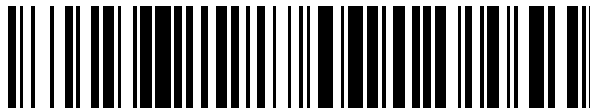


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 710 801**

51 Int. Cl.:

**A61K 47/61** (2007.01)

**A61K 31/728** (2006.01)

**C08B 37/08** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.03.2015 PCT/CZ2015/000018**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.09.2015 WO15135511**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.03.2015 E 15719591 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.01.2019 EP 3116514**

54 Título: **Conjugados de oligómero de ácido hialurónico o sal del mismo, procedimiento de preparación de los mismos y utilización de los mismos**

30 Prioridad:

**11.03.2014 CZ 20140150**

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

**26.04.2019**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**BUFFA, RADOVAN;  
BASARABOVA, IVANA;  
NESPOROVA, KRISTINA;  
SILOVA, TEREZA;  
KOTLAND, ONDREJ;  
SEDOVA, PETRA;  
HROMEK, LEOS y  
VELEBNY, VLADIMIR**

74 Agente/Representante:

**DURAN-CORRETJER, S.L.P**

ES 2 710 801 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

Conjugados de oligómero de ácido hialurónico o sal del mismo, procedimiento de preparación de los mismos y utilización de los mismos

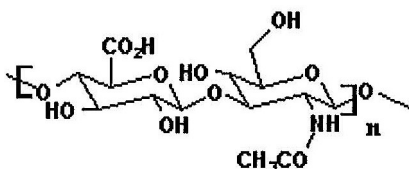
**Sector de la técnica**

La presente invención se refiere a conjugados de ácido hialurónico o una sal del mismo, al procedimiento de preparación de los mismos y a la utilización de los mismos.

Mediante dichos conjugados, es posible inmovilizar oligómeros de ácido hialurónico con la posibilidad de liberarlos en su forma original nativa.

**Estado de la técnica**

El ácido hialurónico es un glucosaminoglucano compuesto por dos ciclos de sacáridos repetitivos de ácido  $\beta$ -(1,3)-D-glucurónico y  $\beta$ -(1,4)-N-acetil-D-glucosamina.



Esquema 1: ácido hialurónico

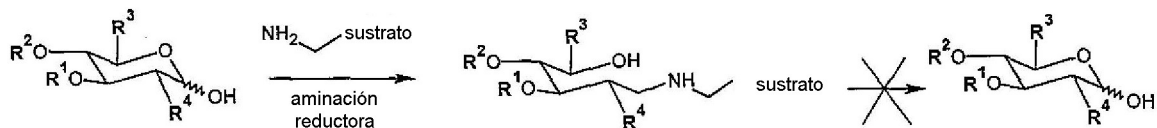
Se caracteriza por un alto peso molecular de  $5 \cdot 10^4$  a  $5 \cdot 10^6$  g·mol<sup>-1</sup>, que depende del procedimiento de aislamiento del mismo y del material inicial. Este polisacárido muy hidrófilo es soluble en agua en forma de una sal dentro del intervalo completo de pH. Forma una parte de los tejidos conectivos, piel, líquido sinovial de las articulaciones, desempeña un papel importante en un conjunto de procesos biológicos, tales como la hidratación, la organización de proteoglicanos, la diferenciación celular, la proliferación y la angiogénesis.

*Unión de oligómeros de HA*

Tal como se ha mencionado anteriormente, el ácido hialurónico nativo es un polisacárido lineal que se degrada en el organismo bastante rápido. Los primeros intentos convincentes de preparación de hialuronano con una estructura ramificada fueron descritos en 2008 por Toemmerase K. (documento WO 2008/014787). Se refiere a la unión del grupo amino de hialuronano desacetilado, que tiene un peso molecular más alto, con el centro anomérico terminal de oligómero de hialuronano mediante aminación reductora. Los autores de otro documento de patente, Hacker M., Saraf A., Mikos A.G., documento WO 2008/115799, procedieron de una manera similar en el caso de unir el centro anomérico terminal del oligómero de HA a polietilimina. A efectos de asegurar una unión fuerte, se utiliza la aminación reductora que convierte aminoglucósidos en aminas secundarias hidrolíticamente extremadamente estables. La reacción tiene lugar en un entorno ligeramente básico y a una temperatura elevada y se utiliza cianoborohidruro de sodio como agente reductor. Los conjugados resultantes se utilizaron para la encapsulación de ADN o células madre mesenquimatosas, en que se menciona solamente un hexámero como oligómero de ácido hialurónico. En el artículo Eur. J. Org. Chem. 2011, 5617-25, se dio a conocer otra posibilidad. En el mismo, se genera un grupo amino en la posición 6 de la parte glucosamina del oligómero de HA, cuyo grupo amino reacciona, a continuación, en condiciones suaves con ésteres de NHS de ácidos carboxílicos unidos a nanotubos de carbono. Xu (documento WO 2007/101243) da a conocer la unión del centro anomérico terminal de hialuronano, que tiene un peso molecular inferior, mediante un enlazador diamino o poliamino utilizando la aminación reductora. Los sustratos resultantes se utilizaron para la encapsulación de sustancias activas. Carter (documento US 2012/0277416) dio a conocer otra posibilidad, en la que los fosfolípidos se unieron al centro anomérico terminal del oligómero de HA. En la primera etapa, se preparó un derivado de un oligómero que tenía una amina en la posición 1 mediante aminación reductora, a continuación, se conjugó con un grupo carboxílico activo de un fosfolípido. Los conjugados resultantes mostraron una amplia gama de actividades biológicas. Siiskonen, en 2013, publicó un procedimiento similar de unión a un oligómero de HA que tenía un grupo amino en el extremo anomérico reducido, en el que se unió una 2-aminoacridina marcada. Dicho conjugado se utilizó para el estudio de la biodistribución de los fragmentos de hialuronano en el citosol.

