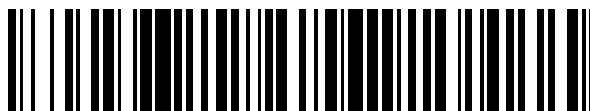


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 742 208**

51 Int. Cl.:

**C08B 37/00** (2006.01)

**A61K 31/726** (2006.01)

**C08G 81/00** (2006.01)

**C08J 3/24** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.06.2016 PCT/CZ2016/000071**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.12.2016 WO16206661**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.06.2016 E 16751149 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.05.2019 EP 3313893**

54 Título: **Derivados de polisacáridos sulfatados, método de preparación, modificación y uso de los mismos**

30 Prioridad:

**26.06.2015 CZ 20150445**

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

**13.02.2020**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**BOBULA, TOMAS;  
BUFFA, RADOVAN;  
VAGNEROVA, HANA;  
SULAKOVA, ROMANA;  
WOLFOVA, LUCIE;  
KOVAROVA, LENKA;  
MORAVCOVA, VERONIKA;  
ZIDEK, ONDREJ;  
PROHAZKOVA, PAVLINA y  
VELEBNY, VLADIMIR**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 742 208 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

Derivados de polisacáridos sulfatados, método de preparación, modificación y uso de los mismos

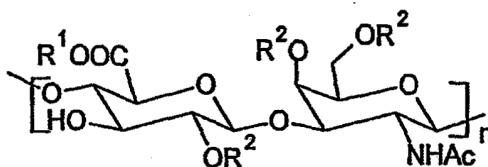
## Campo de la invención

5 La invención se refiere a derivados de polisacáridos sulfatados que tienen un doble enlace conjugado en la 4° y 5° posición del anillo de galactopiranosita situado en la 6° posición con respecto al aldehído. Además, la invención se refiere al método de preparación, modificación y uso de los mismos.

## Antecedentes de la invención

10 Los glicosaminoglicanos son polisacáridos lineales que consisten en aminohexosa y ácido urónico, excepto el sulfato de queratina. Forman una gran parte de la matriz intracelular del tejido conectivo, encartílagos, ligamentos y tendones particulares. Los polisacáridos sulfatados, p. ej., el sulfato de condroitina o el sulfato de dermatán, también son, además del ácido hialurónico, ejemplos importantes de glicosaminoglicanos.

El sulfato de condroitina es un glicosaminoglicano lineal, sulfatado y cargado negativamente, compuesto de unidades monoméricas recurrentes de *N*-acetil-D-galactosamina y ácido D-glucurónico unidos entre sí vía enlaces O-glicosídicos  $\beta(1\rightarrow3)$  y  $\beta(1\rightarrow4)$  (véase a continuación la fórmula estructural del sulfato de condroitina).



15

en donde

$R^1$  es H o Na,

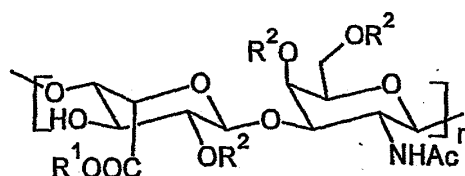
$R^2$  es H,  $-\text{SO}_2\text{-OH}$ , o  $-\text{SO}_2\text{-ONa}$

20

El sulfato de condroitina se deriva de los tejidos conjuntivos de animales, donde se une a las proteínas y así forma parte de los proteoglicanos. La sulfatación de la condroitina se realiza mediante sulfotransferasas en diversas posiciones y de diversos tipos. El patrón único de sulfatación de las posiciones particulares en la cadena del polímero codifica la actividad biológica específica de sulfato de condroitina. El sulfato de condroitina es un componente importante en la construcción del cartílago en las articulaciones, confiriéndoles resistencia a la compresión y restableciendo el equilibrio de la composición lubricante de la articulación (Baeurle S. A., Kiselev M. G., Makarova E. S., Nogovitsin E. A. 2009. *Polymer* 50: 1805). Junto con la glucosamina, el sulfato de condroitina se utiliza como suplemento nutricional para tratar o prevenir la osteoartritis en humanos (p. ej., Flexor®, Advance Nutraceuticals, Ltd.) o animales (p. ej., Gelorendog®, Contipro Pharma, Ltd.). Desde el punto de vista farmacéutico, el sulfato de condroitina se considera un fármaco de respuesta retardada para el control del dolor en enfermedades degenerativas de las articulaciones (Aubry-Rozier B. 2012. *Revue Médicale Suisse* 14: 571).

30

El sulfato de dermatán es un glicosaminoglicano lineal, sulfatado y cargado negativamente, compuesto de unidades monoméricas repetidas de *N*-acetil-D-galactosamina y ácido L-idurónico unidos entre sí vía los enlaces O-glicosídicos  $\beta(1\rightarrow3)$  y  $\beta(1\rightarrow4)$  (véase a continuación la fórmula estructural del sulfato de dermatán).



en donde

35

$R^1$  es H o Na,

$R^2$  es H,  $-\text{SO}_2\text{-OH}$  o  $-\text{SO}_2\text{-ONa}$

El sulfato de dermatán se diferencia del sulfato de condroitina por la presencia de ácido L-idurónico, que es un epímero C5 de ácido D-glucurónico. La configuración inversa del ácido idurónico permite una mejor flexibilidad de las cadenas de sulfato de dermatán y garantiza su interacción específica de glicosamina-glicoproteína en el área circundante. Estas interacciones contribuyen a la regulación de varios procesos celulares, como la migración, proliferación, diferenciación o angiogénesis. La transformación del sulfato de condroitina en sulfato de dermatán se proporciona por medio de tres enzimas: epimerasa del sulfato de dermatán 1 (DS-epi 1), epimerasa del sulfato de dermatán 2 (DS-epi2), y dermatán 4-O-sulfotransferasa (D4ST1). La reacción de epimerización del ácido glucurónico en ácido idurónico, junto con el modo de la sulfatación, no es aleatoria sino específicamente controlada enzimáticamente, lo que da como resultado la codificación de la información concerniente a la función del glicosaminoglicano construido (Thelin M., et al. 2013. *FEBS Journal* 280: 2431).

Los carrageninas son un grupo de polisacáridos linealmente sulfatados que se obtienen por la extracción de algas marinas rojas. La galactosa y su 3,6-anhidroderivado, que se asocian entre sí vialos enlaces O-glicosídicos  $\alpha(1\rightarrow3)$  o  $\beta(1\rightarrow4)$ , son sus unidades básicas de construcción. Hay tres tipos principales de carragenina, que difieren en su grado de sulfatación y solubilidad en agua. La carragenina kappa tiene un sulfato por dímero y forma geles rígidos en el agua. La carragenina iota comprende dos sulfatos y forma geles blandos, mientras que la carragenina lambda con tres sulfatos no exhibe propiedades de formación de gel. La carragenina es una alternativa de la gelatina animal para vegetarianos y veganos. Se utiliza para el espesamiento y la estabilización de productos alimenticios y como un emulsionante en las industrias farmacéutica y textil.

#### Oxidación de glicosaminoglicanos

Debido a su diversidad funcional, los polisacáridos pueden oxidarse en varias posiciones (Cumpstey I., 2013. *ISRN Organic Chemistry*, 1). En el caso de los glicosamineglicanos hay tres modos de oxidación. En el primero, el hidroxilo primario se oxida para formar un ácido carboxílico. La combinación de TEMPO/NaClO se usa para la oxidación con mayor frecuencia (Jiang B., et al. 2000. *Carbohydrate Research* 327: 455; Huang L. et al. 2006. *Chemistry*, 12: 5264). Debido al volumen estérico de TEMPO, este método es regioselectivo para hidroxilos primarios solamente.

Por el contrario, el segundo modo conduce a la oxidación de los hidroxilos secundarios para formar compuestos de dicetona. En este caso, los óxidos de metales de transición basados en Cr(VI) (Hassan R., et al. 2013. *Carbohydrate Polymers*, 92: 2321) o Mn (VII) (Gobouri A. A., et al. 2013. *International Journal of Sciences*, 2: 1; Zaaferany I. A., et al. 2013. *Journal of Materials of Science Research*, 2: 23) se utilizan como agentes de oxidación.

El tercer tipo de oxidación se basa en la oxidación de periodato ( $IO_4^-$ ) que también ataca los grupos hidroxilo secundarios, pero simultáneamente se rompe el anillo de piranosa (Dawlee S. et al. 2005. *Biomacromolecules*, 6: 2040; Liang Y., et al. 2011. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 82: 1; Xu Y., et al. 2012. *Carbohydrate Polymers*, 87: 1589). Durante la oxidación, el dialdehído primero se forma y luego se oxida a ácido dicarboxílico.

