico puede ser un disolvente clorado volátil, tal como triclorometano, o un alcohol, tal como etanol o isopropanol y su retirada puede tener lugar por evaporación al vacío. Subsecuentemente, la fase acuosa se seca y rehidrata y las estructuras nanomicelares resultantes se filtran y finalmente se liofilizan. Alternativamente, el disolvente orgánico se puede retirar por diálisis. De nuevo, las estructuras nanomicelares resultantes se filtran subsecuentemente y finalmente se liofilizan. En una realización preferida, el derivado acilado de  $C_6-C_{18}$  de ácido hialurónico según la fórmula general (I) se disuelve en agua y subsecuentemente se mezcla junto con una sustancia biológicamente activa, que es líquida e insoluble en agua, después de lo cual la mezcla resultante se homogeneiza por sonicación para formar una microemulsión o nanoemulsión. En otra realización preferida, el derivado acilado de  $C_6-C_{18}$  de ácido hialurónico según la fórmula





and structural characterization of novel and versatile amphiphilic octenyl succinic anhydride-modified hyaluronic acid derivatives. *Carbohydrate Polymers*, 79(3), 597-605.

Gong, J., Chen, M., Zheng, Y., Wang, S., & Wang, Y. (2012). Polymeric micelles drug delivery system in oncology. *Journal of Controlled Release*, 159(3), 312-323.

- 5 Inanaga, J., Hirata, K., Saeki, H., Katsuki, T., & Yamaguchi, M. (1979). A Rapid Esterification by Means of Mixed Anhydride and Its Application to Large-ring Lactonization. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 52(7), 1989-1993.

Kedar, U., Phutane, P., Shidhaye, S., & Kadam, V. (2010). Advances in polymeric micelles for drug delivery and tumor targeting. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 6(6), 714-729.

- 10 Kim, T. G., Lee, H., Jang, Y., & Park, T. G. (2009). Controlled Release of Paclitaxel from Heparinized Metal Stent Fabricated by Layer-by-Layer Assembly of Polylysine and Hyaluronic Acid-g-Poly(lactic-co-glycolic acid) Micelles Encapsulating Paclitaxel. *Biomacromolecules*, 10(6), 1532-1539.

- 15 Li, J., Huo, M., Wang, J., Zhou, J., Mohammad, J. M., Zhang, Y., Zhu, Q., Waddad, A. Y., & Zhang, Q. (2012). Redox-sensitive micelles self-assembled from amphiphilic hyaluronic acid-deoxycholic acid conjugates for targeted intracellular delivery of paclitaxel. *Biomaterials*, 33(7), 2310-2320.

Liu, Y., Sun, J., Cao, W., Yang, J., Lian, H., Li, X., Sun, Y., Wang, Y., Wang, S., & He, Z. (2011). Dual targeting folate-conjugated hyaluronic acid polymeric micelles for paclitaxel delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 421(1), 160-169.

- 20 Mazzone, S. B., Mori, N., Burman, M., Palovich, M., Belmonte, K. E., & Canning, B. J. (2006). Fluorescent styryl dyes FM1-43 and FM2-10 are muscarinic receptor antagonists: intravital visualization of receptor occupancy. *The Journal of Physiology*, 575(1), 23-35.

Shen, Y., Li, Q., Tu, J., & Zhu, J. (2009). Synthesis and characterization of low molecular weight hyaluronic acid-based cationic micelles for efficient siRNA delivery. *Carbohydrate Polymers*, 77(1), 95-104.

- 25 Smejkalova, D., Hermannova, M., Sulakova, R., Prusova, A., Kucerik, J., & Velebny, V. (2012). Structural and conformational differences of acylated hyaluronan modified in protic and aprotic solvent system. *Carbohydrate Polymers*, 87(2), 1460-1466.

Tao, Y., Xu, J., Chen, M., Bai, H., & Liu, X. Core cross-linked hyaluronan-styrylpyridinium micelles as a novel carrier for paclitaxel. (2012). *Carbohydrate Polymers*, 88(1), 118-124.

- 30 Til, H. P., Falke, H. E., Prinsen, M. K., & Willems, M. I. (1997). Acute and subacute toxicity of tyramine, spermidine, spermine, putrescine and cadaverine in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 35(3-4), 337-348.

Wang, J., Mongayt, D., & Torchilin, V. P. (2005). Polymeric micelles for delivery of poorly soluble drugs: Preparation and anticancer activity in vitro of paclitaxel incorporated into mixed micelles based on poly(ethylene glycol)-lipid conjugate and positively charged lipids. *Journal of Drug Targeting*, 13(1), 73-80.

### Breve descripción de los dibujos

- 35 Figura 1. Determinación de la concentración micelar crítica (agregación) (CMC) usando el método de fluorescencia en el derivado de hialuronano acilado (C6) y (C16) con rojo Nilo encapsulado en agua.

Figura 2. Determinación de la concentración micelar crítica (agregación) (CMC) usando el método de dispersión de luz estática en el derivado de hialuronano acilado (C6) y (C16) con rojo de aceite encapsulado en agua.

- 40 Figura 3. Imágenes de Cry-SEM de nanomicelas hialurónicas con vitamina E encapsulada (imagen superior) y con paclitaxel encapsulado (imagen inferior).

Figura 4. Citotoxicidad de paclitaxel y de paclitaxel encapsulado en HAC6 y HAC16 en dependencia de la concentración y del tiempo de interacción celular.

Figura 5. Transporte de doxorubicina en células HCT 116 y MCF-7 después de 1 hora de exposición.

Figura 6. Internalización celular con 7AAD en células vivas usando vehículos HA(C6) con 7AAD encapsulado.

- 45 Figura 7. Perfil de la liberación de rojo de aceite encapsulado del vehículo HAC6 en PBS y en PBS que contiene 1% de TWEEN 80 añadido. Concentración de HAC6 + rojo de aceite: 1 o 10 mg/ml<sup>-1</sup>.

Figura 8. Perfil de la liberación de paclitaxel encapsulado de los vehículos HAC6 y HAC16 (c = 10 mg/ml<sup>-1</sup>) en PBS.

Figura 9. Penetración de rojo Nilo (NR) encapsulado a partir de nanomicelas de hialuronano HA(C6) y AH(C10)

frente a la penetración del rojo Nilo disuelto en aceite y dispersado en agua dentro de la piel, teniendo cada muestra la misma concentración de rojo Nilo.

5 Figura 10. Penetración de rojo Nilo (NR) encapsulado de nanomicelas de hialuronano HA(C6) y AH(C10) frente a la penetración de rojo Nilo disuelto en aceite y dispersado en agua dentro del pelo, teniendo cada muestra la misma concentración de rojo Nilo (la imagen microscópica muestra una sección transversal de una hebra de pelo).

Figura 11. Penetración de rojo Nilo (NR) encapsulado de nanomicelas de hialuronano poliméricas HA(C6) y HA(C10) frente a la penetración de rojo Nilo disuelto en aceite y dispersado en agua dentro de la membrana mucosa bucal, teniendo cada muestra misma concentración de rojo Nilo.

10 Figura 12. Penetración de rojo Nilo (NR) encapsulado de nanomicelas de hialuronano poliméricas HA(C6) y HA(C10) frente a penetración de rojo Nilo disuelto en aceite y dispersado en agua en una membrana mucosa vaginal, teniendo cada muestra la misma concentración de rojo Nilo.

### Ejemplos de realizaciones preferidas de la invención

DS = grado de sustitución = 100% \* cantidad en moles del sustituyente / cantidad en moles de todos los polisacáridos dímeros

15 A menos que se especifique lo contrario, la expresión "equivalente" (eq) tal como se usa aquí se refiere a un dímero de ácido hialurónico. A menos que se especifique lo contrario, los porcentajes se calculan en base a peso/peso.

El peso molecular del ácido hialurónico primario (fuente: Contipro Biotech spol. s r.o., Dolni Dobrouc, República Checa) se determinó mediante el método SEC-MALLS.

20 Ejemplo 1. Preparación de derivado de caproilo (C6) de ácido hialurónico por medio del anhídrido mixto de ácido 2,4,6-triclorobenzoico y ácido caproico

Se disolvió 1 g de hialuronato de sodio (2,5 mmol, 15 kDa) en 10 ml de agua desmineralizada. Después, se añadieron gradualmente 5 ml de DMSO. A continuación, se añadieron TEA (1,05 ml, 3 eq.) y DMAP (8,0 mg, 0,05 eq.) a la disolución. Simultáneamente, se disolvió ácido hexanoico (0,63 ml, 2 eq.) en 5 ml de DMSO y TEA (1,05 ml, 3 eq.) y a continuación se añadió cloruro de 2,4,6-triclorobenzoilo (1,6 ml, 4 eq.) a la disolución. Después de la activación del ácido, el precipitado se filtró en la disolución preparada de HA. La reacción tuvo lugar a temperatura ambiente durante 3 horas. Después, la mezcla de reacción se diluyó con 5 ml de agua desmineralizada que contenía la adición de 0,25 g de NaCl. El derivado acilado se aisló de la mezcla de reacción en el procedimiento de precipitación subsecuente usando 4 veces de isopropanol absoluto. Después de haber sido sometido a decantación, el precipitado se lavó repetidamente inicialmente con la disolución acuosa de isopropanol (85% en vol.) para retirar DMSO y DMAP del derivado y subsecuentemente con isopropanol absoluto para retirar el agua del derivado. Después, el precipitado se secó a la temperatura de 40°C durante 48 horas y subsecuentemente se liofilizó con el fin de retirar los disolventes residuales.

DS 60% (determinado por RMN)

35 Señales de acilo <sup>1</sup>H RMN (D<sub>2</sub>O): δ 2,4 ppm (m, 2H, α CH<sub>2</sub>), δ 1,6 ppm (m, 2H, β CH<sub>2</sub>), δ 1,3 ppm (m, 4H, γ, δ CH<sub>2</sub>), δ 0,8 (m, 3H, CH<sub>3</sub>).

Ejemplo 2. Preparación de derivado de caproilo (C6) de ácido hialurónico por medio del anhídrido mixto de ácido 2,4,6-triclorobenzoico y ácido caproico

Se disolvió 1 g de hialuronato de sodio (2,5 mmol, 38 kDa) en 10 ml de agua desmineralizada. Después, se añadieron gradualmente 5 ml de isopropanol. A continuación, se añadieron TEA (1,05 ml, 3 eq.) y piridina (0,4 ml, 2,0 eq.) a la disolución. Simultáneamente, se disolvió ácido hexanoico (0,32 ml, 1 eq.) en 5 ml de isopropanol y a continuación se añadieron TEA (1,05 ml, 3 eq.) y cloruro de 2,4,6-triclorobenzoilo (0,391 ml, 1 eq.) a la disolución. Después de la activación del ácido, el precipitado se filtró en la disolución preparada de HA. La reacción tuvo lugar a temperatura ambiente durante 3 horas. Después, la mezcla de reacción se diluyó con 5 ml de agua desmineralizada que contenía la adición de 0,50 g de NaCl. El derivado acilado se aisló de la mezcla de reacción en el procedimiento de precipitación subsecuente usando 4 veces de isopropanol absoluto. Después de haber sido sometido a decantación, el precipitado se lavó repetidamente inicialmente con la disolución acuosa de isopropanol (85% en vol.) Para retirar la piridina del derivado y subsecuentemente con isopropanol absoluto para retirar el agua del derivado. Subsecuentemente, el precipitado se secó a la temperatura de 40°C durante 48 horas y subsecuentemente se liofilizó con el fin de retirar los disolventes residuales.

50 DS 15% (determinado por RMN)

Señales de acilo <sup>1</sup>H RMN (D<sub>2</sub>O): δ 2,4 ppm (m, 2H, α CH<sub>2</sub>), δ 1,6 ppm (m, 2H, β CH<sub>2</sub>), δ 1,3 ppm (m, 4H, γ, δ CH<sub>2</sub>), δ 0,8 (m, 3H, CH<sub>3</sub>).

Ejemplo 3. Preparación de derivado de enantilo (C7) de ácido hialurónico por medio del anhídrido mixto de ácido

## 2,4,6-triclorobenzoico y ácido enántico

Se disolvió 1 g de hialuronato de sodio (2,5 mmol, 15 kDa) en 10 ml de agua desmineralizada. Después, se añadieron gradualmente 5 ml de acetonitrilo. A continuación, se añadieron TEA (0,70 ml, 2 eq.) y DMAP (15,0 mg, 0,05 eq.) a la disolución. Simultáneamente, se disolvió ácido enántico (0,35 ml, 1 eq.) en 5 ml de acetonitrilo y a continuación se añadieron TEA (0,70 ml, 2 eq.) y cloruro de 2,4,6-triclorobenzoilo (0,39 ml, 1 eq.) a la disolución. Después de la activación del ácido, el precipitado se filtró en la disolución preparada de HA. La reacción tuvo lugar a temperatura ambiente durante 3 horas. Después, la mezcla de reacción se diluyó con 5 ml de agua desmineralizada que contenía la adición de 0,75 g de NaCl. El derivado acilado se aisló de la mezcla de reacción en el procedimiento de precipitación subsecuente usando 4 veces de isopropanol absoluto. Después de haber sido sometido a decantación, el precipitado se lavó repetidamente inicialmente con la disolución acuosa de isopropanol (85% en vol.) para retirar el acetonitrilo y DMAP del derivado y subsecuentemente con isopropanol absoluto para retirar el agua del derivado. Subsecuentemente, el precipitado se secó a la temperatura de 40°C durante 48 horas y subsecuentemente se liofilizó con el fin de retirar los disolventes residuales.

DS 12% (determinado por RMN)

Señales de  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{D}_2\text{O}$ ) de acilo:  $\delta$  2,4 ppm (m, 2H,  $\alpha$   $\text{CH}_2$ ),  $\delta$  1,6 ppm (m, 2H,  $\beta$   $\text{CH}_2$ ),  $\delta$  1,3 ppm (m, 4H,  $\gamma$ ,  $\delta$   $\text{CH}_2$ ),  $\delta$  0,8 (m, 3H,  $\text{CH}_3$ ).