Un inconveniente de los procedimientos mencionados anteriormente es el hecho de que permiten la formación de conjugados de oligómeros o polímeros de HA que no permiten su posterior liberación en forma nativa. La causa de esto es el hecho de que todos los procedimientos conocidos hasta ahora de unión de aminas al centro anomérico terminal están asociados con la reducción, es decir, con una modificación irreversible del ciclo terminal que se mantiene permanentemente abierto y no permite la liberación inversa del oligómero en forma nativa. La situación se

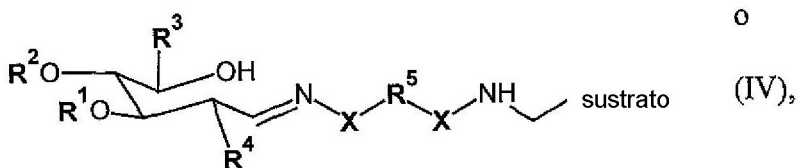
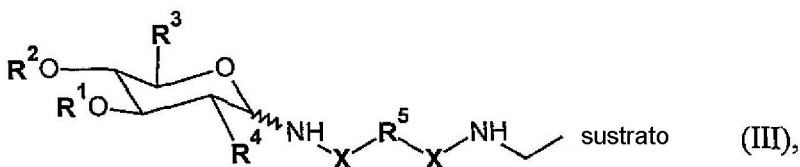
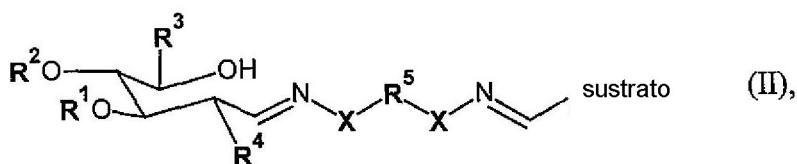
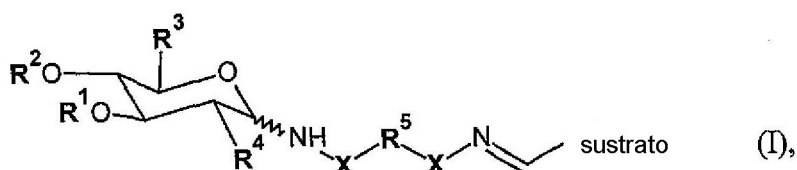
ilustra mediante el siguiente esquema 1:



5 **Objeto de la invención**

Los inconvenientes mencionados anteriormente se superan mediante los conjugados de oligómeros de HA de las fórmulas generales I, II, III o IV, según la presente invención, que permiten dicha liberación inversa de oligómeros de HA en forma nativa.

10 El objeto de la presente invención es el conjugado de un oligómero de ácido hialurónico o de una sal del mismo, según cualquiera de las formulas generales I, II, III o IV,



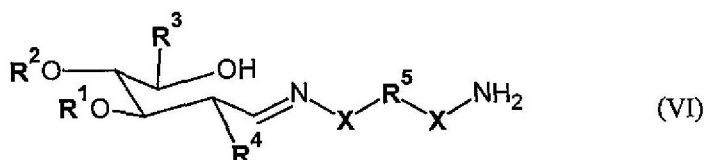
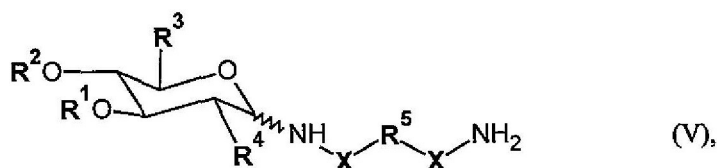
15 donde  
 R<sup>3</sup> es COOR<sup>6</sup> o CH<sub>2</sub>OH,  
 R<sup>4</sup> es OH o NHCOCH<sub>3</sub>,  
 R<sup>6</sup> es H<sup>+</sup> o se selecciona del grupo que comprende cualquiera de los iones de metales alcalinos o iones de metales alcalinotérreos, de manera preferente, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup> o Li<sup>+</sup>;  
 20 R<sup>5</sup> se selecciona del grupo que comprende alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>30</sub>, alquilarilo C<sub>1</sub>-C<sub>30</sub> o alquilheteroarilo C<sub>1</sub>-C<sub>30</sub>, que comprende, de manera opcional, uno o más heteroátomos, idénticos o diferentes, seleccionados del grupo que comprende N, O, S  
 X es O o un grupo NH;  
 25 en el caso en que R<sup>3</sup> es COOR<sup>6</sup>, entonces R<sup>4</sup> es OH, R<sup>1</sup> es H, R<sup>2</sup> es un residuo de oligómero de ácido hialurónico;  
 en el caso en que R<sup>3</sup> es CH<sub>2</sub>OH, entonces R<sup>4</sup> es NHCOCH<sub>3</sub>, R<sup>2</sup> es OH, R<sup>1</sup> es un residuo de oligómero de ácido hialurónico;  
 el sustrato es un polisacárido, de manera preferente, se selecciona del grupo que comprende ácido hialurónico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, que tiene el peso molecular dentro del intervalo de 10<sup>4</sup> a 10<sup>6</sup> g·mol<sup>-1</sup>, de manera preferente, 10<sup>5</sup> g·mol<sup>-1</sup>.

La estructura de los conjugados resultantes depende, en gran medida, del carácter del sustituto X. Si X es un puente de oxígeno -O-, está presente de forma significativa una forma imino. Si X es un puente de nitrógeno -NH-, la forma

dominante es un amino que tiene la configuración beta.

El residuo de oligómero de ácido hialurónico en el conjugado, según la presente invención, tiene de 1 a 17 ciclos de sacáridos, en el que el ciclo de sacárido se selecciona del grupo que comprende ácido  $\beta$ -(1,3)-D-glucurónico y  $\beta$ -(1,4)-N-acetil-D-glucosamina.

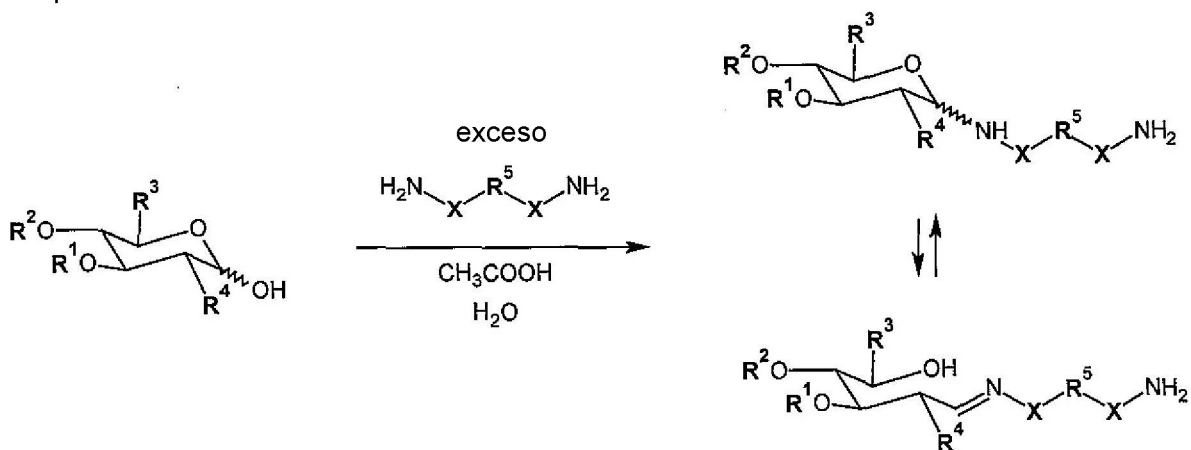
Según otra realización, los conjugados de oligómero de ácido hialurónico de las fórmulas generales I y II definidas anteriormente, se pueden preparar mediante el procedimiento de la presente invención, el objeto del cual es que en la primera etapa, un oligómero de ácido hialurónico reacciona en su centro anomérico terminal en la posición 1 con un exceso de un enlazador diamino de la fórmula general  $H_2N-XR^5-X-NH_2$ , donde  $R^5$  se selecciona del grupo que comprende alquilo  $C_1-C_{30}$ , alquilarilo  $C_1-C_{30}$  o alquilheteroarilo  $C_1-C_{30}$ , que comprende, de manera opcional, uno o más heteroátomos idénticos o diferentes seleccionados del grupo que comprende N, O, S y X es O o un grupo NH; en un entorno ligeramente ácido a un pH dentro del intervalo de 3 a 6,99, de manera preferente, a un pH dentro del intervalo de 3 a 6, de manera más preferente, de 5 a 6, después de lo cual, se aíslan los conjugados de oligómero de ácido hialurónico y enlazador diamino de las fórmulas generales V y VI