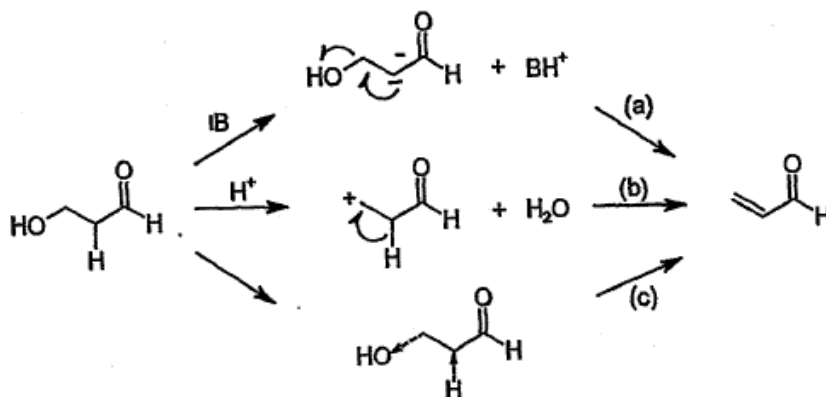
Todos los modos de oxidación mencionados anteriormente tienen varios inconvenientes. En el caso de la oxidación con el uso de TEMPO/NaClO, se favorece la formación de ácido poliurónico en lugar del aldehído-C6 deseado. Las condiciones de reacción para el nivel de aldehído necesitan optimizarse, como se demostró en el caso del ácido hialurónico (Buffa R., et al., WO2011069475, Sedová P., et al., 2013. *Carbohydrate Research*, 371:8). Además, un mayor contenido de los grupos carboxílicos en el polímero influyen significativamente en la conformación, la interacción y el reconocimiento del polisacárido con el entorno biológico (Zou X. H., et al. 2009. *Acta Biomaterialia*, 5: 1588).

A pesar de que puede lograrse un curso quimioselectivo de la reacción de oxidación de periodato, no se prefiere estemododebido a la dramática disminución del peso molecular del polímero y al clivaje irreversible del anillo de piranosa, que da como resultado la pérdida del carácter nativo del polisacárido.

En lo que respecta al uso de los agentes de oxidación derivados de los óxidos de metales de transición, los polisacáridos oxidados no pueden usarse para aplicaciones biomédicas debido a su alta toxicidad (Normandin L., et al. 2002. *Metabolic Brain Disease*, 17: 375; Katz S. A., et al. 2006. *Journal of Applied Toxicology*, 13: 217).

#### Reacciones de deshidratación de los derivados oxidados de polisacáridos.

La presencia de un aldehído en la estructura del polisacárido da como resultado el carácter ácido del átomo de hidrógeno en la posición  $\alpha$  adyacente. Este hidrógeno se vuelve fácilmente accesible bajo condiciones básicas para que las reacciones de eliminación formen un carbanión, que se estabiliza por la conjugación con el aldehído adyacente y así desplaza al grupo saliente en la posición  $\beta$  (modo a, esquema 1). La eliminación puede proceder también bajo condiciones ácidas, en donde la activación del grupo saliente ocurre primero para formar un carbanión en la posición  $\beta$  (modo b, Esquema 1). En la mezcla de reacción, el carbanión se neutraliza con un par de electrones libres en la posición  $\alpha$ . El tercer modo posible se puede realizar sin la adición de una base o un ácido, utilizando una eliminación simultánea de una molécula (modo c, Esquema 1).



Esquema 1. Reacción de eliminación en la estructura del aldehído: (a) formación de un carbanión por el tratamiento con una base, mecanismo E1cb (b) formación de un carbanión por el tratamiento con un ácido, mecanismo E1 (c) eliminación simultánea, mecanismo E2.

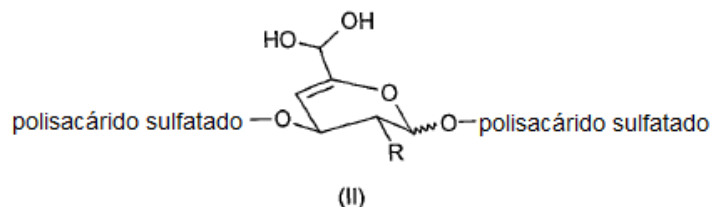
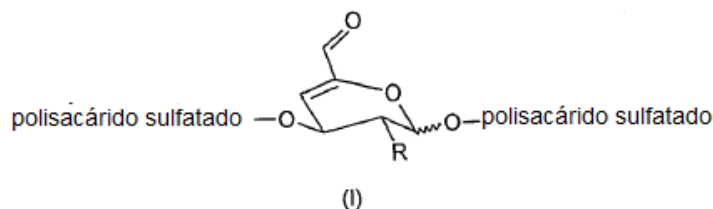
- 5 Una deshidratación dirigida del aldehído de hialuronano en la 6<sup>o</sup> posición en el anillo de glucosamina se describió en la patente (Buffa et al.: CZ304512). Los autores describen la preparación de un aldehído  $\alpha,\beta$ -insaturado de hialuronano y su uso en reacciones de reticulación. La síntesis descrita implica el uso de bases orgánicas estéricamente voluminosas (p.ej., diisopropilamina, trimetilamina), bases inorgánicas, p. ej.  $Ca(OH)_2$  en la mezcla de agua-disolvente orgánico del tipo de DMSO, sulfolano en la relación de 3/1 a 1/2 a temperaturas mayores que 50 - 60°C. La deshidratación también se realiza en estado sólido al calentar el polímero a 50 - 100°C durante 4-5 días. Los autores describen la oxidación y la deshidratación del ácido hialurónico en dos pasos y no describen la deshidratación directa durante la etapa de oxidación. Esta disolución tiene un importante inconveniente en la síntesis de dos etapas y el uso de condiciones de reacción inadecuadas en la presencia de agentes de eliminación cáusticos (corrosivos), la presencia de un disolvente orgánico, la necesidad de una temperatura elevada, y un tiempo prolongado de reacción. Todos estos parámetros hacen que la síntesis será más costosa y más complicada desde el punto de vista tecnológico (p. ej., la corrosión de los aparatos de producción, la difícil purificación del producto, el mayor precio de los disolventes apróticos dipolares tales como DMSO, sulfolano, y los agentes de eliminación tales como  $Et_3N$  y DIPEA, un alto consumo de energía y agua de refrigeración, un mayor riesgo de residuos peligrosos en el producto, la biocompatibilidad del producto en riesgo, una mayor tasa de degradación del polímero debido al medio ambiente básico y la mayor temperatura). Dichos inconvenientes de la síntesis de un aldehído  $\alpha,\beta$ -insaturado de HA en CZ304512 son, según esta invención, exitosamente superados, ya que la síntesis procede en un recipiente sin la necesidad de aislar el producto intermedio en la forma de un aldehído C6 saturado, sin añadir el agente de eliminación, sin añadir el disolvente orgánico, a temperatura ambiente y con los tiempos de reacción en el orden de horas.

#### 25 Reacción de reticulación de polisacáridos oxidados

- La introducción de un aldehído en la estructura del polisacárido permite una modificación adicional de la cadena de polímero con la ayuda de la adición nucleofílica. Se conocen varios documentos de patentes que describen la unión de aminos a aldehídos. Un ejemplo típico de la reacción de los glicosaminoglicanos es la reacción del dialdehído formado por la oxidación con periodato con varios N-nucleófilos de bajo peso molecular (aminas, hidrazidas, alcoxiaminas, semicarbazidas) o poliméricos (gelatina, quitosán), o S-nucleófilos (tioles, aminotioles) para preparar hidrogeles biocompatibles (Dawlee S., et al. 2005. *Biomacromolecules*, 6: 2040; Weng L., et al. 2008. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 85: 352, Bergman K., et al.: WO2009/108100, Hilborn J., et al.: WO2010/138074). La reticulación del aldehído de ácido hialurónico preparado con el uso de periodinano Dess-Martin o con el uso de la combinación de TEMPO/NaClO con varias aminas se describió en documentos de patente (Buffa R., et al.: WO2011069474; Buffa R., et al.: WO2011069475). El aldehído  $\alpha,\beta$ -insaturado del ácido hialurónico se preparó mediante la deshidratación del aldehído C6 en la subunidad de *N*-acetil-D-glucosamina (Buffa R., et al.: CZ304512). Además de los derivados oxidados de ácido hialurónico, los autores describen también su uso en reacciones con aminas aromáticas alifáticas que tienen un contenido opcional de átomos N, S u O. Sin embargo, se preparan a altas temperaturas y con el uso de agentes de eliminación corrosivos, lo que es considerablemente desfavorable para mantener su actividad biológica debido a su posible desnaturalización ya la presencia de subproductos. Además, las reacciones de reticulación de un aldehído  $\alpha,\beta$ -insaturado de ácido hialurónico con polisacáridos desacetilados como un enlazador amino multifuncional se mencionan para ilustrar las ventajas de la conjugación del aldehído a partir del polisacárido que influye en las propiedades reológicas de los hidrogeles preparados. Sin embargo, los hidrogeles preparados de esta manera no muestran propiedades mecánicas satisfactorias, especialmente en lo que se refiere a la rigidez del hidrogel.