Ejemplo 4. Preparación de derivado de caprilo (C8) de ácido hialurónico por medio del anhídrido mixto de ácido 2,4,6-triclorobenzoico y ácido caprílico

Se disolvió 1 g de hialuronato de sodio (2,5 mmol, 15 kDa) en 10 ml de agua desmineralizada. Después, se añadieron gradualmente 5 ml de acetonitrilo. A continuación, se añadieron TEA (1,05 ml, 3 eq.) y DMAP (8,0 mg, 0,05 eq.) a la disolución. Simultáneamente, se disolvió ácido octanoico (0,63 g, 4 eq.) en 5 ml de acetonitrilo y a continuación TEA (1,05 ml, 3 eq.) y cloruro de 2,4,6-triclorobenzoilo (0,8 ml, 4 eq.) se añadieron a la disolución. Después de la activación del ácido, el precipitado se filtró en la disolución preparada de HA. La reacción tuvo lugar a temperatura ambiente durante 3 horas. Después, la mezcla de reacción se diluyó con 5 ml de agua desmineralizada que contenía la adición de 0,50 g de NaCl. El derivado acilado se aisló de la mezcla de reacción en el procedimiento de precipitación subsecuente usando 4 veces de isopropanol absoluto. Después de haber sido sometido a decantación, el precipitado se lavó repetidamente inicialmente con la disolución acuosa de isopropanol (85% en vol.) para retirar acetonitrilo y DMAP del derivado y subsecuentemente con isopropanol absoluto para retirar el agua del derivado. Después, el precipitado se secó a la temperatura de 40°C durante 48 horas y subsecuentemente se liofilizó con el fin de retirar los disolventes residuales.

DS 40% (determinado por RMN)

Señales de  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{D}_2\text{O}$ ) de acilo:  $\delta$  2,4 ppm (m, 2H,  $\alpha$   $\text{CH}_2$ ),  $\delta$  1,6 ppm (m, 2H,  $\beta$   $\text{CH}_2$ ),  $\delta$  1,3 ppm (m, 12H,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$ ,  $\eta$ ,  $\theta$   $\text{CH}_2$ ),  $\delta$  0,8 (m, 3H,  $\text{CH}_3$ ).

Ejemplo 5. Preparación de derivado de caprilo (C10) de ácido hialurónico por medio del anhídrido mixto de ácido 2,4,6-triclorobenzoico y ácido cáprico

Se disolvió 1 g de hialuronato de sodio (2,5 mmol, 15 kDa) en 10 ml de agua desmineralizada. Después, se añadieron gradualmente 5 ml de THF. A continuación se añadieron TEA (1,05 ml, 3 eq.) y DMAP (8,0 mg, 0,025 eq.) a la disolución. Simultáneamente, se disolvió ácido decanoico (0,8 g, 2 eq.) en 5 ml de THF y a continuación se añadieron TEA (1,05 ml, 3 eq.) y cloruro de 2,4,6-triclorobenzoilo (0,8 ml, 2 eq.) a la disolución. Después de la activación del ácido, el precipitado se filtró en la disolución preparada de HA. La reacción tuvo lugar a temperatura ambiente durante 3 horas. Después, la mezcla de reacción se diluyó con 5 ml de agua desmineralizada que contenía la adición de 0,25 g de NaCl. El derivado acilado se aisló de la mezcla de reacción en el procedimiento de precipitación subsecuente usando 4 veces de isopropanol absoluto. Después de haber sido sometido a decantación, el precipitado se lavó repetidamente inicialmente con la disolución acuosa de isopropanol (85% en vol.) para retirar DMAP del derivado y subsecuentemente con isopropanol absoluto con el fin de retirar el agua del derivado. Después, el precipitado se secó a la temperatura de 40°C durante 48 horas y subsecuentemente se liofilizó con el fin de retirar los disolventes residuales.

DS 15% (determinado por RMN)

Señales de  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{D}_2\text{O}$ ) de acilo:  $\delta$  2,4 ppm (m, 2H,  $\alpha$   $\text{CH}_2$ ),  $\delta$  1,6 ppm (m, 2H,  $\beta$   $\text{CH}_2$ ),  $\delta$  1,3 ppm (m, 12H,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$ ,  $\eta$ ,  $\theta$   $\text{CH}_2$ ),  $\delta$  0,8 (m, 3H,  $\text{CH}_3$ ).

Ejemplo 6. Preparación de derivado de caprilo (C10) de ácido hialurónico por medio del anhídrido mixto de ácido 2,4,6-triclorobenzoico y ácido cáprico

Se disolvió 1 g de hialuronato de sodio (2,5 mmol, 15 kDa) en 10 ml de agua desmineralizada. Después, se añadieron gradualmente 5 ml de THF. A continuación se añadieron TEA (1,05 ml, 3 eq.) y DMAP (8,0 mg, 0,025 eq.) a la disolución. Simultáneamente, se disolvió ácido decanoico (0,8 g, 4 eq.) en 5 ml de THF y a continuación se

- añadieron TEA (1,05 ml, 3 eq.) y cloruro de 2,4,6-triclorobenzoilo (0,8 ml, 4 eq.) a la disolución. Después de la activación del ácido, el precipitado se filtró en la disolución preparada de HA. La reacción tuvo lugar a temperatura ambiente durante 3 horas. Después, la mezcla de reacción se diluyó con 5 ml de agua desmineralizada que contenía la adición de 0,25 g de NaCl. El derivado acilado se aisló de la mezcla de reacción en el procedimiento de precipitación subsecuente usando 4 veces de isopropanol absoluto. Después de haber sido sometido a decantación, el precipitado se lavó repetidamente inicialmente con la disolución acuosa de isopropanol (85% en vol.) para retirar THF y DMAP del derivado y subsecuentemente con isopropanol absoluto para retirar el agua del derivado. Después, el precipitado se secó a la temperatura de 40°C durante 48 horas y subsecuentemente se liofilizó con el fin de retirar los disolventes residuales.
- 5
- 10 DS 40% (determinado por RMN)
- Señales de  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{D}_2\text{O}$ ) de acilo:  $\delta$  2,4 ppm (m, 2H,  $\alpha$   $\text{CH}_2$ ),  $\delta$  1,6 ppm (m, 2H,  $\beta$   $\text{CH}_2$ ),  $\delta$  1,3 ppm (m, 12H,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$ ,  $\eta$ ,  $\theta$   $\text{CH}_2$ ),  $\delta$  0,8 (m, 3H,  $\text{CH}_3$ ).
- Ejemplo 7. Preparación de derivado de palmitoilo (C16) de ácido hialurónico por medio del anhídrido mixto de ácido 2,4,6-triclorobenzoico y ácido palmítico
- 15 Se disolvieron 0,5 g de hialuronato de sodio (1,25 mmol, 38 kDa) en 20 ml de agua desmineralizada. Después, se añadieron gradualmente 10 ml de THF. Después, se añadieron TEA (0,52 ml, 3 eq.) y DMAP (8,0 mg, 0,05 eq.) a la disolución. Simultáneamente, se disolvió ácido palmítico (0,16 g, 0,5 eq.) en 10 ml de THF y a continuación se añadieron TEA (0,52 ml, 3 eq.) y cloruro de 2,4,6-triclorobenzoilo (0,098 ml, 0,5 eq.) a la disolución. Después de la activación del ácido, el precipitado se filtró en la disolución preparada de HA. La reacción tuvo lugar a temperatura ambiente durante 3 horas. Después, la mezcla de reacción se diluyó con 5 ml de agua desmineralizada que contenía la adición de 0,25 g de NaCl. El derivado acilado se aisló de la mezcla de reacción en el procedimiento subsecuente de precipitación usando 4 veces de isopropanol absoluto. Después de haber sido sometido a decantación, el precipitado se lavó repetidamente inicialmente con la disolución acuosa de isopropanol (85% en vol.) para retirar DMAP del derivado y subsecuentemente con isopropanol absoluto para retirar el agua del derivado. Después, el precipitado se secó a la temperatura de 40°C durante 48 horas y subsecuentemente se liofilizó con el fin de retirar los disolventes residuales.
- 20
- 25
- Señales de  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{D}_2\text{O}$ ) de acilo:  $\delta$  2,4 ppm (m, 2H,  $\alpha$   $\text{CH}_2$ ),  $\delta$  1,6 ppm (m, 2H,  $\beta$   $\text{CH}_2$ ),  $\delta$  1,3 ppm (m, 24H,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$ ,  $\eta$ ,  $\theta$   $\text{CH}_2$ ),  $\delta$  0,8 (m, 3H,  $\text{CH}_3$ ).
- DS 14% (determinado por RMN)
- 30 Ejemplo 8. Preparación de derivado de estearilo (C18) de ácido hialurónico por medio del anhídrido mixto de ácido 2,4,6-triclorobenzoico y ácido esteárico
- Se disolvieron 0,5 g de hialuronato de sodio (1,25 mmol, 15 kDa) en 10 ml de agua desmineralizada. Después, se añadieron 5 ml de THF gradualmente. A continuación, se añadieron TEA (0,52 ml, 3 eq.) y DMAP (8,0 mg, 0,05 eq.) a la disolución. Simultáneamente se disolvió ácido esteárico (0,711 g, 2 eq.) en 5 ml de THF y a continuación se añadieron TEA (0,52 ml, 3 eq.) y cloruro de 2,4,6-triclorobenzoilo (0,391 ml, 2 eq.) a la disolución. Después de la activación del ácido, el precipitado se filtró en la disolución preparada de HA. La reacción tuvo lugar a temperatura ambiente durante 3 horas y a continuación la mezcla de reacción se agitó a 50°C durante 1 hora. Después, la mezcla de reacción se diluyó con 5 ml de agua desmineralizada que contenía la adición de 0,25 g de NaCl. El derivado acilado se aisló de la mezcla de reacción en el procedimiento de precipitación subsecuente usando 4 veces de isopropanol absoluto. Después de haber sido sometido a decantación, el precipitado se lavó repetidamente inicialmente con la disolución acuosa de isopropanol (85% en vol.) para retirar DMAP del derivado y subsecuentemente con isopropanol absoluto para retirar el agua del derivado. Después, el precipitado se secó a la temperatura de 40°C durante 48 horas y subsecuentemente se liofilizó con el fin de retirar los disolventes residuales.
- 35
- 40
- DS 7% (determinado por RMN)
- 45 Señales de  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{D}_2\text{O}$ ) de acilo:  $\delta$  2,4 ppm (m, 2H,  $\alpha$   $\text{CH}_2$ ),  $\delta$  1,6 ppm (m, 2H,  $\beta$   $\text{CH}_2$ ),  $\delta$  1,3 ppm (m, 28H,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$ ,  $\eta$ ,  $\theta$   $\text{CH}_2$ ),  $\delta$  0,8 (m, 3H,  $\text{CH}_3$ ).
- Ejemplo 9. Preparación de derivado de oleilo (C18:1) de ácido hialurónico por medio del anhídrido mixto de ácido 2,4,6-triclorobenzoico y ácido oleico
- 50 Se disolvieron 0,5 g de hialuronato de sodio (1,25 mmol, 15 kDa) en 10 ml de agua desmineralizada. Después, se añadieron 5 ml de THF gradualmente. A continuación, se añadieron TEA (0,52 ml, 3 eq.) y DMAP (15,0 mg, 0,1 eq.) a la disolución. Simultáneamente, se disolvió ácido oleico (0,18 g, 0,5 eq.) en 5 ml de THF y a continuación se añadieron TEA (0,52 ml, 3 eq.) y cloruro de 2,4,6-triclorobenzoilo (0,098 ml, 0,5 eq.) a la disolución. Después de la activación del ácido, el precipitado se filtró en la disolución preparada de HA. La reacción tuvo lugar a temperatura ambiente durante 3 horas. Después, la mezcla de reacción se diluyó con 5 ml de agua desmineralizada que contenía la adición de 0,25 g de NaCl. El derivado acilado se aisló de la mezcla de reacción en el procedimiento de precipitación subsecuente usando 4 veces de isopropanol absoluto. Después de haber sido sometido a decantación,
- 55

el precipitado se lavó repetidamente inicialmente con la disolución acuosa de isopropanol (85% en vol.) para retirar DMAP del derivado y subsecuentemente con isopropanol absoluto con el fin de retirar el agua del derivado. Posteriormente, el precipitado se secó a la temperatura de 40°C durante 48 horas y subsecuentemente se liofilizó con el fin de retirar los disolventes residuales.

5 DS 10% (determinado por RMN)

$^1\text{H}$  RMN ( $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  0,88 (t, 3H,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ ),  $\delta$  1,22-1,35 (m, 26H,  $(-\text{CH}_2-)_{14}$ ),  $\delta$  1,60 (m, 2H,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}-$ ),  $\delta$  2,41 (t, 2H,  $-\text{CH}_2-\text{CO}-$ ),  $\delta$  5,41 (d, 2H,  $\text{CH}=\text{CH}$ )

Ejemplo 10. Preparación de derivado de oleilo (C18:1) de ácido hialurónico por medio del anhídrido mixto de ácido 2,4,6-triclorobenzoico y ácido oleico

10 Se disolvieron 0,5 g de hialuronato de sodio (1,25 mmol, 130 kDa) en 5 ml de agua desmineralizada. Después, se añadieron gradualmente 3 ml de isopropanol. A continuación se añadieron TEA (0,52 ml, 3 eq.) y DMAP (15,0 mg, 0,1 eq.) a la disolución. Simultáneamente, se disolvió ácido oleico (0,4 ml, 1 eq.) en 5 ml de isopropanol y a continuación se añadieron TEA (0,52 ml, 3 eq) y cloruro de 2,4,6-triclorobenzoilo (0,195 ml, 1 eq) a la disolución. Después de la activación del ácido, el precipitado se filtró en la disolución preparada de HA. La reacción tuvo lugar a temperatura ambiente durante 3 horas. Después, la mezcla de reacción se diluyó con 5 ml de agua desmineralizada que contenía la adición de 0,25 g de NaCl. El derivado acilado se aisló de la mezcla de reacción en el un procedimiento de precipitación subsecuente usando 4 veces de isopropanol absoluto. Después de haber sido sometido a decantación, el precipitado se lavó repetidamente inicialmente con la disolución acuosa de isopropanol (85% en vol.) para retirar DMAP del derivado y posteriormente con isopropanol absoluto para retirar el agua del derivado. Después, el precipitado se secó a la temperatura de 40°C durante 48 horas y subsecuentemente se liofilizó con el fin de retirar los disolventes residuales.