donde los sustitutos de  $R^1$  a  $R^6$  son como se definen anteriormente.

El procedimiento de la primera etapa de la reacción se ilustra mediante el esquema 2 a continuación.

Esquema 2:



La reacción tiene lugar con un exceso de enlazador diamino que estadísticamente elimina de manera significativa la modificación en ambos extremos del enlazador.

De manera sorprendente, se descubrió que esta reacción tiene lugar sólo en presencia de una cierta cantidad de un ácido débil y agua. Si las condiciones fueran neutras o básicas, no se observaría ninguna reacción satisfactoria. Si estuviera presente un ácido fuerte, tal como HCl o  $H_2SO_4$ , se produciría la degradación de los oligómeros de HA.

El entorno ligeramente ácido que tiene el pH dentro del intervalo de 3 a 6,99 se consigue mediante una adición de un ácido carboxílico al medio de reacción, de manera preferente, ácido acético, ácido propanoico o ácido láctico, de manera más preferente, ácido acético.

La cantidad del ácido está dentro del intervalo de 5 a 30 equivalentes, de manera preferente, dentro del intervalo de

10 a 15 equivalentes, con respecto a la cantidad molar del disacárido de ácido hialurónico como sustrato.

Además, la cantidad del enlazador diamino está dentro del intervalo de 5 a 30 equivalentes, de manera preferente, es de 10 equivalentes, con respecto a la cantidad molar del disacárido de ácido hialurónico como sustrato.

5 Además, la primera etapa prosigue a la temperatura de 10°C a 40°C, de manera preferente, a la temperatura de 20°C, durante de 24 a 150 horas, de manera preferente, durante de 60 a 80 horas.

10 A continuación, tiene lugar la segunda etapa de la reacción, en la que se hacen reaccionar los conjugados del oligómero de ácido hialurónico y enlazador diamino de las fórmulas generales V y VI, tal como se han definido anteriormente, como mínimo, con un grupo aldehídico del sustrato en agua o en una mezcla de agua y un disolvente orgánico miscible en agua que se selecciona del grupo que comprende etanol, isopropanol, metanol o dimetilsulfóxido.

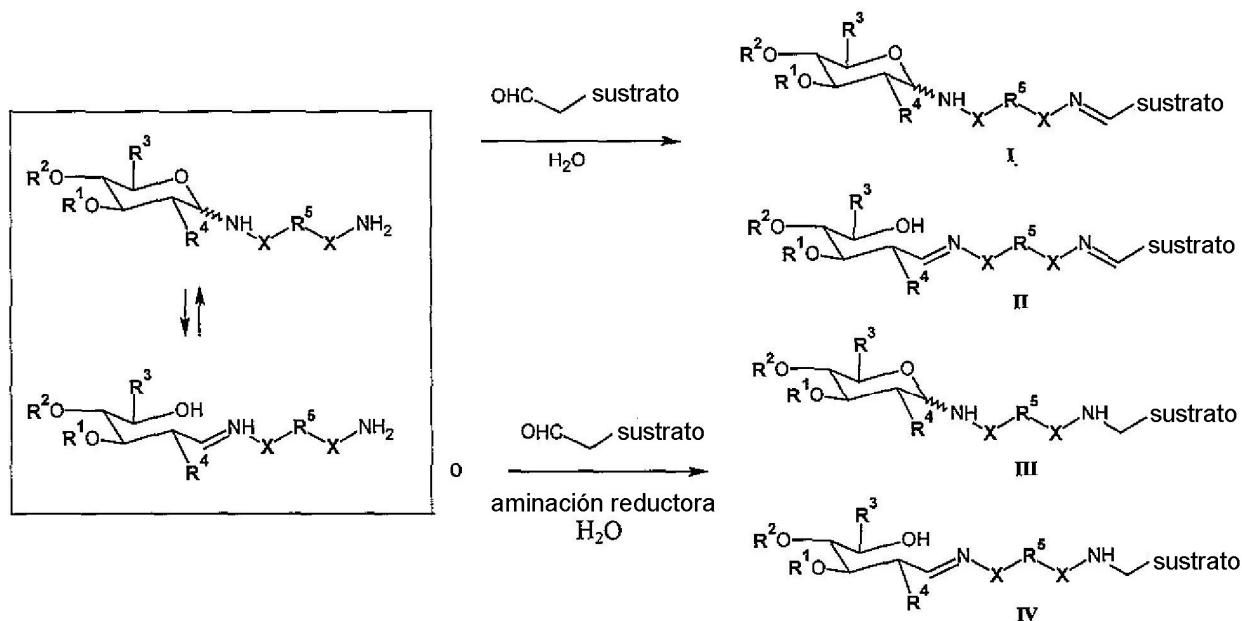
15 Además, la segunda etapa se lleva a cabo también a la temperatura de 10°C a 40°C, de manera preferente, a 20°C, durante 24 a 150 horas, de manera preferente, de 60 a 80 horas.

20 Según otra realización preferente del procedimiento de la presente invención, los conjugados del oligómero de ácido hialurónico y enlazador diamino, según las fórmulas generales V y VI, tal como se han definido anteriormente, se hacen reaccionar, según el procedimiento y las condiciones indicadas anteriormente, como mínimo, con un grupo aldehídico del sustrato en presencia de un agente reductor que se selecciona, de manera preferente, del grupo que comprende cianoborohidruro (NaBH<sub>3</sub>CN) o picolina borano, para formar conjugados de las fórmulas generales III y IV, donde el sustrato está unido mediante un enlace hidrolíticamente muy fuerte.

25 La cantidad del agente reductor está dentro del intervalo de 0,1 a 5 equivalentes, de manera preferente, 3 equivalentes, con respecto a la cantidad molar del disacárido de ácido hialurónico.