**Compendio de la invención**

El objetivo de la invención es la preparación de polisacáridos sulfatados bajo condiciones de reacción moderadas, en un tiempo más corto, y sin el uso de impurezas no deseadas de agentes de eliminación o disolventes orgánicos. Este método evita la degradación y pérdida significativas de propiedades biológicas de los polisacáridos sulfatados, que son importantes para la ingeniería de tejidos, la medicina regenerativa, o aplicaciones biomédicas. El objeto de la invención consiste en los derivados de polisacáridos sulfatados que tienen, como parte de su cadena de polímero, al menos un anillo de galactopiranososa modificado según la fórmula general I o II, conteniendo dicho anillo un doble enlace en la 4° y 5° posición con un aldehído conjugado o su forma hidratada respectivamente (fórmula general II)

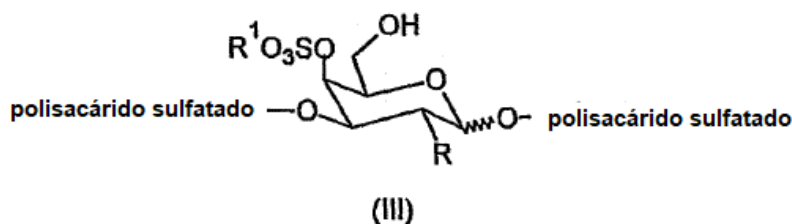


10 en donde

R es OH, O-SO<sub>2</sub>-OH, O-SO<sub>2</sub>-ONa, o NH-C(O)-CH<sub>3</sub>.

Una condición necesaria es el uso de polisacáridos sulfatados que contengan al menos un anillo de galactopiranososa en su cadena, estando este anillo en la 4° posición, y simultáneamente unido en la cadena vía un enlace O-glicosídico α(1→3) o β(1→3) según la fórmula estructural general III.

15



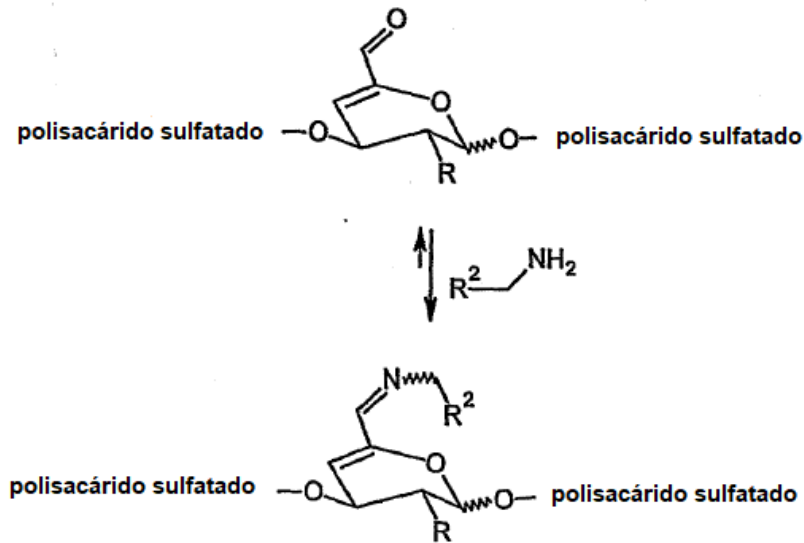
en donde

R es OH, O-SO<sub>2</sub>-OH, O-SO<sub>2</sub>-ONa o NH-C(O)-CH<sub>3</sub>

R<sup>1</sup> es H, o Na.

20 El polisacárido se selecciona preferiblemente del grupo que comprende sulfato de condroitina, sulfato de dermatán, carragenina y sus derivados y/o sales farmacéuticamente aceptables, y su peso molecular está preferiblemente en el intervalo de 1x10<sup>3</sup> a 5x10<sup>4</sup> g.mol<sup>-1</sup>, y el grado de sustitución en el intervalo de 1 a 40%, preferiblemente de 10 a 25%. En la fórmula I o II respectivamente, el término "grado de sustitución" se refiere al grado de modificación de un aldehído insaturado, o su forma hidratada respectivamente.

25 Esta disolución permite estabilizar los conjugados de polisacáridos sulfatados con aminas por medio del enlace múltiple del aldehído, por lo que una gama sustancialmente más amplia de aminas puede estar unida de manera más estable en los polisacáridos modificados de este modo (Esquema 2), bajo condiciones fisiológicas.



en donde

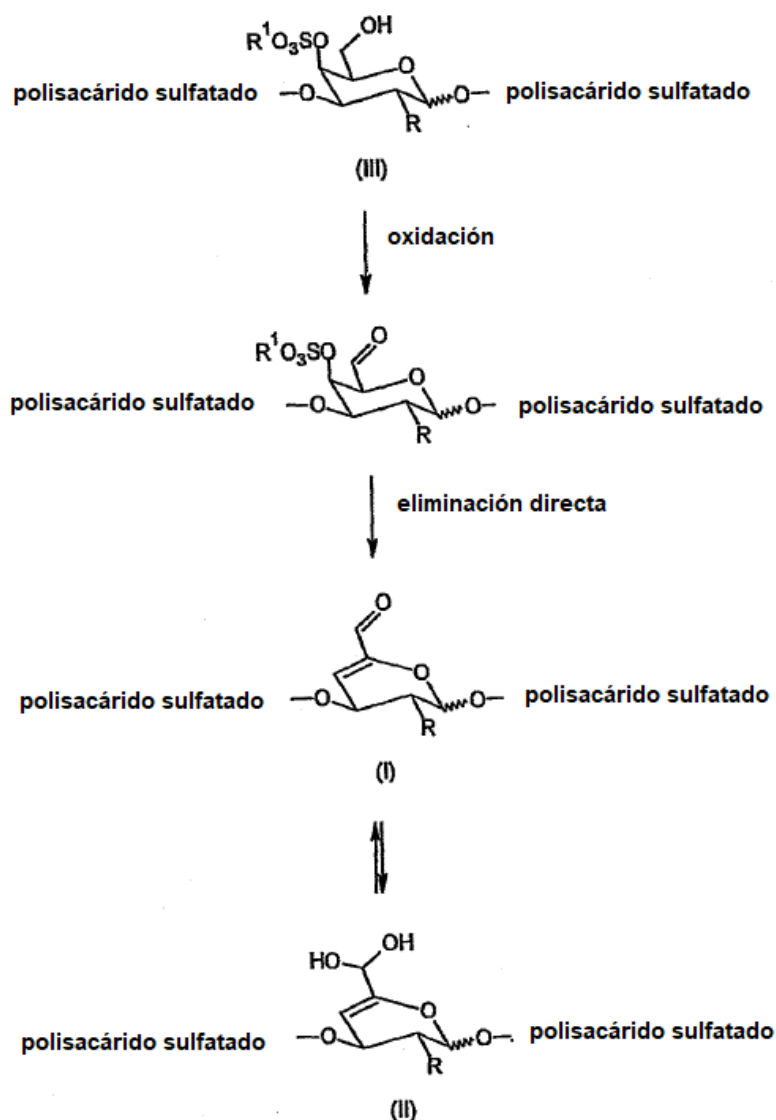
R es OH, O-SO<sub>2</sub>-OH, O-SO<sub>2</sub>-ONa o NH-C(O)CH<sub>3</sub>

R<sup>2</sup> es alquilo, arilo, hetarilo.

5 Esquema 2. Unión de amina a un aldehído  $\alpha,\beta$ -insaturado de polisacárido sulfatado

Además, la invención se refiere al método de preparación de un derivado de la fórmula estructural general I o II, en donde el polisacárido sulfatado, que es soluble en agua en su forma nativa y contiene, en su estructura, al menos una unidad de galactopiranososa sulfatada en la 4<sup>o</sup> posición, estando esta unidad unida en la cadena del polímero vía un enlace O-glicosídico  $\alpha(1\rightarrow3)$  o  $\beta(1\rightarrow3)$ , primero se oxida a un aldehído en la 6<sup>o</sup> posición e inmediatamente después de la oxidación en la mezcla de reacción actual proporciona un aldehído  $\alpha,\beta$ -insaturado vía la eliminación directa (Esquema 3).

10



en donde

R es OH, O-SO<sub>2</sub>-OH, O-SO<sub>2</sub>-ONa, o NH-C(O)CH<sub>3</sub>

R<sup>1</sup> es H o Na.