DS 12% (determinado por RMN)

$^1\text{H}$  RMN ( $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  0,88 (t, 3H,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ ).  $\delta$  1,22-1,35 (m, 26H,  $(-\text{CH}_2-)_{14}$ ),  $\delta$  1,60 (m, 2H,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}-$ ),  $\delta$  2,41 (t, 2H,  $-\text{CH}_2-\text{CO}-$ ),  $\delta$  5,41 (d, 2H,  $\text{CH}=\text{CH}$ )

25 Ejemplo 11. Preparación de derivado de oleilo (C18:1) de ácido hialurónico por medio del anhídrido mixto de cloruro de isobutililo y ácido oleico

Se disolvieron 1,0 g de hialuronato de sodio (2,5 mmol, 15 kDa) en 10 ml de agua desmineralizada. Después, se añadieron gradualmente 5 ml de THF. A continuación, se añadieron TEA (1,05 ml, 3 eq.) y DMAP (15,0 mg, 0,05 eq.) a la disolución. Simultáneamente, se disolvió ácido oleico (0,787 ml, 1 eq.) en 5 ml de THF y a continuación se añadieron a la disolución TEA (1,05 ml, 3 eq.) y cloruro de isobutililo (0,26 ml, 1 eq.). Después de la activación del ácido, el precipitado se filtró en la disolución preparada de HA. La reacción tuvo lugar a temperatura ambiente durante 3 horas. Después, la mezcla de reacción se diluyó con 5 ml de agua desmineralizada que contiene la adición de 0,50 g de NaCl. El derivado acilado se aisló de la mezcla de reacción en el procedimiento de precipitación subsecuente usando 4 veces de isopropanol absoluto. Después de haber sido sometido a decantación, el precipitado se lavó repetidamente inicialmente con la disolución acuosa de isopropanol (85% en vol.) para retirar DMAP del derivado y subsecuentemente con isopropanol absoluto para retirar el agua del derivado. Después, el precipitado se secó a la temperatura de 40°C durante 48 horas y subsecuentemente se liofilizó con el fin de retirar los disolventes residuales.

DS 11% (determinado por RMN)

40  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  0,88 (t, 3H,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ ),  $\delta$  1,22-1,35 (m, 26H,  $(-\text{CH}_2-)_{14}$ ),  $\delta$  1,60 (m, 2H,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}-$ ),  $\delta$  2,41 (t, 2H,  $-\text{CH}_2-\text{CO}-$ ),  $\delta$  5,41 (d, 2H,  $\text{CH}=\text{CH}$ )

Ejemplo 12. Preparación de derivado de oleilo (C18:1) de ácido hialurónico por medio del anhídrido mixto de ácido 2,4,6-triclorobenzoico y ácido oleico

45 Se disolvieron 0,5 g de hialuronato de sodio (1,25 mmol, 130 kDa) en 5 ml de agua desmineralizada. Después, se añadieron gradualmente 3 ml de THF. A continuación, se añadieron TEA (1,2 ml, 3 eq.) y DMAP (15,0 mg, 0,1 eq.) a la disolución. Simultáneamente, se disolvió ácido oleico (0,787 ml, 2 eq.) en 10 ml de THF y a continuación se añadieron TEA (0,52 ml, 3 eq) y cloruro de 2,4,6-triclorobenzoilo (0,391 ml, 2 eq) a la disolución. Después de la activación del ácido, el precipitado se filtró en la disolución preparada de HA. La reacción tuvo lugar a temperatura ambiente durante 3 horas. Después, la mezcla de reacción se diluyó con 5 ml de agua desmineralizada que contenía la adición de 0,25 g de NaCl. El derivado acilado se aisló de la mezcla de reacción en el procedimiento de precipitación subsecuente usando 4 veces de isopropanol absoluto. Después de haber sido sometido a decantación, el precipitado se lavó repetidamente inicialmente con la disolución acuosa de isopropanol (85% en vol.) para retirar DMAP del derivado y subsecuentemente con isopropanol absoluto para retirar el agua del derivado. Después, el precipitado se secó a la temperatura de 40°C durante 48 horas y subsecuentemente se liofilizó con el fin de retirar los disolventes residuales.

55

DS 18% (determinado por RMN)

$^1\text{H}$  RMN ( $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  0,88 (t, 3H,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ ),  $\delta$  1,22-1,35 (m, 26H,  $(-\text{CH}_2-)_{14}$ ),  $\delta$  1,60 (m, 2H,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}-$ ),  $\delta$  2,41 (t, 2H,  $-\text{CH}_2-\text{CO}-$ ),  $\delta$  5,41 (d, 2H,  $\text{CH}=\text{CH}$ )

5 Ejemplo 13. Preparación del derivado de linoleilo (C18:2) de ácido hialurónico por medio del anhídrido mixto de ácido 2,4,6-triclorobenzoico y ácido linoleico.

10 Se disolvieron 0,5 g de hialuronato de sodio (1,25 mmol, 15 kDa) en 10 ml de agua desmineralizada. A continuación, se añadieron TEA (0,52 ml, 3 eq.) y DMAP (8 mg, 0,05 eq.) a la disolución. Simultáneamente, se disolvió ácido linoleico (0,77 ml, 2 eq.) en 3 ml de THF y a continuación TEA (1,2 ml, 7 eq.) y cloruro de 2,4,6-triclorobenzoilo (0,391 ml, 2 eq.) se añadieron a la disolución. Después de la activación del ácido, el precipitado se filtró en la disolución preparada de HA. La reacción tuvo lugar a temperatura ambiente durante 3 horas. Después, la mezcla de reacción se diluyó con 5 ml de agua desmineralizada que contiene la adición de 0,5 g de NaCl. El derivado acilado se aisló de la mezcla de reacción en el procedimiento de precipitación subsecuente usando 4 veces de isopropanol absoluto. Después de haber sido sometido a decantación, el precipitado se lavó repetidamente inicialmente con la disolución acuosa de isopropanol (85% en vol.) para retirar DMAP del derivado y subsecuentemente con isopropanol absoluto para retirar el agua del derivado. Después, el precipitado se secó a la temperatura de 40°C durante 48 horas y subsecuentemente se liofilizó con el propósito de retirar los disolventes residuales.

DS 16% (determinado por RMN)

$^1\text{H}$  RMN ( $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  0,88 (t, 3H,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ ),  $\delta$  1,22-1,35 (m, 24H,  $(-\text{CH}_2-)_{14}$ ),  $\delta$  1,63 (m, 2H,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}-$ ),  $\delta$  2,44 (t, 2H,  $-\text{CH}_2-\text{CO}-$ ),  $\delta$  2,83 (m, 2H,  $=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{}$ ),  $\delta$  5,45 (m, 4H,  $\text{CH}=\text{CH}$ )

20 Ejemplo 14. Preparación de derivado de linoleilo (C18:2) de ácido hialurónico por medio del anhídrido mixto de ácido 2,4,6-triclorobenzoico y ácido linoleico

25 Se disolvieron 0,5 g de hialuronato de sodio (1,25 mmol, 15 kDa) en 10 ml de agua desmineralizada. A continuación, se añadieron TEA (0,52 ml, 3 eq.) y DMAP (8 mg, 0,05 eq.) a la disolución. Simultáneamente, se disolvió ácido linoleico (0,77 ml, 2 eq.) en 3 ml de THF y a continuación se añadieron TEA (1,2 ml, 7 eq.) y cloruro de 2,4,6-triclorobenzoilo (0,391 ml, 2 eq.) a la disolución. Después de la activación del ácido, el precipitado se filtró en la disolución preparada de HA. La reacción tuvo lugar a temperatura ambiente durante 3 horas y subsecuentemente la mezcla de reacción se calentó a 50°C durante 1 hora. Después, la mezcla de reacción se diluyó con 5 ml de agua desmineralizada que contiene la adición de 0,75 g de NaCl. El derivado acilado se aisló de la mezcla de reacción en el procedimiento de precipitación subsecuente usando 4 veces de isopropanol absoluto. Después de haber sido sometido a decantación, el precipitado se lavó repetidamente inicialmente con la disolución acuosa de isopropanol (85% en vol.) para retirar DMAP del derivado y subsecuentemente con isopropanol absoluto con el fin de retirar el agua del derivado. Después, el precipitado se secó a la temperatura de 40°C durante 48 horas y subsecuentemente se liofilizó con el fin de retirar los disolventes residuales.

DS 20% (determinado por RMN)

35  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  0,88 (t, 3H,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ ),  $\delta$  1,22-1,35 (m, 24H,  $(-\text{CH}_2-)_{14}$ ),  $\delta$  1,63 (m, 2H,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}-$ ),  $\delta$  2,44 (t, 2H,  $-\text{CH}_2-\text{CO}-$ ),  $\delta$  2,83 (m, 2H,  $=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{}$ ),  $\delta$  5,45 (m, 4H,  $\text{CH}=\text{CH}$ )

Ejemplo 15. Preparación de derivado de linolenilo (C18:3) de ácido hialurónico por medio del anhídrido mixto de ácido 2,4,6-triclorobenzoico y ácido linolénico

40 Se disolvieron 0,5 g de hialuronato de sodio (1,25 mmol, 15 kDa) en 10 ml de agua desmineralizada. A continuación, se añadieron TEA (0,52 ml, 3 eq.) y DMAP (8 mg, 0,05 eq.) a la disolución. Simultáneamente, se disolvió ácido linolénico (0,765 ml, 2,0 eq.) en 5 ml de THF y a continuación se añadieron TEA (0,52 ml, 3 eq.) y cloruro de 2,4,6-triclorobenzoilo (0,391 ml, 2,0 eq.) a la disolución. Después de la activación del ácido, el precipitado se filtró en la disolución preparada de HA. La reacción tuvo lugar a temperatura ambiente durante 3 horas. Después, la mezcla de reacción se diluyó con 5 ml de agua desmineralizada que contenía la adición de 0,75 g de NaCl. El derivado acilado se aisló de la mezcla de reacción en el procedimiento de precipitación subsecuente usando 4 veces de isopropanol absoluto. Después de haber sido sometido a decantación, el precipitado se lavó repetidamente inicialmente con la disolución acuosa de isopropanol (85% en vol.) para retirar DMAP del derivado y subsecuentemente con isopropanol absoluto para retirar el agua del derivado. Después, el precipitado se secó a la temperatura de 40°C durante 48 horas y subsecuentemente se liofilizó con el propósito de retirar los disolventes residuales.

50 DS 15% (determinado por RMN)

$^1\text{H}$  RMN ( $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  0,88 (t, 3H,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ ),  $\delta$  1,22-1,35 (m, 22H,  $(-\text{CH}_2-)_{14}$ ),  $\delta$  1,61 (m, 2H,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}-$ ),  $\delta$  2,43 (t, 2H,  $-\text{CH}_2-\text{CO}-$ ),  $\delta$  2,83 (m, 2H,  $=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{}$ ),  $\delta$  5,45 (m, 4H,  $\text{CH}=\text{CH}$ )

Ejemplo 16. Preparación del derivado de linolenilo (C18:3) del ácido hialurónico por medio del anhídrido mixto del ácido 2,4,6-triclorobenzoico y el ácido linolénico

Se disolvieron 0,5 g de hialuronato de sodio (1,25 mmol, 15 kDa) en 10 ml de agua desmineralizada. A continuación, se añadieron TEA (0,52 ml, 3 eq.) y DMAP (8 mg, 0,05 eq.) a la disolución. Simultáneamente, se disolvió ácido linolénico (0,382 ml, 1 eq.) en 5 ml de THF y a continuación se añadieron TEA (0,52 ml, 3 eq.) y cloruro de 2,4,6-triclorobenzoilo (0,195 ml, 1 eq.) a la disolución. Después de la activación del ácido, el precipitado se filtró en la disolución preparada de HA. La reacción tuvo lugar a temperatura ambiente durante 3 horas y posteriormente la mezcla de reacción se calentó a 50°C durante 1 hora. Después, la mezcla de reacción se diluyó con 5 ml de agua desmineralizada que contenía la adición de 0,25 g de NaCl. El derivado acilado se aisló de la mezcla de reacción en el procedimiento de precipitación subsecuente usando 4 veces de isopropanol absoluto. Después de haber sido sometido a decantación, el precipitado se lavó repetidamente inicialmente con la disolución acuosa de isopropanol (85% en vol.) para retirar DMAP del derivado y subsecuentemente con isopropanol absoluto para retirar el agua del derivado. Después, el precipitado se secó a la temperatura de 40°C durante 48 horas y subsecuentemente se liofilizó con el fin de retirar los disolventes residuales.

DS 10% (determinado por RMN)

<sup>1</sup>H RMN (D<sub>2</sub>O): δ 0,88 (t, 3H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), δ 1,22-1,35 (m, 22H, (-CH<sub>2</sub>)<sub>14</sub>), δ 1,61 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CO-), δ 2,43 (t, 2H, -CH<sub>2</sub>-CO-), δ 2,83 (m, 2H, =CH-CH<sub>2</sub>-CH=), δ 5,45 (m, 4H, CH=CH)

Ejemplo 17. Encapsulación de tocoferol (vitamina E) en el derivado de caproilo (C6) de ácido hialurónico

Se disolvieron 100 mg del derivado acilado de hialuronano, que se había preparado según el Ejemplo 1, en 5 ml de agua con agitación continua durante 3 horas. La disolución resultante se complementó gradualmente con la disolución de tocoferol (10 mg en 3 ml de CHCl<sub>3</sub>) con agitación continua y a una temperatura comprendida entre 25 y 40°C y a continuación se añadieron gradualmente otros 3 ml de CHCl<sub>3</sub>. Subsecuentemente, se retiró CHCl<sub>3</sub> de la disolución en un procedimiento de evaporación continua. Después de la retirada de CHCl<sub>3</sub>, la fase acuosa se secó por completo, se rehidrató en un baño acuoso y se filtró en un filtro de vidrio de 1 µm. El filtrado se liofilizó.