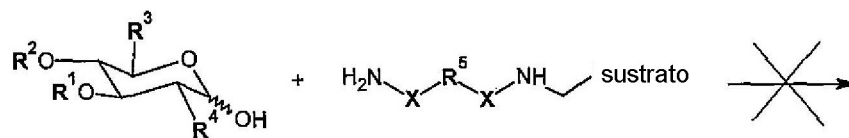
Ambas posibilidades descritas anteriormente de unión del sustrato mediante aminación o aminación reductora se muestran en el esquema 3

30 Esquema 3



35 Es sorprendente que durante la aminación reductora, donde se forman los conjugados de las fórmulas generales III y IV (véase el esquema anterior), la reducción tiene lugar de manera sustancial sólo en el sustrato de unión-enlazador, lo cual es debido a las condiciones de compromiso, tales como la temperatura de reacción, el tiempo, la cantidad del agente reductor, y no se ha observado reducción del oligómero de unión-enlazador, que tiene básicamente también el carácter de una imina reductora.

40 Los esfuerzos por unir el centro anomérico terminal del oligómero de HA con el conjugado sustrato-enlazador no han tenido éxito, ni siquiera a temperaturas más altas cuando tenía lugar la escisión por desprendimiento de oligómeros de HA.

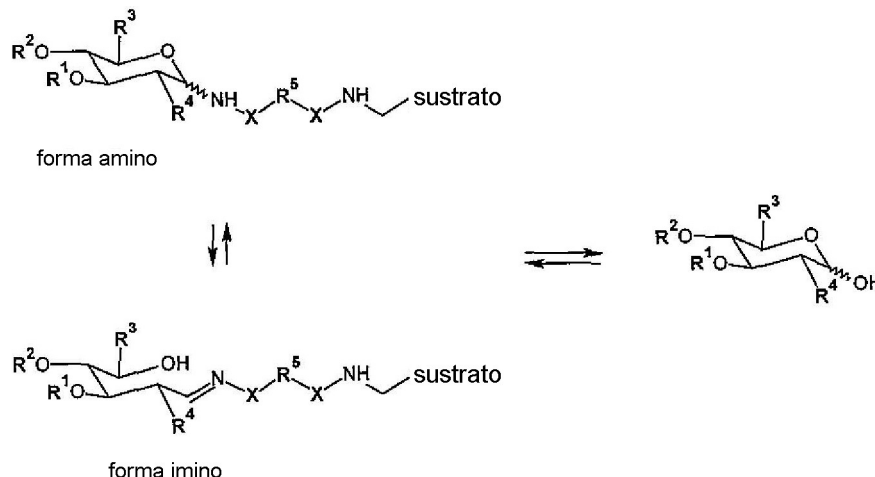


por lo tanto, al preparar el conjugado final es necesario unir primero el enlazador bifuncional al oligómero.

5 A partir de los hechos mencionados anteriormente, se deduce que cuando se prepararon los conjugados, según la presente invención, era necesario encontrar las condiciones de reacción, que finalmente se encontraron en un intervalo relativamente estrecho (pH en una región de ácido débil, una reducción cuidadosa,...). Los conjugados  
 10 finales de las fórmulas generales I, II, III, IV permiten, en comparación con las soluciones conocidas hasta ahora, liberar oligómeros de hialuronano en su forma nativa original, lo cual es importante con respecto a su actividad biológica. La condición necesaria es que el sustrato contenga grupos aldehídicos, lo cual puede lograrse muy fácilmente mediante una modificación química, tal como mediante oxidación, en el caso de polisacáridos que contienen grupos OH.

15 La realización de las soluciones descritas en la presente invención no es complicada tecnológicamente y no requiere la utilización de productos químicos caros, disolventes o procedimientos de aislamiento.

Tal como ya se ha descrito anteriormente, el conjugado, según la presente invención, permite la liberación:



20 La posibilidad de la inmovilización reversible es muy importante en casos donde es necesario mantener la estructura original de oligómeros por su actividad biológica o biocompatibilidad. Es conocido que algunos tipos de oligómeros de HA muestran la actividad biológica, por ejemplo, a las células cancerosas. Los sistemas preparados mostraron una actividad biológica mejorada frente a líneas seleccionadas de células cancerosas.

Según otra realización de la presente invención, los conjugados de las fórmulas generales I a IV, tal como se han definido anteriormente, se utilizan, de manera preferente, como portadores de oligómeros biológicamente activos en farmacia y biomedicina, o es posible utilizarlos para la preparación de materiales que tienen un efecto anticanceroso.

30 La expresión "sal farmacéuticamente aceptable", tal como se utiliza en el presente documento, significa sales de conjugados de HA, según la presente invención, que son seguras y eficaces para una utilización *in vivo* y que tienen la actividad biológica deseada. Entre las sales farmacéuticamente aceptables se incluyen, de manera preferente, iones de metales alcalinos o metales alcalinotérreos, de manera más preferente, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Mg<sup>+</sup> o Li<sup>+</sup>.

35 El término "polisacárido" significa un polisacárido, tal como ácido hialurónico, una sal farmacéutica del mismo, almidón, glucógeno, celulosa, etc., que contienen, como mínimo, un grupo aldehídico después de la oxidación de sus grupos OH.

40 El término "conjugado" significa un compuesto que se forma mediante la unión de dos o más compuestos químicos mediante un enlace covalente. El conjugado, según la presente invención, se forma mediante la unión de un oligómero de HA y un enlazador, lo cual da lugar a un conjugado de oligómero de HA y enlazador y, a continuación, mediante la unión del mismo a un sustrato, es decir, un polisacárido, de manera preferente, ácido hialurónico, mientras se forma el conjugado oligómero de HA-enlazador-sustrato.

45 La expresión "oligómero de ácido hialurónico" significa un oligómero de ácido hialurónico que contiene ciclos de

sacáridos repetidos de forma alternativa de ácido  $\beta$ -(1,3)-D-glucurónico y  $\beta$ -(1,4)-N-acetil-D-glucosamina. De manera preferente, el número de ciclos de sacáridos es de 2 a 18. En la presente invención, el número de estos ciclos es de entre 1 y 17.

5 La expresión "el residuo de oligómero de ácido hialurónico" significa, como mínimo, un ciclo de sacárido de oligómero de ácido hialurónico, que es  $\beta$ -(1,4)-N-acetil-D-glucosamina o ácido  $\beta$ -(1,3)-D-glucurónico.

En caso de que el ciclo de sacárido del extremo unido al enlazador a través de su centro anomérico sea ácido  $\beta$ -(1,3)-D-glucurónico, dicho ciclo de sacárido es  $\beta$ -(1,4)-N-acetil-D-glucosamina.

10 En caso de que el ciclo de sacárido del extremo unido al enlazador a través de su centro anomérico sea  $\beta$ -(1,4)-N-acetil-D-glucosamina, dicho ciclo de sacárido es ácido  $\beta$ -(1,3)-D-glucurónico.