5 Esquema 3. Método de preparación de un aldehído  $\alpha,\beta$ -insaturado en la estructura del polisacárido sulfatado

La oxidación selectiva del grupo hidroxilo primario en la 6<sup>o</sup> posición de galactopiranososa se puede realizar, p. ej., por medio del sistema de oxidación del radical 2,2,6,6-tetrametil-1-piperidiniloxilo R<sup>3</sup>-TEMPO/NaClO, en donde R<sup>3</sup> es hidrógeno o N-acetilo, en agua o en una disolución acuosa de sales inorgánicas. Preferiblemente, esta etapa se realiza en agua, a una temperatura de 5 a 25°C, más preferiblemente de 5 a 10°C, la cantidad molar de NaClO está dentro del intervalo de 0,1 a 2,0 equivalente, y la cantidad molar de R<sup>3</sup>-TEMPO está dentro del intervalo de 0,01 a 0,2 equivalente, con respecto a un dímero de polisacárido sulfatado. El peso molecular del polisacárido sulfatado inicial está dentro del intervalo de 1x10<sup>4</sup> a 5x10<sup>6</sup> g.mol<sup>-1</sup>, y debe contener las unidades de galactopiranososa sulfatadas en la 4<sup>o</sup> posición y se une vía los enlaces O-glicosídicos  $\alpha(1\rightarrow3)$  o  $\beta(1\rightarrow3)$  en la cadena de polímero. Preferiblemente, el polisacárido sulfatado inicial es sulfato de condroitina, sulfato de dermatán, carragenina o su derivado y/o sulfarmacéuticamente aceptables. La disolución acuosa de sales puede ser p. ej. una disolución acuosa que comprende una sal de metal alcalino y/o un tampón, p. ej., PBS.

La reacción de eliminación del polisacárido oxidado y sulfatado procede inmediatamente después de la etapa oxidativa en la misma mezcla de reacción sin la necesidad de añadir un agente de eliminación, especialmente un ácido o una base, un disolvente orgánico o sin elevación de la temperatura de reacción, y sin el aislamiento del aldehído C6 saturado en la subunidad de galactopiranososa que es sulfatada en la 4<sup>a</sup> posición. La reacción de

eliminación procede en agua o en soluciones acuosas de sales inorgánicas (p. ej., sales de metales alcalinos), o tampones (p. ej., PBS) a la temperatura de 5 - 25°C, y no hay necesidad de un tiempo de reacción adicional. Además, la etapa de eliminación es proporcional a la etapa de oxidación lograda en la mezcla de reacción. El método de preparación del aldehído  $\alpha,\beta$ -insaturado integra dos etapas de reacción (oxidación y eliminación) en un recipiente sin el aislamiento del intermedio de la etapa de oxidación. La oxidación da como resultado un aldehído  $\alpha,\beta$ -insaturado en lugar de un aldehído C6 saturado en la estructura del polisacárido sulfatado. En comparación con el método de la preparación de un aldehído  $\alpha,\beta$ -insaturado de ácido hialurónico (Buffa R et al.: CZ304512), el enfoque presentado es diferente y definitivamente ventajoso en los parámetros enumerados en la Tabla 1.

Tabla 1: Diferencias en la preparación de los aldehídos  $\alpha,\beta$ -insaturados en comparación con la técnica anterior

Parámetro	CZ304512	Invencción
Tipo de polisacárido	Ácido hialurónico	Polisacáridos sulfatados
Número de etapas de la síntesis	2	1
Agente de eliminación	si (10-15 equivalentes)	no
Disolvente	mezcla de agua-disolvente orgánico	agua
Temperatura de reacción	50-100°C	Temperatura ambiente – 5-25°C
Tiempo de reacción	2-5 días	1-2 h
Grado de sustitución	5-7%	20-25%

La Tabla 1 anterior muestra claramente que el método de preparación de los derivados de polisacárido sulfatado según la invención da como resultado directamente la formación de aldehídos  $\alpha,\beta$ -insaturados en lugar de sus análogos saturados. Otra diferencia del presente método de la invención consiste en que no es aplicable a los polisacáridos mencionados en la técnica anterior, debido a que la presencia del sulfato es necesaria para el proceso. Otras ventajas están referidas a que la reacción procede exclusivamente en agua, sin la necesidad de añadir otro disolvente orgánico o agente de eliminación. Además, la reacción procede a temperatura ambiente (20-25°C) con tiempos de reacción cortos (1-2 h) sin aislamiento del aldehído C6 saturado. El método antes mencionado da como resultado derivados de derivados sulfatados que tienen las fórmulas generales I y/o II, con un DS (grado de sustitución) dentro del intervalo de 20 a 25%. El método de preparación es tecnológicamente interesante y sustancialmente más preferible desde el punto de vista de tiempo y costo en comparación con los métodos conocidos.

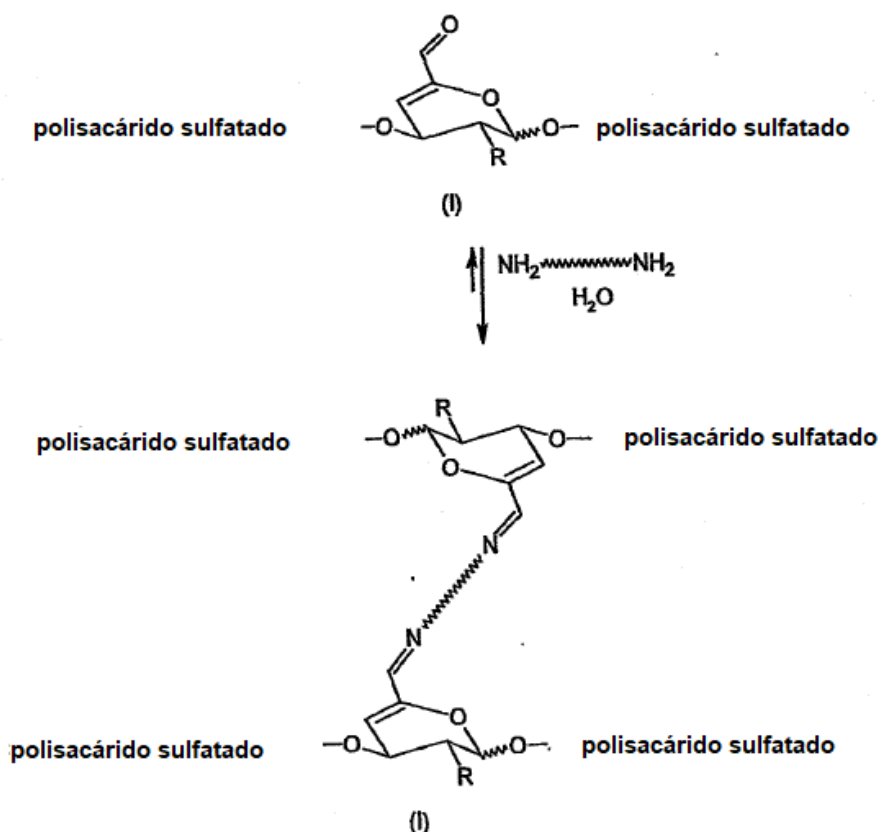
Considerando la modificación química, el aldehído  $\alpha,\beta$ -insaturado en los polisacáridos sulfatados se puede utilizar principalmente para reacciones de condensación con varios N-nucleófilos. El aldehído, en la función del centro electrofílico reactivo, mantiene su estabilidad y reactividad también en agua, que puede usarse preferiblemente para la unión mencionada (conjugación) de aminas biocompatibles con los derivados de las fórmulas generales I y II. El término "amina" es bien conocido por los expertos en la técnica, y puede representar, pero no se limita a, alquilamina, arilamina, hetarilamina, aminoácido, péptido o polímero con un grupo amino libre. Este último se puede incorporar directamente al polímero o se une vía un enlazador adecuado que puede ser lineal o ramificado, que opcionalmente contiene átomos de N, S u O. El término "polímero con un grupo amino" se entiende como un polisacárido desacetilado, proteína, péptido u otro biopolímero o polímero sintético biocompatible.