La cantidad de tocoferol unido (determinado mediante el método de HPLC) fue: 2,3% (peso/peso)

Ejemplo 18. Encapsulación del rojo Nilo en el derivado de caproilo (C6) de ácido hialurónico

100 mg del derivado acilado de hialuronano, que se había preparado según el Ejemplo 1 se disolvieron en 5 ml de agua con agitación continua durante 3 horas. La disolución resultante se complementó gradualmente con la disolución de rojo Nilo (10 mg en 3 ml de CHCl<sub>3</sub>) con agitación continua y a una temperatura que varía entre 25 y 40°C y después se añadieron gradualmente otros 3 ml de CHCl<sub>3</sub>. Subsecuentemente, se retiró CHCl<sub>3</sub> de la disolución en un procedimiento de evaporación continua. Después de la retirada de CHCl<sub>3</sub>, la fase acuosa se secó por completo, se rehidrató en un baño acuoso y se filtró en un filtro de vidrio de 1 µm. El filtrado se liofilizó.

La cantidad de rojo Nilo unido (determinado mediante el método de UV-Vis) fue: 0,4% (peso/peso)

Ejemplo 19. Encapsulación de paclitaxel en el derivado de caproilo (C6) de ácido hialurónico

Se disolvieron 100 mg del derivado acilado de hialuronano, que se había preparado según el Ejemplo 1, en 5 ml de agua con agitación continua durante 3 horas. La disolución resultante se completó gradualmente con la disolución de paclitaxel (10 mg en 3 ml de CHCl<sub>3</sub>) con agitación continua y a una temperatura que varía entre 25 y 40°C y después se añadieron gradualmente otros 3 ml de CHCl<sub>3</sub>. Subsecuentemente, se retiró CHCl<sub>3</sub> de la disolución en un procedimiento de evaporación continua. Después de la retirada de CHCl<sub>3</sub>, la fase acuosa se secó por completo, se rehidrató en un baño acuoso y se filtró en un filtro de vidrio de 1 µm. El filtrado se liofilizó.

La cantidad de paclitaxel unido (determinado mediante el método de HPLC): 5% (peso/peso)

Ejemplo 20. Encapsulación de fosfatidilcolina en derivado de capronilo (C6) de ácido hialurónico

Se disolvieron 100 mg de derivado acilado de hialuronano, que se había preparado según el Ejemplo 1, en 5 ml de agua con agitación continua durante 3 horas. La disolución resultante se completó gradualmente (gota a gota) con la disolución de fosfatidilcolina (10 mg en 5 ml de EtOH) con agitación continua. Se retiró EtOH de la disolución en un procedimiento de evaporación continua. Subsecuentemente, la fase acuosa residual se secó completamente, se rehidrató en un baño acuoso y se filtró en un filtro de vidrio de 1 µm. El filtrado se liofilizó.

La cantidad de fosfatidilcolina unida (determinada mediante el método de HPLC): 3,0% (peso/peso).

Ejemplo 21. Encapsulación de coenzima Q10 en derivado de palmitoilo (C16) de ácido hialurónico

Se disolvieron 100 mg de derivado acilado de hialuronano, que se había preparado según el Ejemplo 7, en 10 ml de agua con agitación continua durante la noche. La disolución resultante se complementó gradualmente con la disolución de coenzima Q10 (20 mg en 5 ml de CHCl<sub>3</sub>) con agitación continua y a una temperatura que varía entre 30 y 40°C y después se añadieron gradualmente otros 3 ml de CHCl<sub>3</sub>. Subsecuentemente, se retiró CHCl<sub>3</sub> de la disolución en un procedimiento de evaporación continua. Después de la retirada de CHCl<sub>3</sub>, la fase acuosa se secó por completo, se rehidrató en un baño acuoso y se filtró en un filtro de vidrio de 1 µm. El filtrado se liofilizó.

La cantidad de coenzima Q10 unida (determinada por medio del método de UV-Vis) fue: 12% (peso/peso)

Cuando el producto se disuelve en la disolución al 0,9% de NaCl, se forma una disolución coacervada o similar a gel en función de la concentración del producto disuelto.

Ejemplo 22. Encapsulación de tocoferol (vitamina E) en derivado de estearilo (C18) de ácido hialurónico

5 Se disolvieron 100 mg de derivado acilado de hialuronano, que se había preparado según el Ejemplo 8, en 10 ml de agua con agitación continua durante la noche. La disolución resultante se complementó gradualmente con la disolución de tocoferol (alrededor de 50 mg en 5 ml de etanol) con agitación continua y a una temperatura comprendida entre 25 y 40°C. Subsecuentemente, se retiró el etanol de la disolución en un procedimiento de evaporación continua. Después de la retirada de EtOH, la fase acuosa se secó por completo, se rehidrató en un  
10 baño acuoso y se filtró a través de un filtro de vidrio de 1 µm. El filtrado se liofilizó.

La cantidad de tocoferol unido (determinado mediante el método de UV-Vis) fue: 30% (peso/peso)

Ejemplo 23. Encapsulación de tocoferol (vitamina E) en derivado de oleilo (C18:1) de ácido hialurónico

15 Se disolvieron 100 mg de derivado acilado de hialuronano, que se había preparado según el Ejemplo 9, en 10 ml de agua con agitación continua durante la noche. La disolución resultante se complementó gradualmente con la disolución de tocoferol (alrededor de 50 mg en 5 ml de isopropanol) con agitación continua y a una temperatura comprendida entre 25 y 40°C. Subsecuentemente, se retiró el isopropanol de la disolución en un procedimiento de evaporación continua. Después de la retirada de isopropanol, la fase acuosa se secó por completo, se rehidrató en un baño acuoso y se filtró a través de un filtro de vidrio de 1 µm. El filtrado se liofilizó.

La cantidad de tocoferol unido (determinado mediante el método de UV-Vis) fue: 40% (peso/peso)

20 Ejemplo 24. Encapsulación de coenzima Q10 en derivado de palmitoilo (C16) de ácido hialurónico

Se disolvieron 100 mg del derivado acilado de hialuronano, que se había preparado según el Ejemplo 7, en 10 ml de agua con agitación continua durante la noche. La disolución resultante se complementó gradualmente con la disolución de la coenzima Q10 (alrededor de 30 mg en 2 ml de EtOH) con agitación continua. Después de haber sido agitada durante 3 horas, la mezcla resultante se sometió a sonicación (100 W) durante 30 minutos.  
25 Subsecuentemente, la mezcla se sometió a diálisis intensiva (durante 2 días) frente a agua destilada y se filtró a través de un filtro de vidrio de 1 µm y se liofilizó.

La cantidad de coenzima Q10 unida (determinada por medio del método de UV-Vis) fue: 4,6% (peso/peso)

Cuando el producto se disuelve en la disolución al 0,9% de NaCl, se forma una disolución coacervada o similar a gel en función de la concentración del producto disuelto.

30 Ejemplo 25. Encapsulación de paclitaxel en derivado de palmitoilo (C16) de ácido hialurónico

Se disolvieron 100 mg del derivado acilado de hialuronano, que se había preparado según el Ejemplo 7, en 10 ml de agua con agitación continua durante la noche. La disolución resultante se complementó gradualmente con la disolución de paclitaxel Q10 (aproximadamente 40 mg en 2 ml de EtOH) con agitación continua. Después de haber sido agitada durante 3 horas, la mezcla resultante se sometió a sonicación (100 W) durante 30 minutos.  
35 Subsecuentemente, la mezcla se sometió a diálisis intensiva (corte de 3,5 kDa) frente a agua destilada y se filtró a través de una frita de porcelana S4 y se liofilizó.

La cantidad de paclitaxel unido (determinado mediante el método de HPLC) fue: 25% (peso/peso)

Ejemplo 26. Encapsulación de extracto de lúpulo en derivado de oleilo (C18:1) de ácido hialurónico

40 Se disolvieron 100 mg de derivado acilado de hialuronano, que se había preparado según el Ejemplo 9, en 10 ml de agua con agitación continua durante la noche. La disolución resultante se complementó gradualmente con la disolución de una mezcla de extracto de lúpulo (alrededor de 50 mg en 5 ml de isopropanol) con agitación continua. Subsecuentemente, se retiró el isopropanol de la disolución en un procedimiento de evaporación continua. Después de la retirada del isopropanol, la fase acuosa se secó completamente, se rehidrató en un baño acuoso y se filtró a través de un filtro de vidrio de 1 µm. El filtrado se liofilizó.

45 La cantidad de tocoferol unido (determinado mediante el método de UV-Vis) fue: 40% (peso/peso)

Ejemplo 27. Determinación de las concentraciones micelares críticas (agregación) de derivados acilados de ácido hialurónico

(a) Método de fluorescencia

50 La concentración crítica micelar (agregación) se determinó a partir de la dependencia de la intensidad de fluorescencia de las concentraciones de disolución (Figura 1). Los espectros de emisión (580-700 nm) de las



disoluciones acuosas de los derivados acilados HAC6 (DS = 60%) y HAC16 (DS = 14%) con rojo Nilo unido, que se habían preparado en el intervalo de concentración de 0,00002 a 1,5 mg/ml<sup>-1</sup> según el procedimiento descrito en el ejemplo 18, se midieron en el aparato fluorométrico RF-5301 (Shimadzu) trabajando con la longitud de onda de excitación de 543 nm.

- 5 Se determinaron las siguientes concentraciones micelares críticas (agregación): para HA C6: 0,001-0,003 mg/ml<sup>-1</sup>, para HA C16: 0,00006-0,0002 mg/ml<sup>-1</sup> (Figura 1). El mismo valor de medida se obtuvo para PBS con la disolución de NaCl al 0,9%.

(b) Método de dispersión de luz estática

- 10 La concentración crítica micelar (agregación) se determinó a partir de la dependencia de las intensidades de la luz dispersada ( $I_{90}$ ) de las concentraciones de la disolución (Figura 2). La intensidad de la luz dispersada en las disoluciones acuosas de los derivados acilados HAC6 (DS = 60%) y HAC16 (DS = 14%) con rojo Nilo unido, que se habían preparado en el intervalo de concentración de 0,00002 a 0,06 mg/ml<sup>-1</sup> según el procedimiento descrito en el ejemplo 18, se midieron en el ángulo de 90° en el aparato fotométrico DAWN EOS (Wyatt Technology Corporation) trabajando con la longitud de onda de 632 nm.

- 15 Se determinaron las siguientes concentraciones micelares críticas (agregación): para HA C6: 0,002-0,004 mg/ml<sup>-1</sup>, para HA C16: 0,00006-0,0001 mg/ml<sup>-1</sup> (Figura 2). El mismo valor de medida se obtuvo para PBS con la disolución de NaCl al 0,9%.

Ejemplo 28. Determinación del potencial zeta de nanomicelas de hialuronano

- 20 El potencial zeta se determinó en el aparato Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments) equipado con un láser de He-Ne (633 nm). Independientemente de la sustancia encapsulada, el potencial zeta exhibido por las nanomicelas en disoluciones acuosas era de ~ -50 mV a 5 mg/ml<sup>-1</sup> y de ~ -60 a -70 mV después de una dilución de 10 veces. En la disolución al 0,9% de NaCl, el potencial zeta se redujo (de -30 a -23 mV). De este modo, el valor absoluto del potencial zeta indica una alta estabilidad de las nanomicelas preparadas en disoluciones acuosas y una estabilidad relativamente alta de las mismas en disoluciones salinas.

- 25 Ejemplo 29. Análisis morfológico de nanomicelas de hialuronano

- Los análisis microscópicos se llevaron a cabo a -135°C en el microscopio de barrido JEOL 7401 F trabajando con el voltaje de aceleración del haz de 2 kV (es decir, en un modo de haz fino). Para el propósito de los análisis anteriores, se hicieron gotear 2-3 µl de una muestra concentrada (alrededor de 20 mg/0,4 ml) sobre una placa de Al y se sumergieron en nitrógeno líquido introducido en la cámara criogénica Alta 2500 (Gatan). Subsecuentemente, se revistieron con la mezcla de Pt/Pd durante 2 minutos.

- 30 El tamaño de las nanomicelas de hialuronano C6 con vitamina E encapsulada (Ejemplo 17) y hialuronano C16 con paclitaxel encapsulado (ejemplo 25) estaba en el intervalo: 20-50 nm (Figura 3).

Ejemplo 30. Distribución de cadenas aciladas y sustancias no polares en nanomicelas de hialuronano

- 35 La separación de las nanomicelas de hialuronano hidrofobizado con vitamina E encapsulada se llevó a cabo por medio del método de fraccionamiento de flujo - campo de flujo (F1FFF) usando un canal de separación de entrada de vidrio fritado. Para el propósito del análisis, se disolvieron 10 mg de hialuronano acilado liofilizado con vitamina E unida (preparado a partir de los derivados enumerados en la Tabla 1 según el procedimiento descrito en el Ejemplo 23) en 1 ml de la fase móvil (NaNO<sub>3</sub> 50 mM con 0,02% de NaN<sub>3</sub>) y se filtró a través de un filtro de jeringa de vidrio con un tamaño de poro de 1 µm. Subsecuentemente, se inyectaron 100 µl en el aparato de F1FFF.

- 40 La separación se llevó a cabo por medio del gradiente de flujo transversal de 2 ml/min a 0,1 ml/min durante un intervalo de 5 minutos. El caudal de la fase móvil alimentada al detector se mantuvo constante, siendo el punto fijado 1 ml/min.

- 45 La separación tuvo lugar a temperatura de laboratorio. El eluato se monitorizó por medio del detector de dispersión de luz DAWN EOS, el refractómetro diferencial Optilab rEX (ambos fabricados por Wyatt Technology Corporation) y el detector de UV fijados a la longitud de onda de 292 nm (Shimadzu).