15 En caso de que el residuo de oligómero de ácido hialurónico comprenda más de un ciclo de sacárido, los ciclos de sacárido de ácido  $\beta$ -(1,3)-D-glucurónico y  $\beta$ -(1,4)-N-acetil-D-glucosamina se repiten de forma alternativa.

El término "exceso" significa una cantidad de enlazador diamino que es mayor que un equivalente con respecto a la cantidad molar de disacárido de ácido hialurónico como sustrato.

20 La expresión "se aísla" significa que después de terminar la reacción, la mezcla de reacción se neutraliza y el producto de reacción precipitado se separa por filtración y se seca.

#### **Descripción breve de los dibujos**

25 La figura 1 muestra la evolución de la inhibición del crecimiento de las células cancerígenas inmortalizadas en porcentajes del control no afectado.

#### **Ejemplos**

30 El término equivalente (eq) utilizado en el presente documento se refiere a un disacárido de ácido hialurónico, si no se indica lo contrario. Los porcentajes pretenden ser porcentajes en peso, si no se indica lo contrario.

El peso molecular del ácido hialurónico inicial (fuente: CPN spol. s r.o., Dolní Dobrouč, Rep. Checa) es un peso molecular promedio en peso dentro del intervalo de  $10^4$  a  $10^6$  g·mol<sup>-1</sup> y se midió mediante SEC-MALLS.

35 Los oligómeros de ácido hialurónico que comprenden de 2 a 18 ciclos de sacáridos se prepararon mediante la degradación enzimática del polímero que tiene un peso molecular más alto.

40 DS = grado de sustitución = 100% \* (cantidad molar del sustituto unido o disacárido modificado)/(cantidad molar de todos los disacáridos)

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

##### Oxidación de ácido hialurónico

45 Se añadió de forma gradual una solución acuosa de NaClO (0,5 eq) a una solución acuosa al uno por ciento de hialuronano (1 g, 200 kDa), que contenía NaCl al 1%, TEMPO (0,01 eq) y NaHCO<sub>3</sub> (5 eq.) bajo atmósfera de nitrógeno. La mezcla se agitó durante 12 horas a la temperatura de 0°C, a continuación se añadieron 0,1 g de etanol y la mezcla se agitó durante otra 1 hora. A continuación, la solución resultante se diluyó con agua destilada hasta el

50 0,2% y se dializó frente a 5 litros de la mezcla (NaCl al 0,1%, NaHCO<sub>3</sub> al 0,1%) 3 veces (una vez al día) y frente a 5 litros de agua destilada 7 veces (dos veces al día). A continuación, la solución resultante se evaporó y se analizó. DS 10% (determinado a partir de RMN)

<sup>1</sup>H RMN (D<sub>2</sub>O)  $\delta$  5,26 (s, 1H, polímero-CH(OH)<sub>2</sub>)

HSQC (D<sub>2</sub>O) señal de cruz 5,26 ppm (<sup>1</sup>H) - 90 ppm (<sup>13</sup>C) (polímero-CH(OH)<sub>2</sub>)

#### **Ejemplo 2 Preparación de un conjugado de octasacárido de HA (HA-8) con adipato de dihidrazida**

55 Se disolvió octasacárido de HA en agua en una concentración del 5%. A continuación, se añadieron adipato de dihidrazida (6 equivalentes) y ácido acético (15 equivalentes) y la mezcla se agitó a la temperatura de 20°C durante 72 horas a pH 4. La mezcla resultante se neutralizó con NaHCO<sub>3</sub> y se precipitó repetidamente mediante alcohol isopropílico. El producto sólido final se secó al vacío.

<sup>1</sup>H RMN (D<sub>2</sub>O)  $\delta$  4,24 (d, J = 9,7 Hz, 1H, -O-CH-NH-beta), no hay señal del centro anomérico terminal inicial (-O-CH-OH alfa)

**Ejemplo 3 Preparación de un conjugado de trisacárido de HA (HA-3) con adipato de dihidrazida**

Se disolvió trisacárido de HA (que termina con ácido glucurónico) en agua a la concentración del 7%. A continuación, se añadieron adipato de dihidrazida (25 equivalentes) y ácido acético (25 equivalentes) y la mezcla se agitó a la temperatura de 10°C durante 150 horas a pH 6. La mezcla resultante se neutralizó mediante NaHCO<sub>3</sub> y se precipitó repetidamente mediante alcohol isopropílico. El producto sólido final se secó al vacío.

<sup>1</sup>H RMN (D<sub>2</sub>O) δ 4,11 (d, J = 8,8 Hz, 1H, -O-CH-NH-beta), no hay señal del centro anomérico terminal inicial (-O-CH-OH alfa)

**Ejemplo 4 Preparación del conjugado de octadecasacárido de HA (HA-18) con adipato de dihidrazida**

Se disolvió octadecasacárido de HA (que termina con glucosamina) en agua a la concentración del 5%. A continuación, se añadieron adipato de dihidrazida (15 equivalentes) y ácido acético (20 equivalentes) y la mezcla se agitó a la temperatura de 40°C durante 24 horas a pH 5. La mezcla resultante se neutralizó mediante NaHCO<sub>3</sub> y se precipitó repetidamente mediante alcohol isopropílico. El producto sólido final se secó al vacío.

<sup>1</sup>H RMN (D<sub>2</sub>O) δ 4,10 (d, J = 8,7 Hz, 1H, -O-CH-NH-beta).

**Ejemplo 5 Preparación del conjugado de decaacárido de HA (HA-10) con O,O'-1,3-propano diilbishidroxil amina**

Se disolvió decaacárido de HA en agua a la concentración del 3%. A continuación, se añadieron O,O'-1,3-propano diilbishidroxil amina (5 equivalentes) y ácido láctico (5 equivalentes) y la mezcla se agitó a la temperatura de 20°C durante 100 horas a pH 6. La mezcla resultante se neutralizó mediante NaHCO<sub>3</sub> y se precipitó repetidamente mediante alcohol isopropílico. El producto sólido final se secó al vacío.

<sup>1</sup>H RMN (D<sub>2</sub>O) δ 7,53 (d, J = 5,3 Hz, 1H, -O-CH=N- isómero Z), δ 6,89 (d, J = 6,0 Hz, 1H, -O-CH=N- isómero E)

**Ejemplo 6 Preparación del conjugado de tetrasacárido de HA (HA-4) con tereftaloil dihidrazida**

Se disolvió tetrasacárido de HA en agua a la concentración del 3%. A continuación, se añadieron tereftaloil dihidrazida (5 equivalentes) y ácido propanoico (6 equivalentes) y la mezcla se agitó a la temperatura de 20°C durante 100 horas a pH 6. La mezcla resultante se neutralizó mediante NaHCO<sub>3</sub> y se precipitó repetidamente mediante alcohol isopropílico. El producto sólido final se secó al vacío.