Por lo tanto, la invención se refiere además al método de modificación del derivado de la fórmula general I o II, en donde el derivado reacciona con una amina de la fórmula general  $R^2-NH_2$ , en donde  $R^2$  es alquilo, arilo, hetero arilo, cadena  $C_1$  a  $C_{30}$  lineal o ramificada, que opcionalmente contiene átomos de N, S u O. La amina es preferiblemente una amina biológicamente activa, particularmente aminoácido o péptido, o un polímero biológicamente aceptable que contiene un grupo amino libre, en donde este grupo amino es una parte inherente del polímero (p. ej., gelatina, quitosano, ácido hialurónico desacetilado, sulfato de condroitina desacetilado, etc.) o está unido al polímero vía un enlazador que contiene un grupo amino, hidrazina, hidrazida, amino alcoxi, hidroxilo, carboxilo, tiol o cualquier combinación de los mismos. La cantidad molar de amina puede estar, preferiblemente, dentro del intervalo de 0,05-3 equivalentes con respecto a un dímero del polisacárido sulfatado. La unión de la amina puede proceder en agua, tampón fosfato o un sistema de agua-disolvente orgánico a una temperatura en el intervalo de 20 a 60°C durante 10 minutos a 150 h. Se entiende que un disolvente orgánico adecuado es un alcohol miscible en agua, preferiblemente isopropanol o etanol, y disolventes apróticos miscibles en agua, preferiblemente dimetilsulfóxido, en donde su contenido en la mezcla de reacción no excede el 50% (v/v). La reacción con amina se puede realizar preferiblemente bajo condiciones fisiológicas (pH = 7,4 y T = 37°C). Además de las aminas, la reacción también procede con otros N-nucleófilos que contienen un grupo amino en su estructura, como hidrazinas, hidroxilaminas, hidrazidas, semicarbazidas o tiosemicarbazidas. En el caso de una reacción con N-nucleófilos monofuncionales, estos se unen



al polímero, en donde el uso de N-nucleófilos bi y polifuncionales proporcionan la reticulación de cadenas de polímero, es decir, la formación de hidrogeles. Dependiendo del tipo de N-nucleófilo empleado, su cantidad con respecto a la relación de los sitios de unión, la estructura del polímero, la concentración de la disolución, el grado de sustitución y el peso molecular del polímero, pueden prepararse polímeros reticulados con una amplia gama de propiedades viscoelásticas y mecánicas exactamente según las necesidades de las aplicaciones previstas en ingeniería de tejidos o medicina regenerativa. En algunos casos específicos, la reacción del derivado de la invención con una amina puede proceder dentro del rango total de pH, en donde en otros casos el valor de pH es importante para la reacción. Un experto en la técnica puede reconocerlo con anticipación o determinarlo por mediciones de rutina.

Las aplicaciones previstas son principalmente las preparaciones de armazones como materiales de soporte bioactivos y biodegradables que imitan la matriz extracelular. Estos materiales pueden servir como portadores de células o sustancias biológicamente activas, atrayentes celulares, como el medio portador para el suministro de células al sitio de un defecto del tejido, como relleno de tejido, un sustituto de tejido adecuado, o una barrera protectora. Otras demandas sobre los armazones funcionales comprenden asegurar un ambiente químico y fisiológico adecuado para la proliferación y diferenciación celular, y el transporte de nutrientes y productos de desecho del metabolismo celular. Dependiendo del modo de aplicación del armazón, es posible preparar armazones de inyección a partir de los polisacáridos sulfatados reticulados en forma de soluciones formadoras de gel, en donde el armazón y el tejido nuevo se forman *in vivo*, o los armazones sólidos, que se implantan en un organismo después del cultivo celular y la formación del tejido nuevo *in vitro*. Además, la correcta elección de los parámetros de la reacción de reticulación (relación de concentración y sitios de unión) permiten lograr cortos tiempos de gelificación, en el orden de segundos (véase el Ejemplo 30), que pueden utilizarse preferiblemente para la gelificación *in situ* en presencia de un material biológico, la llamada encapsulación celular. La reacción de reticulación se ilustra en el Esquema 4:



en donde

25 Res OH, O-SO<sub>2</sub>-OH, O-SO<sub>2</sub>-ONa o NH-C(O)CH<sub>3</sub>

Esquema 4. Reticulación de un polisacárido sulfatado por medio de un aldehído  $\alpha,\beta$ -insaturado y una diamina

La mayor estabilidad del enlace de una amina con un aldehído  $\alpha,\beta$ -insaturado en comparación con un aldehído saturado convencional se asegura mediante la conjugación del aldehído con el doble enlace adyacente. Así, se

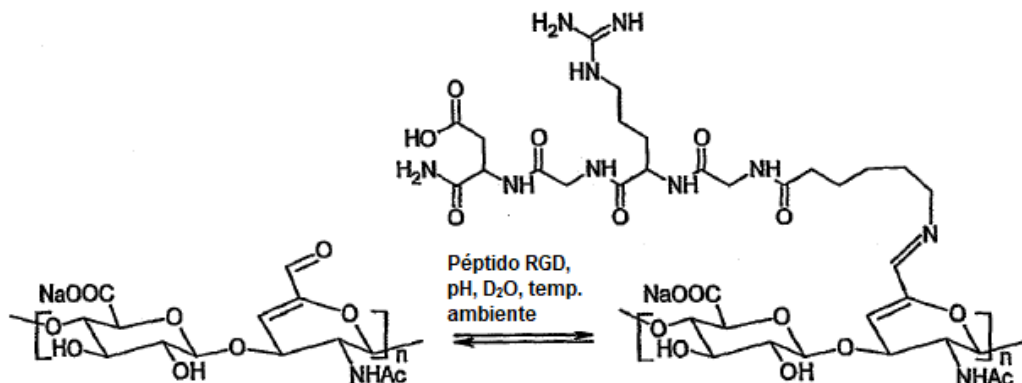
pueden preparar materiales más estables y mejor reticulados en base a los polisacáridos sulfatados, como se muestra en el ejemplo del polisacárido no sulfatado de ácido hialurónico (Buffa R., et al: CZ304512).

La reticulación se realiza haciendo reaccionar el derivado con un N-nucleófilo bifuncional biocompatible soluble en agua, seleccionado del grupo que comprende alquilaminas, arilaminas, heteroalquilaminas, hetarilaminas, aminoácidos, péptidos, polímero con un grupo amino libre, hidrazidas, hidroxilaminas, hidrazidas, semicarbazidas o tiosemicarbazidas, en donde procede la reticulación del derivado. Los nucleófilos preferidos comprenden hidrazidas, dihidrazidas, polisacáridos desacetilados o alcoxiaminas. La reacción puede preferiblemente proceder en tampón fosfato.

Sin embargo, el análisis comparativo de las propiedades mecánicas (módulo de elasticidad de Young en compresión, límite elástico en compresión y tasa de deformación de los geles reticulados) demostró una mayor densidad de los geles preparados a partir del sulfato de condroitina oxidado (véase el Ejemplo 31 de la invención) en comparación con los geles basados en el hialuronano oxidado. La mayor rigidez de los geles refleja la mayor densidad de reticulación en la estructura del polisacárido, y por lo tanto se asegura una mejor estabilidad del volumen y la forma del material reticulado. Además, los mejores materiales reticulados muestran menos cambios en las propiedades mecánicas con el transcurso del tiempo y así satisfacen las necesidades a cubrir por el armazón celular funcional. En este caso, se puede lograr una reticulación más efectiva mediante un mayor grado de sustitución del aldehído  $\alpha,\beta$ -insaturado en la estructura del polisacárido sulfatado (véase la Tabla 1 anterior), que es una de las ventajas importantes de la invención en comparación con la técnica anterior.

La segunda ventaja de los geles reticulados de manera más eficaz consiste en una menor tasa de hinchamiento en un medio fisiológico. Esto se puede utilizar preferiblemente para armazones en ingeniería de tejidos, en donde es conveniente el desempeño controlado del material en un organismo vivo en contacto con el tejido, sin cambios importantes en sus propiedades mecánicas o forma o volumen.

La tercera ventaja del mayor grado de sustitución del aldehído  $\alpha,\beta$ -insaturado en la estructura del polisacárido sulfatado es la posibilidad de unir una mayor cantidad de, p. ej., una amina biológicamente activa. De esta forma, una mayor concentración de la sustancia biológicamente activa puede lograrse en el sitio del efecto para aplicaciones de sistemas de soporte, para las que la invención descrita también se puede utilizar preferiblemente. Además, el método propuesto permite la unión de una variedad más amplia de aminas biológicamente activas (p. ej., aminoácidos, péptidos) que se pueden liberar naturalmente en su forma nativa (activa). Se encontró repetitivamente en diversos ejemplos (butilamina, lisina, péptido RGD) que a un pH más bajo, la unión de amina-aldehído  $\alpha,\beta$ -insaturado es menos estable (Esquema 5), por lo que los conjugados preparados se pueden utilizar preferiblemente para sistemas de suministro de fármacos basados en biomateriales sensibles al pH.



pH	% DS Imina
4,22	0
7,22	4
10,49	20

Esquema 5. Estabilidad de imina de sulfato de condroitina de aldehído  $\alpha,\beta$ -insaturado (DS=20%) con péptido RGD (ácido amino hexano-Gly-Arg-Gly-Asp-NH<sub>2</sub>) en agua

Más particularmente, esta estabilidad de una imina basada en alquil, aril, o heteril amina en agua puede utilizarse de la siguiente manera: cuando el conjugado (imina), formado por una amina biológicamente activa (p.ej., medicamento, preparación antiséptica, péptido, aminoácido, etc.) y un polisacárido (portador) estable en condiciones moderadamente básicas, se incorpora al sitio objetivo de un organismo, cuyo pH es diferente (neutro o moderadamente ácido), este conjugado se descompone y se libera sustancia biológicamente activa en este sitio.