Cuando se aplica el método anterior, es posible determinar tanto el porcentaje de sustancia unida como de hialuronano hidrofobizado firmemente incorporado dentro de las nanomicelas y el porcentaje del mismo presente fuera de las estructuras agregadas (véase la Tabla 1).

Tabla 1. Distribución de cadenas aciladas y vitamina E (tocoferol) dentro y fuera de agregados (micelas) de hialuronano.

Vehículo (grado de sustitución)	Capacidad de unión de tocoferol (% peso/peso)	% de grupos acilados no agregados	% de grupos acilados agregados	% de vitamina E libre	% de vitamina E unida
HAC6 (DS=55%)	6,9	91,5	8,5	0,5	99,5
HAC8 (DS=15%)	12,4	82,1	17,9	0,4	99,6
HAC10 (DS=15%)	18,5	47,2	52,8	0,5	99,5
HAC18 (DS=10%)	40	21,5	78,5	0,3	99,7

5 Los resultados enumerados en la Tabla 1 muestran claramente que la distribución de las cadenas aciladas en las nanomicelas de hialuronano está influenciada principalmente por la longitud de una cadena de acilo. El grado de agregación de cadenas de acilo se incrementa con el incremento de la longitud de las mismas. La incorporación de una sustancia no polar en una nanomicela tiene lugar independientemente en la longitud de la cadena de acilo respectiva. En este caso particular, la distribución de una sustancia no polar en una micela siempre prevalece completamente (> 99.5%).

Ejemplo 31. Citotoxicidad de nanomicelas que llevan un fármaco citostático basado en paclitaxel

10 El paclitaxel unido a los derivados acilados de hialuronano C6 y C16, que se había preparado según los procedimientos descritos en los ejemplos 19 y 25 respectivamente, se disolvió en un medio de cultivo (que contenía 10% de FBS), siendo la concentración final de 100 µg/ml. Las células de fibroblastos dérmicos humanos (NHDF), una línea celular de carcinoma de mama humano (MCF-7) y una línea celular de carcinoma de colon humano (HCT 116) se usaron para probar las concentraciones de paclitaxel de 0,001, 0,01, 0,1, 1,0, 10,0 y 100,0 ng/ml transportados por los derivados de hialuronano acilado C6 y C16, estando basado el ensayo en las medidas de la viabilidad celular. El efecto del paclitaxel transportado por los derivados de hialuronano acilado C6 y C16 se comparó con el del paclitaxel en sí mismo (Figura 4). La medida de la viabilidad celular se basa en la detección de la actividad de la enzima deshidrogenasa, que está activa en células vivas y transforma el sustrato amarillo en una disolución violeta. La absorbancia de esta última, que se detecta a 540 nm, es proporcional al porcentaje de células vivas.

La concentración creciente del vehículo provocó, particularmente cuando se usó HAC 16, una ligera reducción de la efectividad citostática del paclitaxel (Figura 4).

Los propios derivados acilados no exhibieron ningún efecto citostático.

Ejemplo 32. Transferencia de sustancias encapsuladas dentro de células

25 Las sustancias doxorubicina y 7-aminoactinomicina D (7-AAD, que es una sustancia que solo penetra en células muertas y permeabilizadas) se encapsularon en el derivado acilado de hialuronano C6 según el procedimiento descrito en el ejemplo 18 (en el que el rojo Nilo fue sustituido por 7-AAD). Se usaron células de fibroblastos dérmicos humanos (NHDF), una línea celular de carcinoma de mama humano (MCF-7) y una línea celular de carcinoma de colon humano (HCT 116) para probar la existencia de una diferencia entre la penetración de la sustancia en una célula cuando la sustancia se aplica en una disolución, en la que está presente por sí misma) o en un derivado acilado de hialuronano C6. Los ensayos se llevaron a cabo mediante el método de microscopía de fluorescencia (microscopio invertido Nikon Eclipse Ti). Se analizó la doxorubicina en una concentración de 5,0 µg/ml (Figura 5) y se analizó la 7-AAD en una concentración de 15 µg/ml (Figura 6).

La transferencia de las sustancias del vehículo a las células fue exitosa.

35 Ejemplo 33. Liberación de rojo de aceite encapsulado de nanomicelas en una disolución

Se estudió in vitro la liberación de rojo aceite (rojo de aceite O, disolvente rojo 27) encapsulado en HAC6 según el procedimiento descrito en el ejemplo 18 (en el que el rojo de aceite O sustituyó al rojo Nilo) en disoluciones. Las disoluciones diana usadas fueron PBS y PBS con la adición de 1% de TWEEN 80. Las disoluciones acuosas de derivados acilados con rojo de aceite unido (en el intervalo de concentración entre 1 y 10 mg/ml<sup>-1</sup>) se disolvieron en PBS o en PBS con la adición de 1% de TWEEN 80, se transfirieron cuantitativamente al tubo de diálisis (MWCO 12-14 kDa, Spectrum Laboratories) y se dializaron a una temperatura de 37°C contra PBS o contra PBS con la adición de 1% de TWEEN 80. En intervalos de tiempo predefinidos, se tomaron muestras de 4 ml del dializado y se reemplazaron con medio de nueva aportación. La cantidad liberada de rojo de aceite se determinó mediante el método de UV-Vis (Figura 7).

45 La liberación lenta de la sustancia unida es indicativa de una alta estabilidad de los sistemas vehiculares en PBS.

## Ejemplo 34. Liberación de paclitaxel encapsulado de nanomicelas en una disolución

La liberación de paclitaxel encapsulado en HAC6 y HAC16 según el procedimiento descrito en los ejemplos 19 y 25 respectivamente en una disolución se estudió in vitro a una temperatura de 37°C. Las disoluciones acuosas de derivados acilados que contienen paclitaxel en la concentración total de 0,2 mg se disolvieron en PBS, se transfirieron cuantitativamente al tubo de diálisis (MWCO 12-14 kDa, Spectrum Laboratories) y se dializaron a una temperatura de 37°C frente a 50 ml de PBS. En intervalos de tiempo predefinidos, el dializado se reemplazó por un medio de nueva aportación. La cantidad liberada de paclitaxel se determinó después de someter las mismas a extracción en cloroformo, evaporación y subsecuente disolución en acetonitrilo por medio de HPLC (Figura 8).

La liberación registrada para HAC16 era más lenta en comparación con HAC6. La liberación lenta de la sustancia unida es indicativa de una alta estabilidad de los sistemas vehiculares en PBS.

## Ejemplo 35. Preparación de nanoemulsiones y microemulsiones a partir del derivado de oleilo (C18:1) de ácidos hialurónico y oleico

Se disolvieron 80 mg del derivado acilado de hialuronano, que se había preparado según el Ejemplo 11, en 4 ml de agua con agitación continua durante la noche. La disolución resultante se complementó gradualmente con los 8 mg de ácido oleico con agitación continua. Después de haber sido agitada, la mezcla resultante se sometió a sonicación en dos etapas (Ultrasonic Processor, UPS 200S, 200 W de salida). La primera etapa, que era una continua (50% de amplitud), fue seguida por la segunda etapa, que era una de pulsación (pulsos de 0,8 s, 70% de amplitud), y cada etapa duró 25 minutos. Durante el procedimiento de sonicación, el recipiente de vidrio con la mezcla que se está procesando se sumergió en un baño de hielo para protegerlo del sobrecalentamiento.

Tamaño de partícula (determinado en Zetasizer): 200-300 nm. El tamaño dependía de la cantidad de fase aceitosa en la mezcla.

## Ejemplo 36. Preparación de nanoemulsiones y microemulsiones a partir del derivado de oleilo (C18:1) de ácidos hialurónico y oleico con coenzima Q10 disuelta

Se disolvieron 80 mg del derivado acilado de hialuronano, que se había preparado según el Ejemplo 11, en 4 ml de agua con agitación continua durante la noche. La disolución resultante se completó gradualmente con los 8 mg de la coenzima Q10 que contiene ácido oleico ya disuelto en ella (alrededor de 0,5 mg) con agitación continua. Después de haber sido agitada, la mezcla resultante se sometió a sonicación en dos etapas (procesador ultrasónico, UPS 200S, 200 W de salida). La primera etapa, que era continua (50% de amplitud), fue seguida por la segunda etapa, que era de pulsación (pulsos de 0,8 s, 70% de amplitud), y cada etapa duró 25 minutos. Durante el procedimiento de sonicación, el recipiente de vidrio con la mezcla que se está procesando se sumergió en un baño de hielo para protegerlo del sobrecalentamiento.

Tamaño de partícula (determinado en Zetasizer): 200-300 nm. El tamaño dependía de la cantidad de fase aceitosa en la mezcla.

## Ejemplo 37. Preparación de nanomicelas estabilizadas por medio de reticulación covalente

Se disolvieron 10 g de hialuronato de sodio (25 mmol, 38 kDa) en 200 ml de agua desmineralizada. A continuación, se añadieron a la disolución TEA (6,97 ml, 2 equivalentes con respecto a un dímero de HA) y DMAP (153 mg, 0,05 eq.). Activación: se disolvieron 3,5 g de ácido 3-(2-furil)acrílico (25 mmol) en 50 ml de tetrahidrofurano y 19,2 ml de TEA (2 eq.). Subsecuentemente, la disolución resultante se enfrió en un baño de hielo y se complementó con cloruro de triclorobenzoilo (1,2 ml). La reacción tuvo lugar durante 15 minutos. Después, el ácido activado se añadió a la disolución de hialuronano y la reacción tuvo lugar a una temperatura de 25°C durante 24 horas. La mezcla de reacción resultante se diluyó con agua. El derivado acrilado se aisló de la mezcla de reacción en el procedimiento de precipitación subsecuente usando 4 veces de isopropanol absoluto. Después de haber sido sometido a decantación, el precipitado se lavó repetidamente con la disolución acuosa de isopropanol (85% en vol.). Después, el precipitado se secó a la temperatura de 40°C durante 48 horas. El derivado acrilado obtenido se acidificó (véase el ejemplo 1) y subsecuentemente se disolvió en agua y se liofilizó con el fin de retirar los disolventes residuales.

El sistema vehicular, que se había preparado a partir de rojo de aceite (rojo de aceite O) y del derivado acrilado según el Ejemplo 18 (en el que el rojo de aceite sustituyó al rojo Nilo), se disolvió para formar una disolución acuosa al 1%. En la disolución resultante, el sistema vehicular se reticuló por medio de peroxodisulfato de amonio (10 eq.) usado como activador.

DS 20% del grupo activo para fotoreticulación (determinado por RMN)

$^1\text{H}$  RMN ( $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  7,83, 6,87 (d,  $J = 3,5$ ), 6,87, 6,61 (bs), 7,83, 7,59 ( $J_{\text{trans}} = 16,01$ ), 6,39 ( $J_{\text{trans}} = 15,85$ ).

## Ejemplo 38. Aplicación tópica de nanomicelas de hialuronano - penetración en la piel, pelo y membranas mucosas

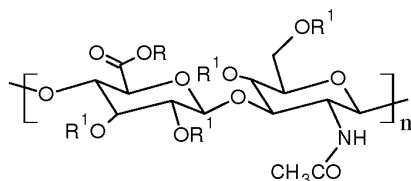
Piel porcina, membrana mucosa vaginal bovina y membrana mucosa bucal bovina fueron donadas por la compañía MasoEko, s.r.o., con sede en Kuncice 243, Letohrad. Inmediatamente después de haber sido tomadas, las muestras

5 se sometieron a la acción pasiva de la disolución de hialuronano acilado C6 y C10 ( $10 \text{ mg/ml}^{-1}$ ) con rojo Nilo encapsulado (preparadas según el procedimiento descrito en el ejemplo 18) y la penetración en las muestras se comparó midiendo los valores de fluorescencia en el microscopio invertido Nikon Eclipse Ti (equipado con la lente objetivo Plan Fluor 4x). Incubación subsecuente a una temperatura de  $37^\circ\text{C}$ : muestras de piel durante 20 horas (Figura 9), muestras de pelo durante 15 minutos (Figura 10) y muestras de membranas mucosas durante 4 horas (Figuras 11 y 12).

Los vehículos han permitido que se consiga una penetración más eficiente en la piel, pelo y membranas mucosas cuando se compara con aceite y disolventes acuosos.