<sup>1</sup>H RMN (D<sub>2</sub>O) δ 4,12 (d, J = 8,8 Hz, 1H, -O-CH-NH-beta),

**Ejemplo 7 Unión del conjugado de HA-8-adipato de dihidrazida (ejemplo 2) a hialuronano oxidado en la posición 6 a un aldehído (ejemplo 1) mediante aminación reductora**

Se disolvieron 0,01 g del conjugado, preparado según el ejemplo 2, en agua a la concentración del 2%. A continuación, se añadieron 0,01 g del derivado de ácido hialurónico que contenía un aldehído (peso molecular de 6 x 10<sup>5</sup> g·mol<sup>-1</sup>) y 5 equivalentes de picolina borano. La mezcla se agitó a la temperatura de 20°C durante 24 horas. La mezcla resultante se precipitó mediante alcohol isopropílico. El producto sólido final se secó al vacío.

<sup>1</sup>H RMN (D<sub>2</sub>O) δ 2,85, 3,12 (m, m par diastereotópico, 2H, -NH-CH<sub>2</sub>-polímero)

DOSY RMN (D<sub>2</sub>O) δ 4,24 (d, J = 9,7 Hz, 1H, -O-CH-NH- beta) tiene la misma movilidad que el ácido hialurónico que tiene un peso molecular más alto y señales de hidrógenos diastereotópicos de 2,85 a 3,12.

**Ejemplo 8 Unión del conjugado de HA-3-adipato de dihidrazida (ejemplo 3) a hialuronano oxidado en la posición 6 a un aldehído (ejemplo 1) mediante aminación reductora**

Se disolvieron 0,01 g del conjugado, preparado según el ejemplo 3, en agua a la concentración del 2%. A continuación, se añadieron 0,01 g del derivado de ácido hialurónico que contenía un aldehído (peso molecular de 2 x 10<sup>4</sup> g·mol<sup>-1</sup>) y 0,3 equivalentes de cianoborohidruro de sodio. La mezcla se agitó a la temperatura de 10°C durante 72 horas. La mezcla resultante se precipitó mediante alcohol isopropílico. El producto sólido final se secó al vacío.

<sup>1</sup>H RMN (D<sub>2</sub>O) δ 2,89, 3,04 (m, m par diastereotópico, 2H, -NH-CH<sub>2</sub>-polímero)

DOSY RMN (D<sub>2</sub>O) δ 4,11 (d, J = 8,8 Hz, 1H, -O-CH-NH- beta) tiene la misma movilidad que el ácido hialurónico que tiene un peso molecular más alto y señales de hidrógenos diastereotópicos de 2,89 a 3,04.

**Ejemplo 9 Unión del conjugado de HA-8-adipato de dihidrazida (ejemplo 2) a hialuronano oxidado en la posición 6 a un aldehído (ejemplo 1) sin reducción**

Se disolvieron 0,1 g del conjugado, preparado según el ejemplo 2, en una mezcla de agua/DMSO en la proporción de 1/1 a la concentración del 2%. A continuación, se añadieron 0,1 g del derivado de ácido hialurónico que contenía un aldehído (peso molecular de 2 x 10<sup>4</sup> g·mol<sup>-1</sup>). La mezcla se agitó a la temperatura de 20°C durante 72 horas. La mezcla resultante se precipitó mediante alcohol isopropílico. El producto sólido final se secó al vacío.

<sup>1</sup>H RMN (D<sub>2</sub>O) δ 7,48 (m, 1H, -N=CH-polímero)

DOSY RMN (D<sub>2</sub>O) δ 4,24 (d, J = 9,7 Hz, 1H, -O-CH-NH-beta) tiene la misma movilidad que el ácido hialurónico que



tiene un peso molecular más alto y la señal de 7,48.

**Ejemplo 10 Unión del conjugado de HA-18-adipato de dihidrazida (ejemplo 4) a hialuronano oxidado en la posición 6 a un aldehído (ejemplo 1) sin reducción**

5 Se disolvieron 0,1 g del conjugado, preparado según el ejemplo 4, en agua a la concentración del 2%. A continuación, se añadieron 0,1 g del derivado de ácido hialurónico que contenía un aldehído (peso molecular de  $2 \times 10^4 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ). La mezcla se agitó a la temperatura de 10°C durante 100 horas. La mezcla resultante se precipitó mediante alcohol isopropílico. El producto sólido final se secó al vacío.

10  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  7,47 (m, 1H,  $-\text{N}=\text{CH}$ -polímero)  
DOSY RMN ( $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  4,25 (d, J = 9,7 Hz, 1H,  $-\text{O}-\text{CH}-\text{NH}$ -beta) tiene la misma movilidad que el ácido hialurónico que tiene un peso molecular más alto y la señal de 7,47.

15 **Ejemplo 11 Unión del conjugado de HA-10-O,O'-1,3-propano diilbishidroxil amina (ejemplo 5) a hialuronano oxidado en la posición 6 a un aldehído (ejemplo 1) sin reducción**

Se disolvieron 0,01 g del conjugado, preparado según el ejemplo 5, en agua a la concentración del 2%. A continuación, se añadieron 0,01 g del derivado de ácido hialurónico que contenía un aldehído (peso molecular de  $2 \times 10^4 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ). La mezcla se agitó a la temperatura de 20°C durante 48 horas. La mezcla resultante se precipitó mediante alcohol isopropílico. El producto sólido final se secó al vacío.

20 DOSY RMN ( $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  7,53 (d, J = 5,3 Hz, 1H,  $-\text{O}-\text{CH}=\text{N}$ - isómero Z),  $\delta$  6,89 (d, J = 6,0 Hz, 1H,  $-\text{O}-\text{CH}=\text{N}$ - isómero E) tienen la misma movilidad que el ácido hialurónico que tiene un peso molecular más alto.

25 **Ejemplo 12 Ensayo biológico del conjugado preparado según el ejemplo 8**

Determinación de la viabilidad de la línea A2058 después del tratamiento con el conjugado preparado según el ejemplo 8:

30 Se sembró la línea de células cultivadas en condiciones estándar (medio DMEM con 10% de FBS, 37°C, 5% de  $\text{CO}_2$ ) en 4 paneles de cultivo de 96 pocillos a la densidad de 5.000 células por pocillo y se incubó en 200  $\mu\text{l}$  del medio durante 24 horas. A continuación, el medio de cultivo se intercambió por un medio fresco que contenía el conjugado (ejemplo 8) en concentraciones de 1.000, 100 y 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . El medio para las células de control se intercambió por uno nuevo sin el conjugado. Inmediatamente después del tratamiento, se midió la viabilidad celular en el primer panel mediante el procedimiento MTT. En resumen, se añadieron 20  $\mu\text{l}$  de la solución MTT (5 mg/ml) a las células y juntas se incubaron durante 2,5 horas en la oscuridad a 37°C. Después de la incubación, el medio de cultivo se aspiró y la monocapa de células se lisó mediante una mezcla de DMSO e isopropanol (1:1) con Triton X-100 al 10%. Se midió el color resultante en pocillos individuales de panel mediante un espectrofotómetro de placas (absorbancia a 570 nm con la corrección a 690 nm). Esta medición se repitió en los otros paneles, así como cada 24 horas. La viabilidad final se calculó como la proporción de la absorbancia de la muestra en un punto de tiempo determinado y a tiempo T0.