Se comprobó que el aldehído  $\alpha,\beta$ -insaturado en la estructura de sulfato de condroitina no es en sí mismo citotóxico (véase el Ejemplo 32 según la invención), por lo que los conjugados y los productos reticulados de aldehídos  $\alpha,\beta$ -insaturados de la fórmula I o II con aminas biocompatibles son adecuados para aplicaciones específicas en biomedicina e ingeniería de tejidos. Se asume que estas sustancias no influyen negativamente en la viabilidad celular, no inducen una reacción inmune en el organismo, y que son enzimáticamente degradables, mientras que los productos de su degradación son también biocompatibles. Así, los derivados de las fórmulas I o II se pueden utilizar para la preparación de soportes de sustancias biológicamente activas en el campo de la cosmética o la farmacia, o como los soportes de sustancias biológicamente activas con liberación controlada por medio del cambio de pH. Con respecto a la reacción que procede fluidamente en condiciones fisiológicas y con materiales iniciales biocompatibles, los productos reticulados de los polisacáridos sulfatados también pueden considerarse un material prometedor para los armazones celulares en ingeniería de tejidos o medicina regenerativa, donde se pueden usar preferiblemente para la incorporación de las células y su posterior cultivo. El método descrito en esta invención se puede realizar fácilmente en la industria, ya que no es costoso ni demanda mucho tiempo. Esto se debe a la combinación de las dos etapas en un solo recipiente sin la necesidad de aislamiento de un intermedio. Otra ventaja consiste en la ausencia de sustancias químicas tóxicas, corrosivas, o costosas en la función de un agente de eliminación, así como la ausencia de un disolvente orgánico, ya que la reacción procede exclusivamente en agua. Los tiempos de reacción son cortos, y, además, la reacción procede a temperatura ambiente. Los productos finales son aislados por precipitación con alcoholes o soluciones de sales inorgánicas sin ningún efecto perjudicial sobre el medio ambiente. Además, se lograron grados de sustitución relativamente altos (20-25%) mediante el método propuesto en condiciones sustancialmente más moderadas que en Buffa R., et al: CZ304512 (véase la Tabla 1 anterior).

Los polisacáridos sulfatados modificados por el método descrito de la invención son adecuados como precursores para las reacciones de conjugación o reticulación con varios N-nucleófilos que dan como resultado materiales biocompatibles adecuados para aplicaciones biomédicas, de ingeniería de tejidos y medicina regenerativa. Más particularmente, los derivados preparados por el método de la invención se pueden utilizar como soporte de sustancias biológicamente activas de liberación controlada para uso en el cambio del valor de pH, en el campo de cosmética y farmacia. Los derivados modificados por el método de la invención se pueden utilizar como materiales biocompatibles para aplicaciones biomédicas y la formación de armazones para ingeniería de tejidos, o para medicina regenerativa.

### Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 ilustra la formación de un hidrogel a base de sulfato de condroitina oxidado condihidrazida adípica (Ejemplo 21): (a) disolución de aldehído  $\alpha,\beta$ -insaturado de sulfato de condroitina en PBS, (b) gelificación de la disolución después de la adición de la disolución de dihidrazida adípica en PBS, (c) el hidrogel después de 1 h en PBS (pH=7,4, c=0,9% p/v), (d) el uso de una forma ilustrativa para la preparación del hidrogel, (e) el uso de una forma definida para la preparación del hidrogel, (f) una vista detallada de un segmento del hidrogel.

Fig. 2. Fotografías del hidrogel liofilizado en base al sulfato de condroitina oxidado condihidrazida adípica tomadas por el microscopio electrónico de barrido: (a) una detección transversal con magnificación 200x de los electrones secundarios, (b) una sección ampliada de la estructura porosa del hidrogel con el diámetro medido.

La Fig. 3 ilustra los resultados de los ensayos de viabilidad celular de los fibroblastos 3T3 en un aldehído  $\alpha,\beta$ -insaturado de sulfato de condroitina ( $M_w=4 \times 10^4$  g/mol, DS=20%). La curva de activación vs. inhibición se expresa en %, con respecto al control en tiempo T = 0 h (100%). Evaluación mediante método MTT, seis repeticiones.

Fig. 4. Cinética de la gelificación en el Ejemplo 30, con la determinación del punto de gelificación ( $T_g=97$  s,  $T=45^\circ\text{C}$ ). Representación gráfica de la dependencia de los módulos elástico ( $G'$ ) y viscoso ( $G''$ ) en el tiempo.

### Ejemplos

El término "equivalente" (eq), como se utiliza en esta memoria, se refiere a la unidad dímera del polisacárido sulfatado, si no se indica de otro modo. El porcentaje se expresa como porcentaje en peso, si no se indica de otro modo. El peso molecular del sulfato de condroitina inicial (Fuente: Sigma Aldrich, Ltd., Praga, CZ) es el peso molecular promedio en peso dentro del intervalo de  $4 \times 10^4$  a  $5 \times 10^4$  g.mol<sup>-1</sup>.

La relación de condroitin-4-sulfato (tipo A) y condroitin-6-sulfato (tipo C) fue de 3:2. El material se aisló de un material animal.

La sal de sodio del sulfato de dermatán (sal de sodio del sulfato de condroitina B) de solubilidad de 5 mg/ml en agua se adquirió de Sigma Aldrich. El material se aisló de un material animal.

La carragenina lambda de solubilidad de 10 mg/ml en agua se adquirió de SigmaAldrich y se aisló de algas marinas sin propiedades de gelificación en la forma nativa.

- 5 El grado de sustitución del aldehído  $\alpha,\beta$ -insaturado en la estructura del polisacárido sulfatado se determinó según el siguiente cálculo:

DS = el grado de sustitución del aldehído  $\alpha,\beta$ -insaturado =  $100\% \times (\text{la cantidad molar del dímero modificado del polisacárido sulfatado} / (\text{la cantidad molar de todos los dímeros del polisacárido sulfatado}))$ .

- 10 El grado de sustitución de la reacción de aminación en la estructura del polisacárido sulfatado se determinó según el siguiente cálculo:

DS = el grado de sustitución para la aminación =  $100\% \times (\text{la cantidad molar del dímero modificado del polisacárido sulfatado} / (\text{la cantidad molar de todos los dímeros del polisacárido sulfatado}))$ .

- 15 Los espectros FT-IR se midieron dentro del intervalo de  $4000-400 \text{ cm}^{-1}$  en KBr, por medio del espectrómetro Nicolet 6700 FTIR. Los espectros UV-VIS se midieron mediante el aparato Shimadzu UV-2401PC dentro del intervalo de 200-600 nm y se procesaron por medio del software UV Probe, versión 2.00.

La cinética de gelificación se determinó mediante el aparato AR-G2 y el análisis TA se utilizó como el software de evaluación. El punto de gelificación ( $T_g$ ) se determinó a partir de la dependencia del tiempo de los módulos elástico y viscoso.

- 20 Las propiedades mecánicas de los geles seleccionados se midieron mediante la prueba de compresión por medio del aparato Instron 3433 y se evaluaron mediante el software Bluehill. Los parámetros determinados para cada muestra fueron los siguientes: Módulo de Young para compresión, resistencia a la compresión, deformación al límite elástico, y tenacidad.

La morfología superficial de los materiales liofilizados se analizó mediante el microscopio electrónico Zeiss Ultra Plus.

- 25 El ácido hialurónico desacetilado se preparó mediante desacetilación con hidrazina según Buffa R., et al. CZ304512.

El aminopropoxil y el derivado de hidrazina del ácido hialurónico se prepararon por aminación reductiva según Buffa R., et al.: WO2011069474.

Lista de abreviaturas

TEMPO – radical 2,2,6,6-tetrametil-1-piperidiniloxi

- 30 4-AcNH-TEMPO – TEMPO con un grupo acetamida en la 4<sup>o</sup> posición

PBS – disolución salina tamponada con fosfato

Péptido RGD – péptido de la secuencia del ácido amino hexano-Gly-Arg-Gly-Asp-NH<sub>2</sub>

AMK – aminoácido

IPA – alcohol isopropílico

- 35 DMSO – dimetilsulfóxido

Ejemplo 1

Preparación del aldehído  $\alpha,\beta$ -insaturado de sulfato de condroitina

- 40 Método 1: Una disolución acuosa de hipoclorito de sodio (0,8eq, 11% de cloro activo) se añadió gradualmente a una disolución acuosa de sulfato de condroitina al 2% (200 mg,  $M_w=4,5 \times 10^4 \text{ g.mol}^{-1}$ ) enfriada a 5°C, que contenía de coadjuvante de fosfato disódico (2,2eq), bromuro de sodio (0,8eq) y 4-AcNH-TEMPO (0,01%). La mezcla se agitó durante 2 h a 5°C. Luego se añadió etanol (10eq) a la reacción, que se agitó durante una hora adicional a temperatura ambiente.