## REIVINDICACIONES

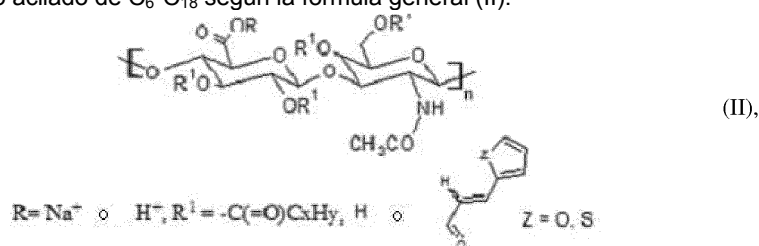
1. Un derivado acilado de C<sub>6</sub>-C<sub>18</sub> de ácido hialurónico según una fórmula general (I):



(I),

- 5 en la que R es H<sup>+</sup> o Na<sup>+</sup> y R<sup>1</sup> es H o -C(=O)C<sub>x</sub>H<sub>y</sub> o -C(=O)CH=CH-het, en la que x es un número entero que varía entre 5 y 17 e y es un número entero que varía entre 11 y 35 y C<sub>x</sub>H<sub>y</sub> es una cadena de C<sub>5</sub>-C<sub>17</sub> lineal o ramificada, saturada o insaturada y het es un grupo heterocíclico o heteroaromático que tiene un contenido seleccionable de átomos de N, S u O, por lo menos una unidad que se repite que contiene uno o más grupos R<sup>1</sup>-C(=O)C<sub>x</sub>H<sub>y</sub> o -C(=O)CH=CH-het, y en la que n varía entre 12 y 4.000.
- 10 2. Un derivado acilado de C<sub>6</sub>-C<sub>18</sub> de ácido hialurónico según la reivindicación 1, caracterizado por el hecho de que R representa H<sup>+</sup> o Na<sup>+</sup> y R<sup>1</sup> es -C(=O)(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>-CH=CH-(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>-CH<sub>3</sub>.
- 15 3. Un método de preparación de un derivado de ácido hialurónico según la fórmula general (I) definida en la reivindicación 1, caracterizado por el hecho de que el ácido hialurónico reacciona con el ácido carboxílico de C<sub>6</sub>-C<sub>18</sub> activado con un cloruro de ácido 2,4,6-triclorobenzoico o activado con un cloruro orgánico de R<sub>3</sub>-CO-Cl, en la que R<sub>3</sub> es un alquilo de C<sub>1</sub>-C<sub>30</sub> alifático o ramificado, un grupo funcional heteroaromático o un grupo funcional aromático, en presencia de una base y un catalizador en una mezcla de agua y un disolvente aprótico miscible en agua.
- 20 4. Un método de preparación según la reivindicación 3, caracterizado por el hecho de que el ácido hialurónico está disuelto en una mezcla de agua y un disolvente aprótico miscible en agua, siendo este último un disolvente orgánico polar, estando el contenido de agua en el intervalo entre 10 y 99% en volumen, preferentemente 50% en volumen.
- 25 5. Un método de preparación según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 4, caracterizado por el hecho de que la mezcla de reacción contiene una base R'<sub>3</sub>N, en la que R' es una cadena hidrocarbonada de C<sub>n</sub>H<sub>m</sub> lineal o ramificada, en la que n es un número entero que varía entre 1 y 4 y m es un número entero que varía entre 3 y 9, por ejemplo, trietilamina, en la cantidad de 0,01 a 20 equivalentes, preferentemente 6 equivalentes, con relación a un dímero de ácido hialurónico, y el catalizador se selecciona del grupo que comprende piridinas sustituidas, tal como dimetilaminopiridina, en la cantidad de 0,01 a 1 equivalente, preferentemente 0,05 equivalentes, con relación a un dímero de ácido hialurónico.
- 30 6. Un método de preparación según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, caracterizado por el hecho de que primero la activación del ácido carboxílico de C<sub>6</sub>-C<sub>18</sub> se realiza en un disolvente orgánico polar en presencia de una base y de ácido 2,4,6-triclorobenzoico o sus derivados o en presencia de una base y un cloruro orgánico y subsecuentemente la mezcla que contiene ácido carboxílico de C<sub>6</sub>-C<sub>18</sub> activado se añade a ácido hialurónico, que se disolvió en una mezcla de agua, un disolvente orgánico, una base y un catalizador, siendo el producto de la reacción resultante el derivado según la fórmula general (I).
- 35 7. Un método de preparación según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, caracterizado por el hecho de que dicho ácido carboxílico de C<sub>6</sub>-C<sub>18</sub> se selecciona del grupo que contiene ácidos caproico, enántico, caprílico, cáprico, palmítico, esteárico, oleico, linoleico y linolénico, y/o que la cantidad de ácido carboxílico de C<sub>6</sub>-C<sub>18</sub> varía entre 0,01 y 5 equivalentes, preferentemente entre 0,5 y 2 equivalentes, con relación a un dímero de ácido hialurónico.
- 40 8. Un método de preparación según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 7, caracterizado por el hecho de que la activación del ácido carboxílico de C<sub>6</sub>-C<sub>18</sub> tiene lugar durante 5 a 120 minutos, preferentemente durante 30 minutos, a la temperatura entre 20 y 60°C, preferentemente a la temperatura de 25°C, y/o que la reacción de ácido hialurónico con ácido carboxílico de C<sub>6</sub>-C<sub>18</sub> activado tiene lugar durante 1 a 24 horas, preferentemente durante 2 a 3 horas, a la temperatura entre 20 y 60°C, preferentemente a la temperatura de 25°C.
- 45 9. Un método de preparación según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 8, caracterizado por el hecho de que el derivado acilado de C<sub>6</sub>-C<sub>18</sub> de ácido hialurónico se separa subsecuentemente de la mezcla de reacción, se lava, se seca y se liofiliza.
10. Un método de preparación según la reivindicación 9, caracterizado por el hecho de que el derivado acilado de C<sub>6</sub>-C<sub>18</sub> de ácido hialurónico se separa de la mezcla de reacción en un procedimiento de precipitación usando NaCl y alcohol, y/o el derivado acilado de C<sub>6</sub>-C<sub>18</sub> de ácido hialurónico se lava con alcohol, particularmente con isopropanol o etanol.

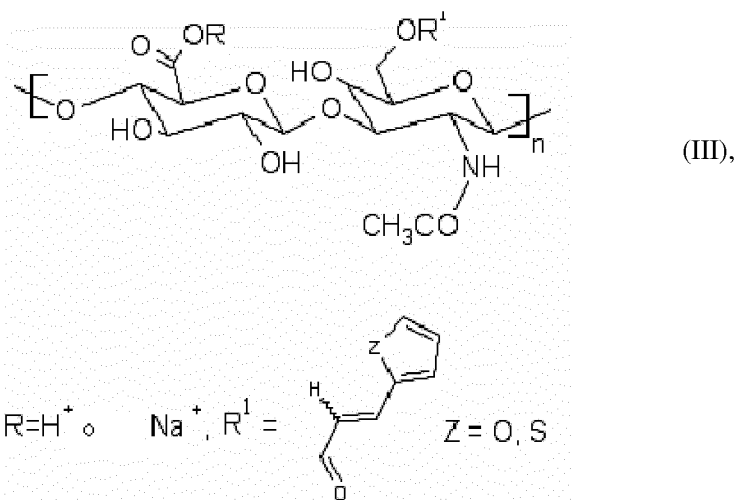
- 5 11. Una composición nanomicelar en base al derivado acilado de C<sub>6</sub>-C<sub>18</sub> de ácido hialurónico según la fórmula general (I) definida en la reivindicación 1, caracterizada por el hecho de que una composición contiene nanomicelas que comprende un núcleo hidrófobo formado por grupos acilo de C<sub>6</sub>-C<sub>18</sub> unidos a ácido hialurónico y una envoltura hidrófila formada por grupos funcionales hidrófilos de ácido hialurónico, estando una o más sustancias biológicamente activas unidas físicamente en la nanomicela.
- 10 12. Una composición nanomicelar según la reivindicación 11, caracterizada por el hecho de que contiene de 0,3 a 50% en peso de una sustancia biológicamente activa con relación al contenido en masa del derivado acilado de C<sub>6</sub>-C<sub>18</sub> de ácido hialurónico, siendo seleccionada la sustancia biológicamente activa de un grupo que comprende sustancias farmacéutica y cosméticamente activas, particularmente vitaminas, medicinas, citostáticos, fitoextractos, fitocomplejos o sustancias fitoactivas, aceites minerales o vegetales, o una de sus mezclas, preferentemente tocoferol, paclitaxel, fosfatidilcolina o coenzima Q10.
- 15 13. Una composición nanomicelar de cualquiera de las reivindicaciones 11 o 12, caracterizada por el hecho de que contiene derivado acilado de C<sub>6</sub>-C<sub>18</sub> de ácido hialurónico en una concentración que es más alta que su concentración de agregación crítica, en la que la concentración del derivado acilado de C<sub>6</sub>-C<sub>18</sub> de ácido hialurónico varía entre 0,0001 mg/ml<sup>-1</sup> y 30 mg/ml<sup>-1</sup>, preferentemente entre 1 y 20 mg/ml<sup>-1</sup>, cuando la composición está en una disolución acuosa.
- 20 14. Una composición nanomicelar según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, caracterizada por el hecho de que la sustancia biológicamente activa es un aceite mineral o vegetal en la cantidad de 0,05 a 40% en peso, preferentemente de 1 a 20% en peso, con relación al contenido en masa del derivado acilado de C<sub>6</sub>-C<sub>18</sub> de ácido hialurónico.
- 25 15. Una composición nanomicelar según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, caracterizada por el hecho de que contiene una sustancia biológicamente activa que es líquida e insoluble en agua, conteniendo dicha sustancia una sustancia biológicamente activa adicional disuelta en ella.
- 30 16. Una composición nanomicelar según la reivindicación 15, caracterizada por el hecho de que la sustancia biológicamente activa, que es líquida e insoluble en agua, es un aceite mineral o vegetal, y la sustancia biológicamente activa adicional pertenece a sustancias farmacéutica o cosméticamente activas, particularmente vitaminas, medicinas, citostáticos, fotoextractos, fitocomplejos o sustancias fitoactivas, o sus mezclas.
- 35 17. Una composición nanomicelar según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 16, caracterizada por el hecho de que está en forma de una disolución, nanoemulsión, microemulsión, coacervado o gel.
- 40 18. Un método de preparación de la composición nanomicelar definida en cualquiera de las reivindicaciones 11 a 17, caracterizado por el hecho de que el derivado acilado de C<sub>6</sub>-C<sub>18</sub> de ácido hialurónico según la fórmula general (I) definida en la reivindicación 1 se disuelve en agua, la sustancia biológicamente activa se disuelve en un disolvente orgánico, las disoluciones resultantes se mezclan conjuntamente y después se retira el disolvente orgánico.
- 45 19. Un método de preparación según la reivindicación 18, caracterizado por el hecho de que el disolvente orgánico es un disolvente clorado volátil, tal como triclorometano, o un alcohol, tal como etanol o isopropanol.
- 20 Un método de preparación de la composición nanomicelar definida en la reivindicación 11, caracterizado por el hecho de que el derivado acilado de C<sub>6</sub>-C<sub>18</sub> de ácido hialurónico según la fórmula general (I) definido en la reivindicación 1 se disuelve en agua y subsecuentemente se mezcla conjuntamente con una sustancia biológicamente activa, que es líquida e insoluble en agua, o con una sustancia biológicamente activa adicional, después de lo cual la mezcla resultante se homogeneiza por sonicación para formar una microemulsión o nanoemulsión.
21. La composición nanomicelar definida en cualquiera de las reivindicaciones 11 a 17 para uso en aplicaciones farmacéuticas o cosméticas, preferentemente en aplicaciones tópicas.
22. Un método de preparación de una composición nanomicelar estabilizada, caracterizado por el hecho de que se prepara un hialuronano acilado de C<sub>6</sub>-C<sub>18</sub> según la fórmula general (II):



en la que R representa H<sup>+</sup> o Na<sup>+</sup>, uno o más miembros R<sup>1</sup> están representados por una cadena de C<sub>6</sub>-C<sub>18</sub> lineal en por lo menos una unidad que se repite, cadena lineal que puede contener enlaces insaturados, y por ácido 3-(2-

tienil)acrílico o por ácido 3-(2-furil)acrílico o por derivados de dichos ácidos en otra por lo menos una unidad que se repite, después de lo cual se prepara una composición nanomicelar a partir del hialuronano acilado de C<sub>6</sub>-C<sub>18</sub> según la fórmula general (II), composición que se estabiliza a continuación por una reacción de reticulación.

- 5 23. Un método de preparación según la reivindicación 22, caracterizado por el hecho de que primero el ácido hialurónico reacciona con ácido 3-(2-tienil)acrílico o ácido 3-(2-furil)acrílico o con un derivado de cualquiera de estos ácidos en presencia de una base y un catalizador en una mezcla de agua y un disolvente aprótico miscible en agua, siendo activados dichos ácidos con un cloruro de ácido 2,4,6-triclorobenzoico o activados con un cloruro orgánico de la fórmula R<sub>3</sub>-CO-Cl, en la que R<sub>3</sub> es un alquilo de C<sub>1</sub>-C<sub>30</sub> alifático o ramificado, que contiene posiblemente un grupo funcional heteroaromático o aromático, para formar un hialuronano acrilado según la fórmula (III):



- 10 después, el hialuronano acrilado según la fórmula (III) reacciona con ácido carboxílico de C<sub>6</sub>-C<sub>18</sub> activado con un cloruro de ácido 2,4,6-triclorobenzoico o se activa con un cloruro orgánico de la fórmula R<sub>3</sub>-CO-Cl, en la que R<sub>3</sub> es un alquilo de C<sub>1</sub>-C<sub>30</sub> alifático o ramificado, que contiene ocasionalmente un grupo funcional aromático o heteroaromático, en presencia de una base y un catalizador en una mezcla de agua o disolvente aprótico miscible en agua para formar un hialuronano acilado de C<sub>6</sub>-C<sub>18</sub> según la fórmula (II), subsecuentemente se prepara una composición nanomicelar a partir de dicho hialuronano según la fórmula (II) usando el método definido en cualquiera de las reivindicaciones 18 a 20, composición que se somete a continuación a una reacción de reticulación por reacciones con radicales.
- 15

- 20 24. Un método de preparación según cualquiera de las reivindicaciones 22 y 23, caracterizado por el hecho de que la reacción con radicales está catalizada por un agente de reticulación preferentemente por peroxidisulfato de amonio.