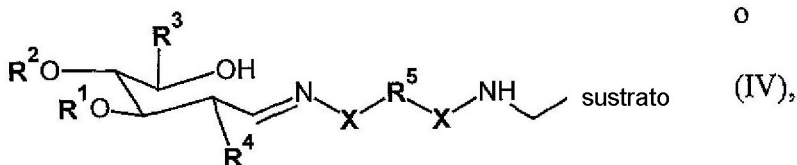
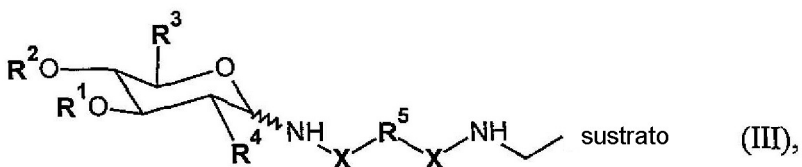
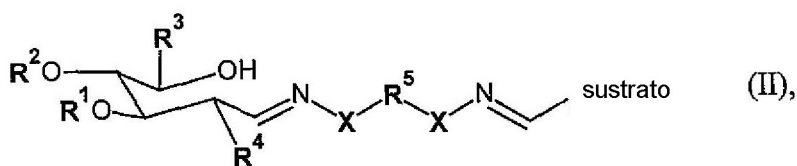
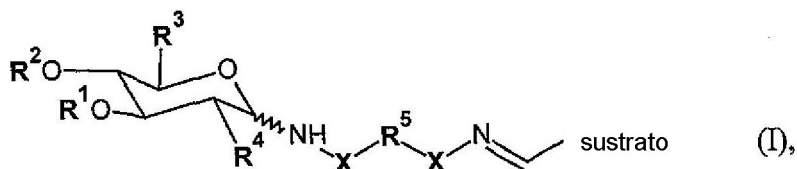
A2058 es una línea celular inmortalizada derivada del melanoma humano, es muy invasiva y por esa razón, a menudo, se utiliza como modelo de la tumorigénesis y metástasis.

45 Los resultados de la inhibición del crecimiento celular en porcentajes se muestran en la figura 1, en la que está claro que la inhibición del crecimiento celular aumenta exponencialmente con el tiempo debido a la influencia del conjugado, según la presente invención.

## REIVINDICACIONES

1. Conjugado de un oligómero de ácido hialurónico o una sal del mismo, según cualquiera de las fórmulas generales I, II, III o IV,

5



donde

R<sup>3</sup> es COOR<sup>6</sup> o CH<sub>2</sub>OH,

R<sup>4</sup> es OH o NHCOCH<sub>3</sub>,

R<sup>6</sup> es H<sup>+</sup> o se selecciona del grupo que comprende cualquiera de los iones de metales alcalinos o metales alcalinotérreos, de manera preferente, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup> o Li<sup>+</sup>;

R<sup>5</sup> se selecciona del grupo que comprende alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>30</sub>, alquilarilo C<sub>1</sub>-C<sub>30</sub> o alquilheteroarilo C<sub>1</sub>-C<sub>30</sub>, que comprende, de manera opcional, uno o más heteroátomos, idénticos o diferentes, seleccionados del grupo que comprende N, O, S;

X es O o un grupo NH;

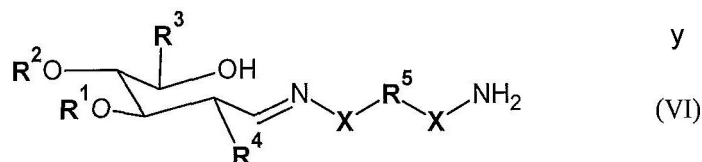
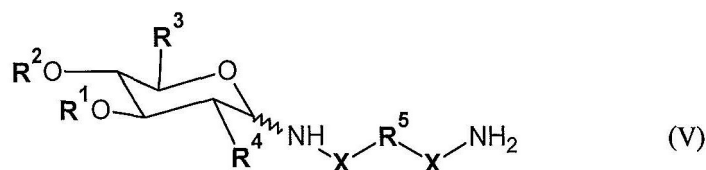
en el caso en que R<sup>3</sup> es COOR<sup>6</sup>, R<sup>4</sup> es OH, R<sup>1</sup> es H, R<sup>2</sup> es un residuo de oligómero de ácido hialurónico;

en el caso en que R<sup>3</sup> es CH<sub>2</sub>OH, R<sup>4</sup> es NHCOCH<sub>3</sub>, R<sup>2</sup> es OH, R<sup>1</sup> es un residuo de oligómero de ácido hialurónico; el residuo de oligómero de ácido hialurónico comprende de 1 a 17 ciclos de sacáridos, en el que el ciclo de sacárido se selecciona del grupo que comprende ácido β-(1,3)-D-glucurónico y β-(1,4)-N-acetil-D-glucosamina; el sustrato es un polisacárido.

2. Conjugado, según la reivindicación 1, **caracterizado por que** el polisacárido se selecciona del grupo que comprende ácido hialurónico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

3. Conjugado, según la reivindicación 2, **caracterizado por que** el ácido hialurónico o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo tiene el peso molecular dentro del intervalo de 10<sup>4</sup> a 10<sup>6</sup> g·mol<sup>-1</sup>, de manera preferente, es 10<sup>5</sup> g·mol<sup>-1</sup>.

4. Procedimiento de preparación de conjugados del oligómero de ácido hialurónico, según las fórmulas generales I y II, según la reivindicación 1, **caracterizado por que** los conjugados de oligómero de ácido hialurónico y enlazador diamino de las fórmulas generales V y VI



donde

R<sup>3</sup> es COOR<sup>6</sup> o CH<sub>2</sub>OH,

R<sup>4</sup> es OH o NHCOCH<sub>3</sub>,

R<sup>6</sup> es H o una sal farmacéuticamente aceptable;

R<sup>5</sup> se selecciona del grupo que comprende alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>30</sub>, alquilarilo C<sub>1</sub>-C<sub>30</sub> o alquilheteroarilo C<sub>1</sub>-C<sub>30</sub>, que comprende, de manera opcional, uno o más heteroátomos, idénticos o diferentes, seleccionados del grupo que comprende N, O, S;

X es O o un grupo NH;

en el caso en que R<sup>3</sup> es COOR<sup>6</sup>, entonces R<sup>4</sup> es OH, R<sup>1</sup> es H, R<sup>2</sup> es un residuo de oligómero de ácido hialurónico;

en el caso en que R<sup>3</sup> es CH<sub>2</sub>OH, entonces R<sup>4</sup> es NHCOCH<sub>3</sub>, R<sup>2</sup> es OH, R<sup>1</sup> es un residuo de oligómero de ácido hialurónico;

el residuo de oligómero de ácido hialurónico comprende de 1 a 17 ciclos de sacáridos, en el que el ciclo de sacárido se selecciona del grupo que comprende ácido β-(1,3)-D-glucurónico y β-(1,4)-N-acetil-D-glucosamina;

se hacen reaccionar, como mínimo, con un grupo aldehídico del sustrato en agua o en una mezcla de agua y un disolvente miscible en agua.