El producto se aisló por precipitación con IPA y se analizó por RMN.

DS=23% (determinado por RMN),  $M_w=2,1 \times 10^4 \text{ g.mol}^{-1}$  (determinado por SEC MALLS)

Método 2: Una disolución acuosa de hipoclorito de sodio (0,8eq, 11% de cloro activo) se añadió gradualmente a una disolución acuosa de sulfato de condroitina al 2% (200 mg,  $M_w = 4,5 \times 10^4 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ) enfriada a 5°C, que contiene bromuro de sodio (0,8eq) y 4-AcNH-TEMPO (0,01%). La mezcla se agitó durante 2 h a 5°C. Luego se añadió etanol (10eq) a la reacción, que se agitó durante una hora adicional a temperatura ambiente. El producto se aisló por precipitación con IPA y se analizó por RMN.

DS = 20% (determinado por RMN)

Análisis espectral de aldehído  $\alpha, \beta$ -insaturado de sulfato de condroitina: RMN<sup>1</sup>H (500 MHz, D<sub>2</sub>O,  $\delta$  ppm): 2,02 (3H, AcNH-, bs), 4,31 (1H, H<sub>2</sub>, bs), 4,49 (1H, H<sub>3</sub>, bs), 5,20 (1H, H<sub>1</sub>, bs), 6,34 (1H, H<sub>4</sub>, bs), 9,21 (1H, H<sub>6</sub>, bs);

RMN<sup>1</sup>H-1H COSY (D<sub>2</sub>O), picos de cruce,  $\delta$  ppm: 4,31-4,49, 4,31-5,20, 4,49-6,34; RMN<sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC

(D<sub>2</sub>O), picos de cruce,  $\delta$  ppm: 2,02-25,1, 4,31-51,0, 4,49-73,1, 5,20-98,6, 6,34-122,0, 9,21-189,0;

RMN DOSY (D<sub>2</sub>O),  $\log D$  ((2,02, Ac-NH-), (4,31, H<sub>2</sub>), (4,49, H<sub>3</sub>), (5,20, H<sub>1</sub>), (6,34, H<sub>4</sub>), (9,21, H<sub>6</sub>))  $\sim -10,3 \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ ,  $\log D$  (4,72, H<sub>2</sub>O)  $\sim -8,6 \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ ;

IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 1725, 1650 ( $\nu$  C=O st), 1615, 1663 ( $\nu$  C=C st);

UV/Vis (0,1%, H<sub>2</sub>O);  $\lambda_{\text{max}1,2}$  (C <sub>$\beta$</sub> =C <sub>$\alpha$</sub> -C=O) = 254 nm ( $\pi \rightarrow \pi^*$ ), 300-350 (n  $\rightarrow$   $\pi^*$ ).

## 15 Ejemplo 2

Preparación de aldehído  $\alpha, \beta$ -insaturado de sulfato de condroitina

Se añadió gradualmente una disolución acuosa de hipoclorito de sodio (0,4eq, 11% de cloro activo) en una disolución acuosa al 2% de sulfato de condroitina (200 mg,  $M_w = 4,5 \times 10^4 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ) enfriada a 5°C, que contenía dodecahidrato de fosfato disódico (2,2eq), bromuro de sodio (0,4eq) y 4-AcNH-TEMPO (0,01%). La mezcla se agitó durante 2 horas a 5°C. Después se añadió etanol (10eq) a la reacción, que se agitó durante una hora adicional a temperatura ambiente. El producto se aisló por precipitación con IPA y se analizó por RMN.

DS=2% (determinado por RMN),  $M_w = 2,8 \times 10^4 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$  (determinado por SEC MALLS). El análisis estructural del producto se presenta en el Ejemplo 1.

## Ejemplo 3

25 Preparación de aldehído  $\alpha, \beta$ -insaturado de sulfato de condroitina

Se añadió gradualmente una disolución acuosa de hipoclorito de sodio (1eq, 11% de cloro activo) en una disolución acuosa al 2% de sulfato de condroitina (200 mg,  $M_w = 4,5 \times 10^4 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ) enfriada a 5°C, que contenía fosfato disódico dodecahidrato (2,2eq), bromuro de sodio (1eq) y 4-AcNH-TEMPO (0,01%). La mezcla se agitó durante 2 horas a 5°C. Se añadió después etanol (10eq) a la reacción, que se agitó durante una hora adicional a temperatura ambiente. El producto se aisló por precipitación con IPA y se analizó por RMN.

DS=21% (determinado por RMN),  $M_w = 2,0 \times 10^4 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$  (determinado por SEC MALLS). El análisis estructural del producto se presenta en el Ejemplo 1.

## Ejemplo 4

Preparación de aldehído  $\alpha, \beta$ -insaturado de sulfato de condroitina

35 Se añadió gradualmente una disolución acuosa de hipoclorito de sodio (2eq, 11% de cloro activo) en una disolución acuosa al 2% de sulfato de condroitina (200 mg,  $M_w = 4,5 \times 10^4 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ) enfriada a 5°C, que contenía fosfato disódico dodecahidrato (2,2eq), bromuro de sodio (2eq) y 4-AcNH-TEMPO (0,01%). La mezcla se agitó durante 2 horas a 5°C. Después se añadió etanol (10eq) a la reacción, que se agitó durante una hora adicional a temperatura ambiente. El producto se aisló por precipitación con IPA y se analizó por RMN.

40 DS=21% (determinado por RMN),  $M_w = 1,8 \times 10^4 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$  (determinado por SEC MALLS). El análisis estructural del producto se presenta en el Ejemplo 1.

## Ejemplo 5

Preparación de aldehído  $\alpha, \beta$ -insaturado de sulfato de dermatán

45 Se añadió gradualmente una disolución acuosa de hipoclorito de sodio (0,8eq, 11% de cloro activo) en una disolución acuosa al 2% de sulfato de dermatán (200 mg, 0,42mol) enfriada a 5°C, que contenía fosfato disódico dodecahidrato (2,2eq), bromuro de sodio (0,8eq) y 4-AcNH-TEMPO (0,01%). La mezcla se agitó durante 2 horas a

5°C. Después se añadió etanol (10 eq) a la reacción, que se agitó durante una hora adicional a temperatura ambiente. El producto se aisló por precipitación con IPA y se analizó por RMN.

DS=20% (determinado por RMN)

5 Análisis espectral de aldehído  $\alpha,\beta$ -insaturado de sulfato de dermatán: RMN<sup>1</sup>H (500 MHz, D<sub>2</sub>O,  $\delta$  ppm): 2,01 (3H, Ac-NH-, bs), 6,30 (1H, H<sub>4</sub>, bs), 9,20 (1H, H<sub>6</sub>, bs).

Ejemplo 6

Preparación de aldehído  $\alpha,\beta$ -insaturado de carragenina

10 Se añadió gradualmente una disolución acuosa de hipoclorito de sodio (0,8 eq, 11% de cloro activo) en una disolución acuosa al 1% de carragenina (200 mg, 0,31 mol) enfriada a 10°C, que contiene fosfato disódico dodecahidrato (2,2 eq), bromuro de sodio (0,8 eq) y 4-AcNH-TEMPO (0,01%). La mezcla se agitó durante 2 horas a 10°C. Después se añadió etanol (10 eq) a la reacción, que se agitó durante una hora adicional a temperatura ambiente. El producto se aisló por precipitación con IPA y se analizó por RMN.

DS=10% (determinado por RMN)

15 Análisis espectral de aldehído  $\alpha,\beta$ -insaturado de carragenina: RMN<sup>1</sup>H (500 MHz, D<sub>2</sub>O,  $\delta$  ppm): 6,30 (1H, H<sub>4</sub>, bs), 9,20 (1H, H<sub>6</sub>, bs)

Ejemplo 7

Unión de hidrazina a aldehído  $\alpha,\beta$ -insaturado de sulfato de condroitina

20 Se añadió hidrato de hidrazina (2 eq) a una disolución al 2% de aldehído  $\alpha,\beta$ -insaturado de sulfato de condroitina (20 mg, DS = 23%, Mw = 2,1x10<sup>4</sup> g.mol<sup>-1</sup>) en D<sub>2</sub>O. La reacción se agitó durante 24 h a temperatura ambiente. El producto se analizó en la forma de una mezcla de reacción cruda.