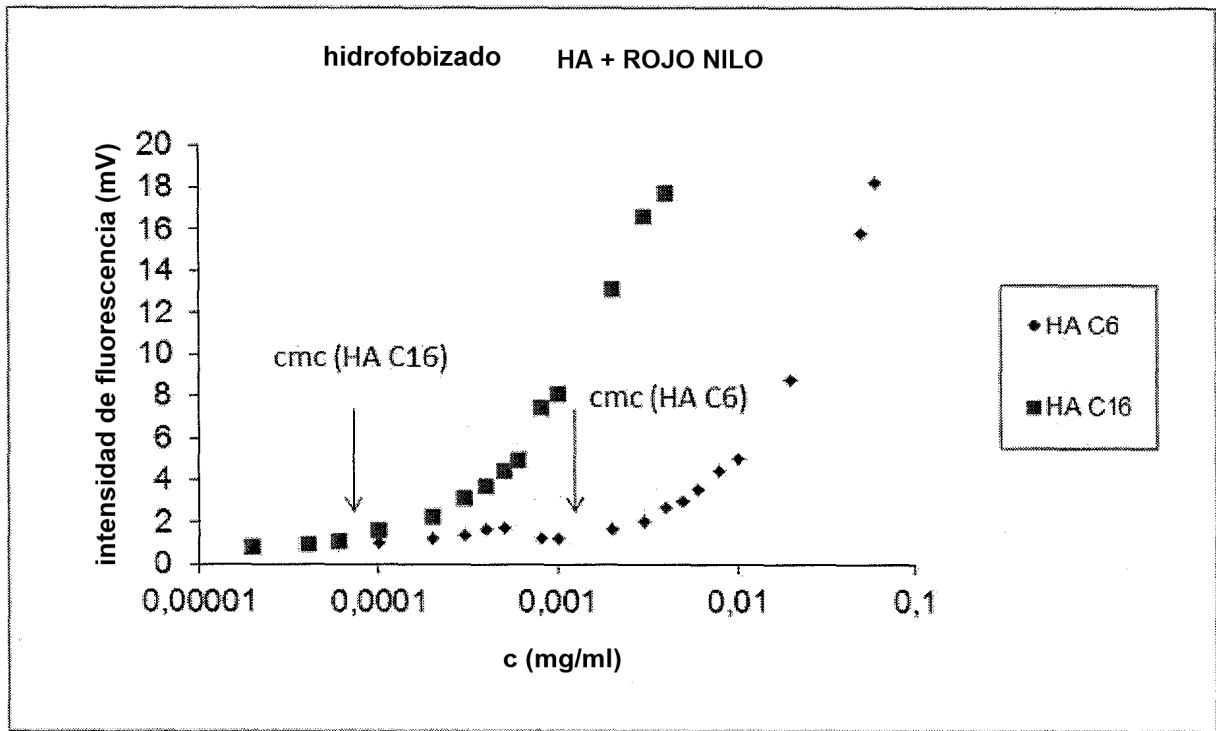


FIG. 1



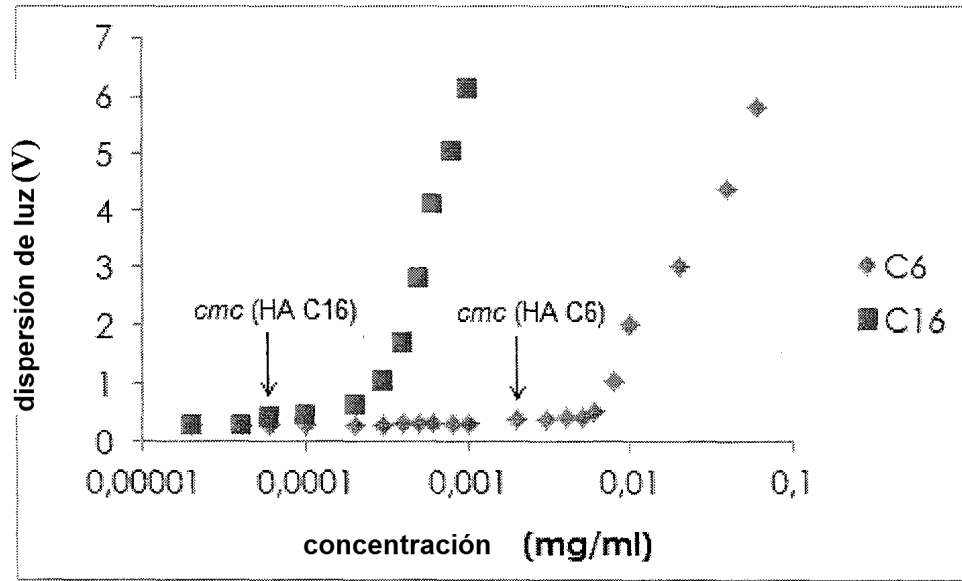
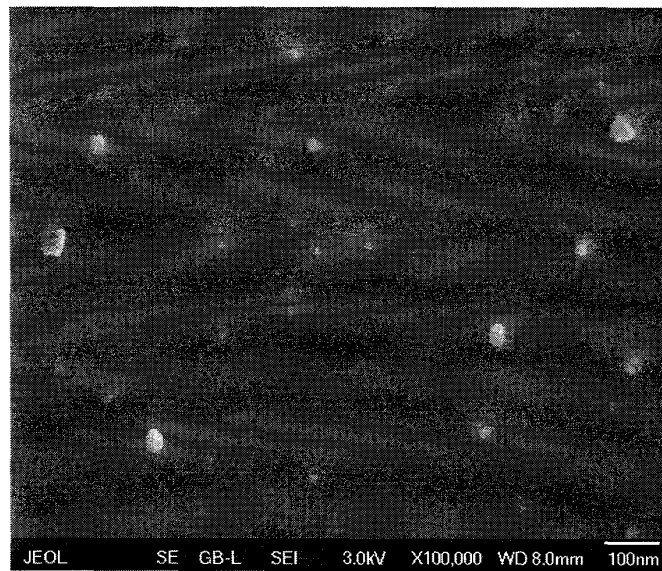
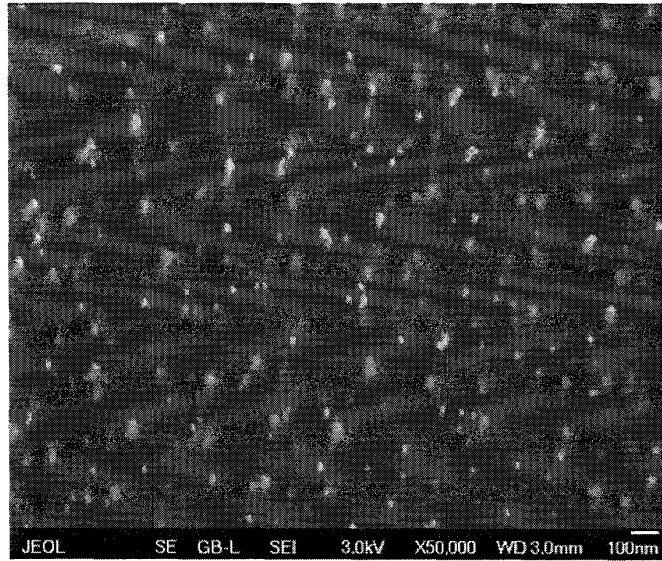


FIG. 2



**FIG. 3**

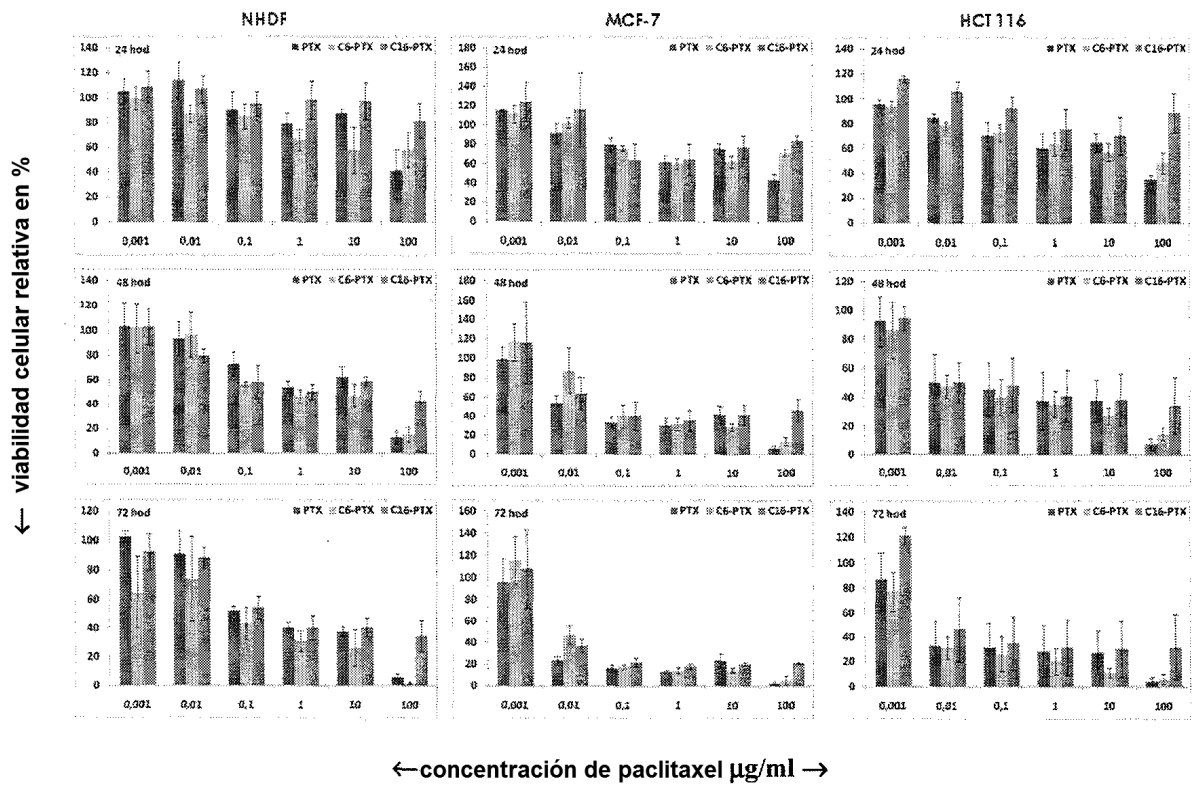
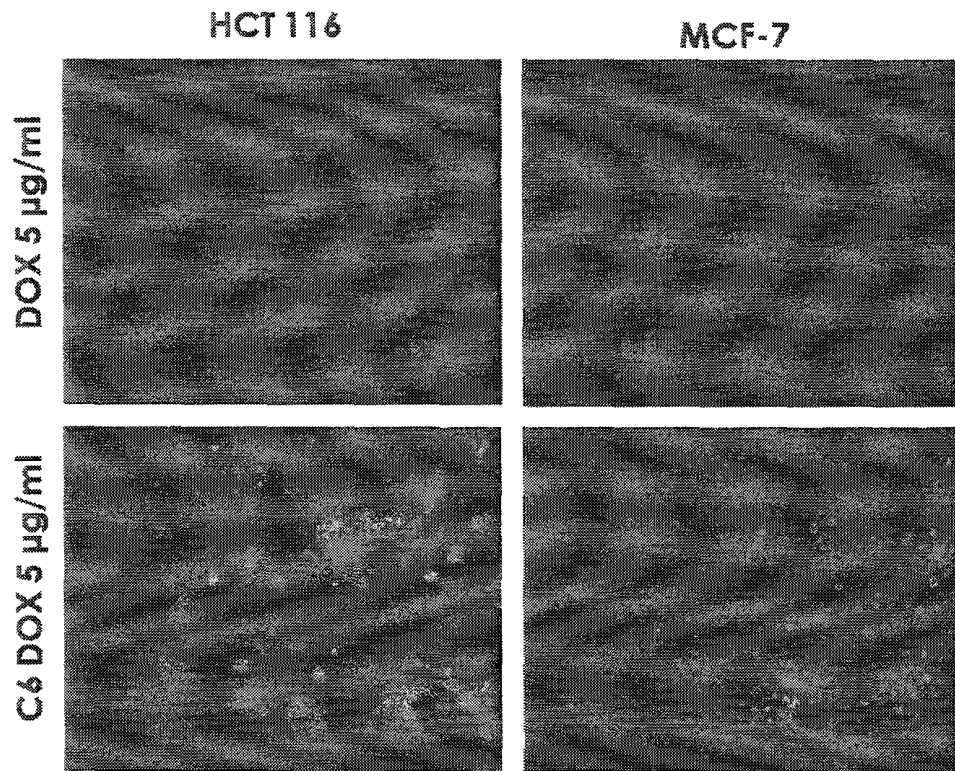
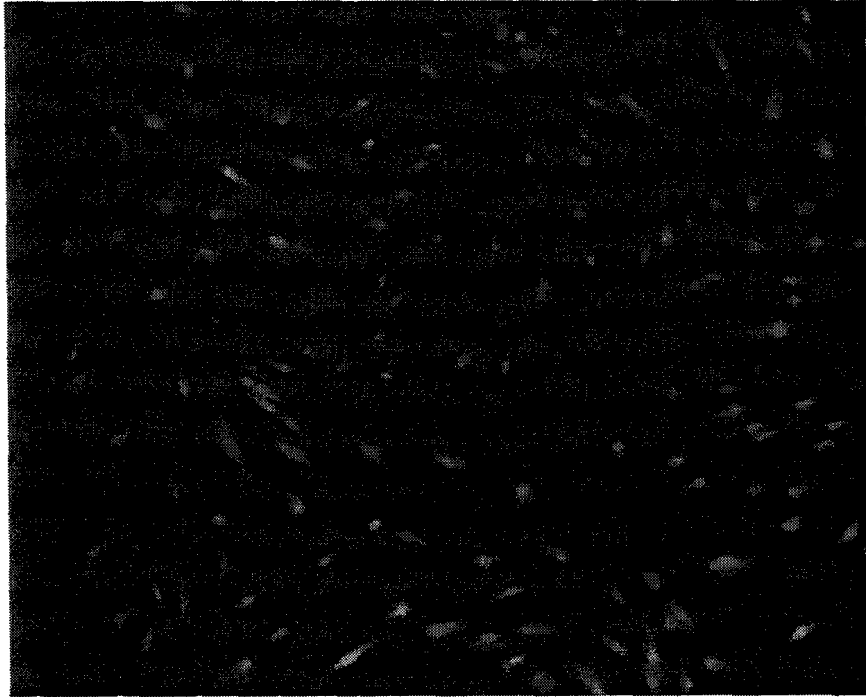