5. Procedimiento de preparación, según la reivindicación 4, **caracterizado por que** el sustrato es un polisacárido, de manera preferente, seleccionado del grupo que comprende ácido hialurónico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

6. Procedimiento, según la reivindicación 5, **caracterizado por que** el ácido hialurónico o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo tiene el peso molecular dentro del intervalo de 10<sup>4</sup> a 10<sup>6</sup> g·mol<sup>-1</sup>, de manera preferente, es 10<sup>5</sup> g·mol<sup>-1</sup>.

7. Procedimiento de preparación, según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, **caracterizado por que** se lleva a cabo a la temperatura de 10°C a 40°C, de manera preferente, a la temperatura de 20°C, durante de 24 a 150 horas, de manera preferente, de 60 a 80 horas.

8. Procedimiento de preparación, según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, **caracterizado por que** el disolvente miscible en agua se selecciona del grupo que comprende etanol, isopropanol, metanol o dimetilsulfóxido.

9. Procedimiento de preparación de conjugados de oligómero de ácido hialurónico, según las fórmulas generales III y IV, según la reivindicación 1, **caracterizado por que** prosigue como el procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8, haciendo reaccionar adicionalmente los conjugados de oligómero de ácido hialurónico y enlazador diamino de las fórmulas generales V y VI, como mínimo, con un grupo aldehídico del sustrato en presencia de un agente reductor.

10. Procedimiento de preparación, según la reivindicación 9, **caracterizado por que** el agente reductor se selecciona del grupo que comprende cianoborohidruro o picolina borano.

11. Procedimiento de preparación, según la reivindicación 9 o la reivindicación 10, **caracterizado por que** la cantidad del agente reductor está dentro del intervalo de 0,1 a 5 equivalentes, de manera preferente, es de 3 equivalentes, con respecto a la cantidad molar del disacárido de ácido hialurónico.

12. Procedimiento de preparación, según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 11, **caracterizado por que** los conjugados de oligómero de ácido hialurónico y enlazador diamino de las fórmulas generales V y VI, se preparan de una manera tal, que el oligómero de ácido hialurónico reacciona en su centro anomérico terminal en la posición 1 con un exceso de enlazador diamino de la fórmula general H<sub>2</sub>N-XR<sup>5</sup>-X-NH<sub>2</sub>, donde R<sup>5</sup> se selecciona del grupo que comprende alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>30</sub>, alquilarilo C<sub>1</sub>-C<sub>30</sub> o alquilheteroarilo C<sub>1</sub>-C<sub>30</sub>, que comprende, de manera opcional, uno o más heteroátomos, idénticos o diferentes, seleccionados del grupo que comprende N, O, S, y X es O o un grupo

NH; a un pH dentro del intervalo de 3 a 6,99, después de lo cual, se aísla el conjugado de oligómero de ácido hialurónico y enlazador diamino de las fórmulas generales V y VI.

5 13. Procedimiento de preparación, según la reivindicación 12, **caracterizado por que** la reacción se lleva a cabo a un pH dentro del intervalo de 3 a 6, de manera preferente, dentro del intervalo de 5 a 6.

10 14. Procedimiento de preparación, según la reivindicación 12 o la reivindicación 13, **caracterizado por que** la reacción se lleva a cabo en presencia de un ácido carboxílico seleccionado del grupo que comprende ácido acético, ácido propanoico o ácido láctico, de manera preferente, ácido acético.

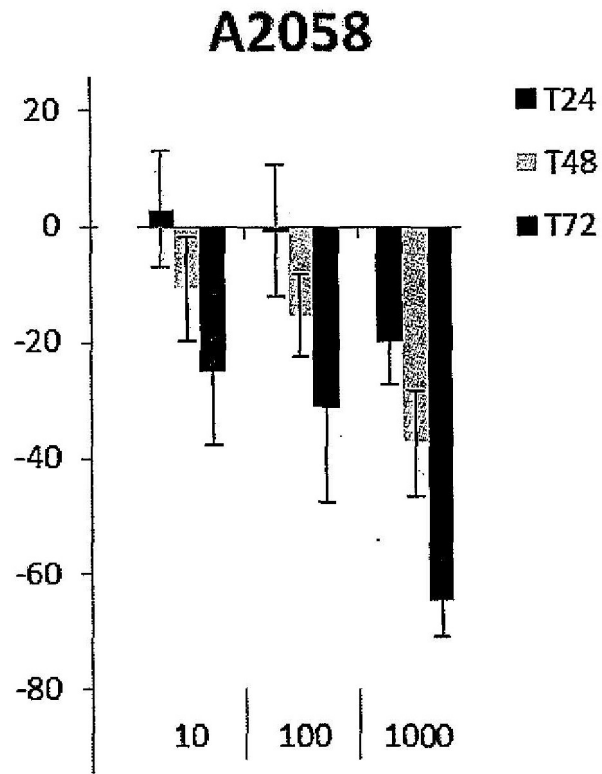
15 15. Procedimiento de preparación, según la reivindicación 14, **caracterizado por que** la cantidad del ácido carboxílico está dentro del intervalo de 5 a 30 equivalentes, de manera preferente, dentro del intervalo de 10 a 15 equivalentes, con respecto a la cantidad molar del disacárido de ácido hialurónico como sustrato.

20 16. Procedimiento de preparación, según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15, **caracterizado por que** el exceso de enlazador está dentro del intervalo de 5 a 30 equivalentes, de manera preferente, es de 10 equivalentes, con respecto a la cantidad molar del disacárido de ácido hialurónico como sustrato.

25 17. Procedimiento de preparación, según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 16, **caracterizado por que** la reacción se lleva a cabo a la temperatura de 10°C a 40°C, de manera preferente, a la temperatura de 20°C, durante de 24 a 150 horas, de manera preferente, de 60 a 80 horas.

30 18. Conjugados, según las reivindicaciones 1 a 3, para la utilización como portadores de oligómeros biológicamente activos en farmacia y biomedicina.

35 19. Conjugados, según las reivindicaciones 1 a 3, para la utilización en la preparación de materiales que tienen un efecto anticanceroso.



**Fig. 1**