FIG. 4



**FIG.5**



**FIG. 6**

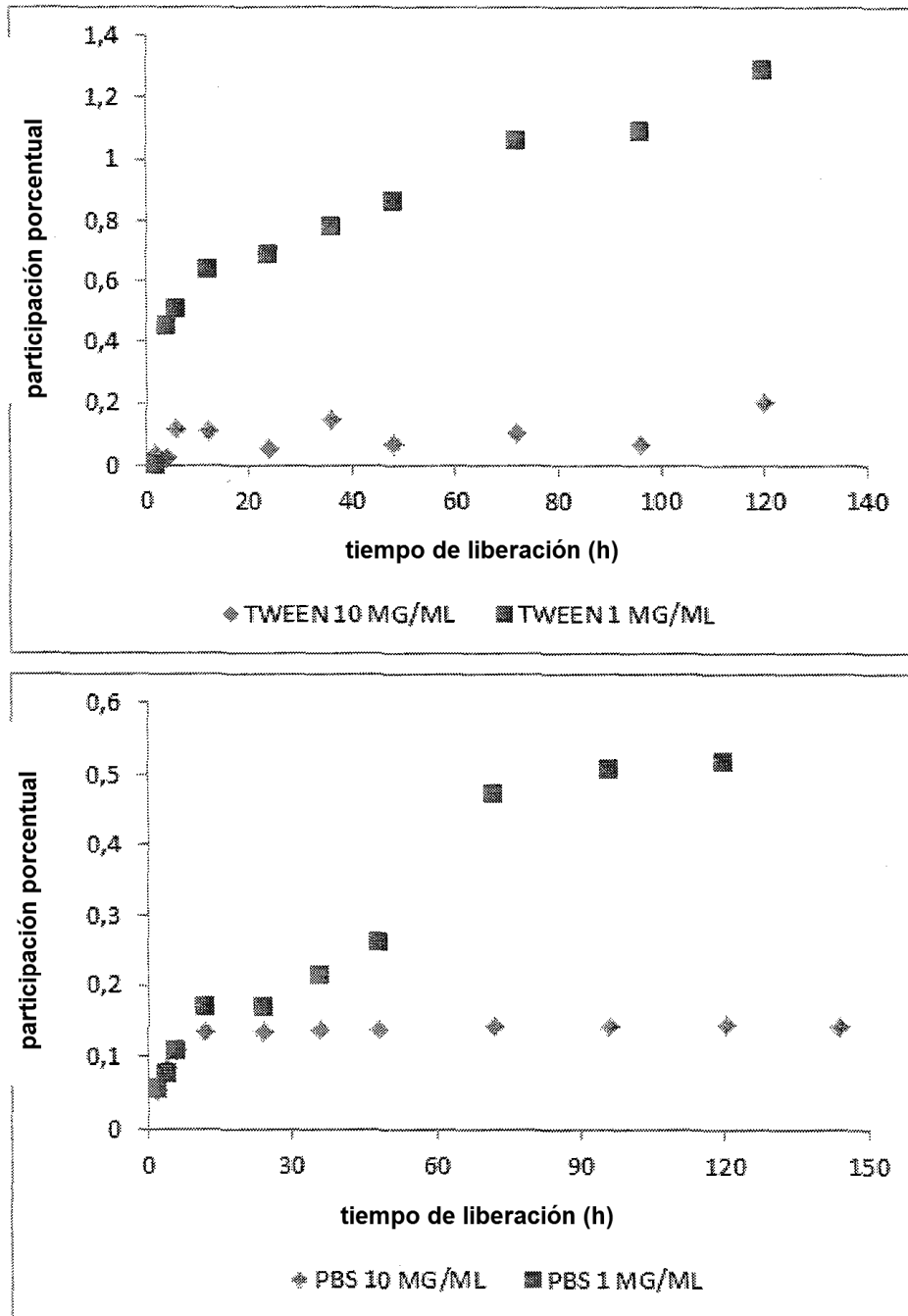
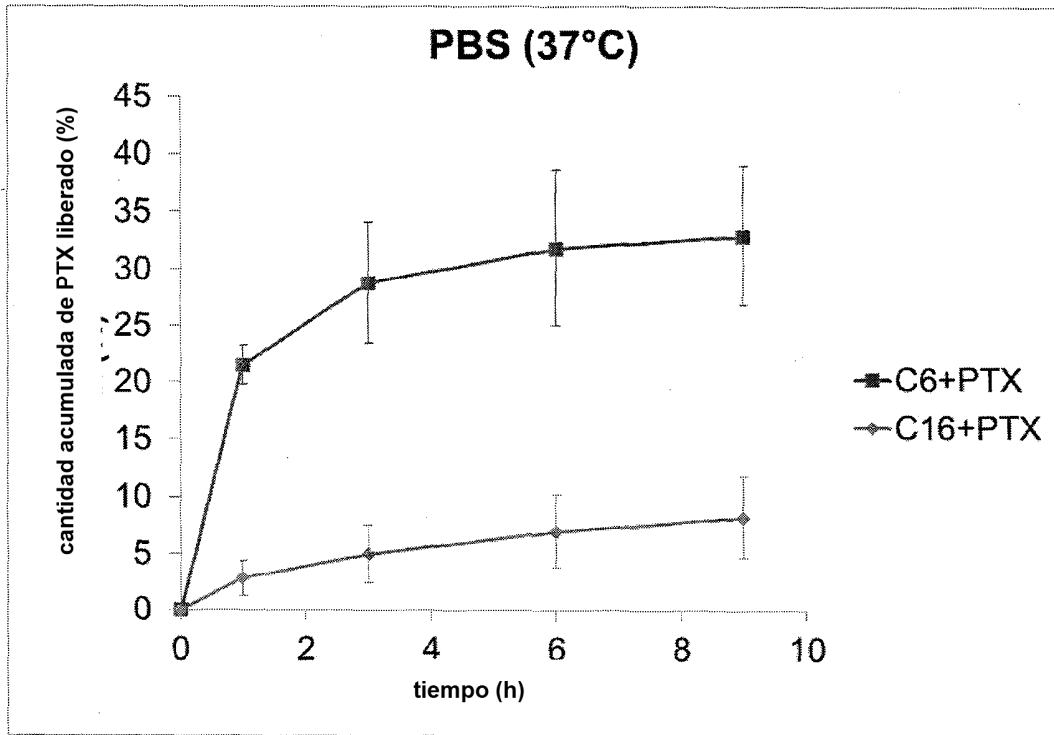
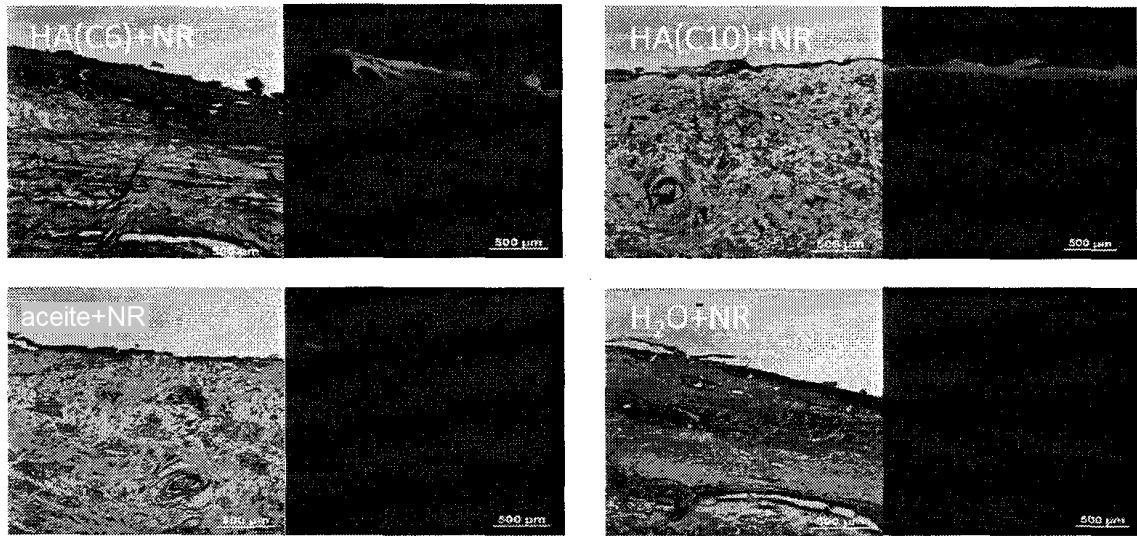


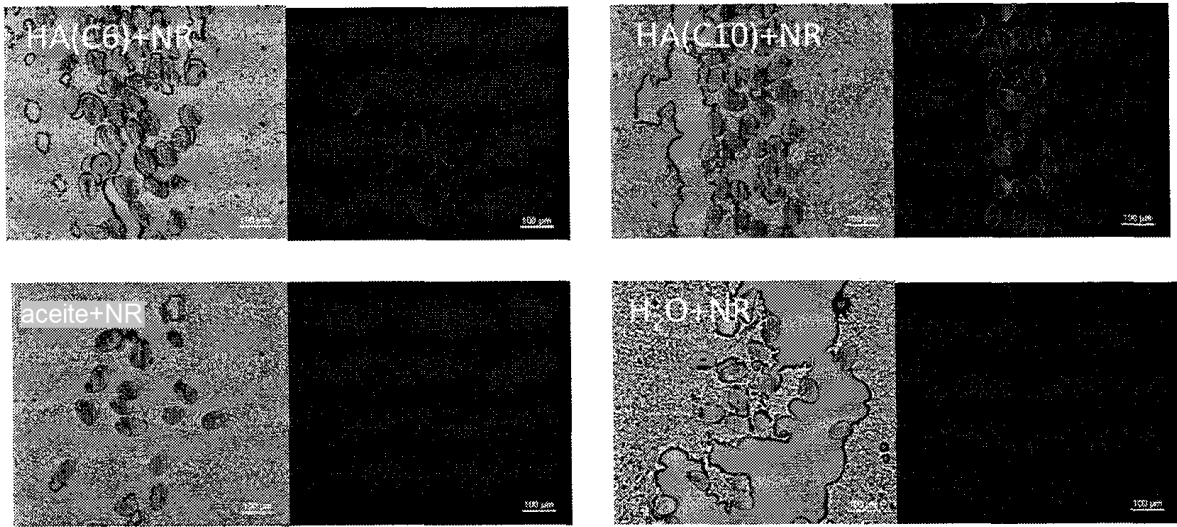
FIG. 7

**FIG. 8**

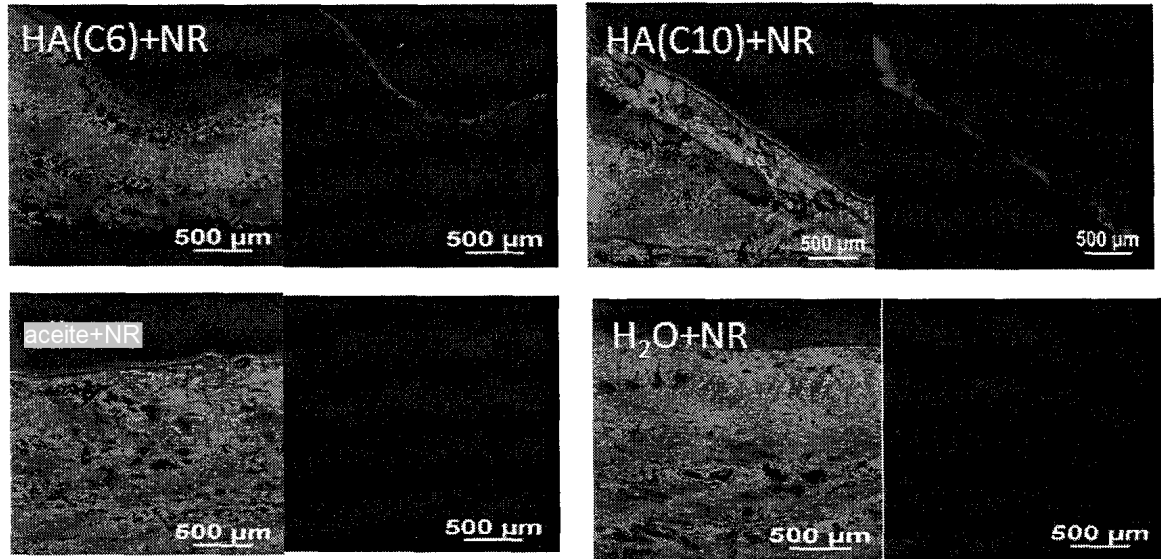


**FIG. 9**

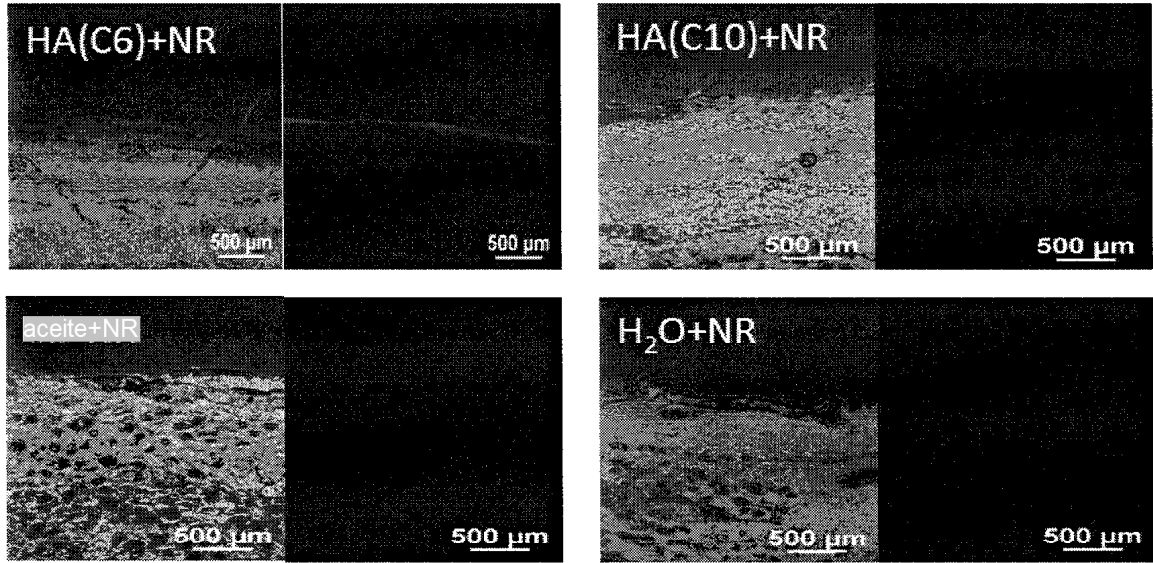




**FIG. 10**



**FIG. 11**



**FIG. 12**