DS = 20% (determinado por RMN)

RMN<sup>1</sup>H (500 MHz, D<sub>2</sub>O,  $\delta$  ppm): 5,40 (1H, -CH=C-CH=N-, bs), 7,38 (1H, -CH=C-CH=N-, bs)

Ejemplo 8

Unión de butilamina a aldehído  $\alpha,\beta$ -insaturado de sulfato de condroitina

25 Método 1: Se añadió butilamina (0,2 eq) a una disolución al 2% de aldehído  $\alpha,\beta$ -insaturado de sulfato de condroitina (20 mg, DS = 23%, Mw = 2,1x10<sup>4</sup> g.mol<sup>-1</sup>) en D<sub>2</sub>O. La reacción se agitó durante 24 horas a temperatura ambiente y pH = 11,20. El producto se analizó en la forma de una mezcla de reacción cruda.

DS = 20% (determinado por RMN)

RMN<sup>1</sup>H (500 MHz, D<sub>2</sub>O,  $\delta$  ppm): 5,67 (1H, -CH=C-CH=N-, bs), 7,74 (1H, -CH=C-CH=N-, bs)

30 Método 2: Se añadió ácido acético deuterado (14,5  $\mu$ L) a una muestra de RMN del Método 1. El pH medido fue de 4,10 y la muestra se analizó por RMN.

DS = 0% (determinado por RMN)

Ejemplo 9

Unión de butilamina a aldehído  $\alpha,\beta$ -insaturado de sulfato de condroitina

35 Se añadió butilamina (0,2 eq) a una disolución al 2% de aldehído  $\alpha,\beta$ -insaturado de sulfato de condroitina (20 mg, DS = 23%, Mw = 2,1x10<sup>4</sup> g.mol<sup>-1</sup>) en PBS deuterado. La reacción se agitó durante 24 h a temperatura ambiente y pH = 7,30. El producto se analizó en la forma de una mezcla de reacción cruda.

DS = 0% (determinado por RMN)

Ejemplo 10

40 Unión de hexano-1,6-diamina a aldehído  $\alpha,\beta$ -insaturado de sulfato de condroitina

Se añadió hexano-1,6-diamina (0,5 eq) a una disolución al 2% de aldehído  $\alpha,\beta$ -insaturado de sulfato de condroitina (20 mg, DS = 23%, Mw = 2,1x10<sup>4</sup> g.mol<sup>-1</sup>) en D<sub>2</sub>O. La reacción se agitó durante 24 h a temperatura ambiente y pH = 11,60. El producto se analizó en la forma de una mezcla de reacción cruda.

DS = 20%(determinado por RMN)

RMN<sup>1</sup>H (500 MHz, D<sub>2</sub>O, δppm): 5,68(1H, -CH=C-CH=N-,bs),7,74(1H, -CH=C-CH =N-,bs)

Ejemplo 11

La unión de propoxiaminaaldehído α,β-insaturado de sulfato de condroitina

- 5 Se añadió clorhidrato de propoxiamina (0,5eq) a una disolución al 2% de aldehído α,β-insaturado de sulfato de condroitina (20 mg, DS = 23%, Mw = 2,1x10<sup>4</sup>g.mol<sup>-1</sup>) en D<sub>2</sub>O. La reacción se agitó durante 24 h a temperatura ambiente y pH = 3,90. El producto se analizó en la forma de una mezcla de reacción cruda.

DS = 20%(determinado por RMN)

RMN<sup>1</sup>H (500 MHz, D<sub>2</sub>O, δppm): 5,57 y 6,88(1H, -CH = C-CH = N-,bs), 7,52 y 7,70(1H, -CH = CCH = N-,bs)

10 Ejemplo 12

Unión de lisinaalaldehído α,β-insaturado de sulfato de condroitina

Se añadió clorhidrato de lisina (0,5eq) a una disolución al 2% de aldehído α,β-insaturado de sulfato de condroitina (20 mg, DS = 23%, Mw = 2,1x10<sup>4</sup>g.mol<sup>-1</sup>) en PBS deuterado. La reacción se agitó durante 24 h a temperatura ambiente y pH = 7,46. El producto se analizó en la forma de una mezcla de reacción cruda.

- 15 DS = 4% (determinado por RMN)

RMN<sup>1</sup>H (500 MHz, D<sub>2</sub>O, δppm): 5,69-5,75(1H, -CH=C-CH = N-,bs), 7,70-7,75(1H, -CH=CCH= N-,bs)

Ejemplo 13

Unión de lisinaalaldehído α,β-insaturado de sulfato de condroitina

- 20 Se añadió clorhidrato de lisina (0,5eq) a una disolución al 2% de aldehído α,β-insaturado de sulfato de condroitina (20 mg, DS = 23%, Mw = 2,1x10<sup>4</sup>g.mol<sup>-1</sup>) en D<sub>2</sub>O. El pH de la reacción se ajustó a 8,40 añadiendo bicarbonato de sodio (2eq). La reacción se agitó durante 24 h a temperatura ambiente. El producto se analizó en la forma de una mezcla de reacción cruda.

DS = 7%(determinado por RMN)

El análisis estructural se presenta en el Ejemplo 12.

25 Ejemplo 14

Unión del péptido RGDalaldehído α,β-insaturado de sulfato de condroitina

Se añadió péptido RGD (0,2eq, secuencia Ahx-Gly-Arg-GlyAsp-NH<sub>2</sub>) a una disolución al 2% de aldehído α,β-insaturado de sulfato de condroitina (20 mg, DS = 23%, Mw = 2,1x10<sup>4</sup>g.mol<sup>-1</sup>) en D<sub>2</sub>O. La reacción se agitó durante 24 horas a temperatura ambiente y pH = 4,22. El producto se analizó en la forma de una mezcla de reacción cruda.

- 30 DS = 0% (determinado por RMN)

Ejemplo 15

Unión del péptido RGDalaldehído α,β-insaturado de sulfato de condroitina

- 35 Se añadió péptido RGD (0,2eq, secuencia Ahx-Gly-Arg-GlyAsp-NH<sub>2</sub>) a una disolución al 2% de aldehído α,β-insaturado de sulfato de condroitina (20 mg, DS = 23%, Mw = 2,1x10<sup>4</sup>g.mol<sup>-1</sup>) en PBS deuterado. La reacción se agitó durante 24 h a temperatura ambiente y pH = 7,22. El producto se analizó en la forma de una mezcla de reacción cruda.

DS = 4%(determinado por RMN)

RMN<sup>1</sup>H (500 MHz, D<sub>2</sub>O, 3 ppm): 5,68(1H, -CH=C-CH=N-,bs), 7,74(1H, -CH=C-CH=N-,bs)

Ejemplo 16

- 40 Unión del péptido RGDalaldehído α,β-insaturado de sulfato de condroitina

Se añadió péptido RGD (0,2eq, secuencia Ahx-Gly-Arg-GlyAsp-NH<sub>2</sub>) a una disolución al 2% de aldehído α,β-insaturado de sulfato de condroitina (20 mg, DS = 23%, Mw = 2,1x10<sup>4</sup>g.mol<sup>-1</sup>) en D<sub>2</sub>O. El pH de la reacción se ajustó a 10,49

## ES 2 742 208 T3

añadiendo bicarbonato de sodio (2eq).La reacción se agitó durante 24 h a temperatura ambiente.El producto se analizó en la forma de una mezcla de reacción cruda.

DS = 20%(determinado por RMN)

El análisis estructural se presenta en el Ejemplo 15.



Ejemplo 17

Unión de anilinaa aldehído  $\alpha,\beta$ -insaturado de sulfato de condroitina

5 Se añadió anilina (0,3eq) a una disolución al 2% dealdehído  $\alpha,\beta$ -insaturado de sulfato de condroitina (20 mg, DS = 23%,  $M_w = 2,1 \times 10^4 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ) en  $\text{D}_2\text{O}$ . El pH de la reacción se ajustó a 4,22 añadiendo ácido acético deuterado (8,8  $\mu\text{L}$ ). La reacción se agitó durante 24 h a temperatura ambiente. El producto se analizó en la forma de una mezcla de reacción bruta.

DS = 0% (determinado por RMN)

Ejemplo 18

Unión de anilinaa aldehído  $\alpha,\beta$ -insaturado de sulfato de condroitina

10 Se añadió anilina (0,3eq) a una disolución al 2% dealdehído  $\alpha,\beta$ -insaturado de sulfato de condroitina (20 mg, DS = 23%,  $M_w = 2,1 \times 10^4 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ) en PBS deuterado. La reacción se agitó durante 24 h a temperatura ambiente y pH = 7,42. El producto fue analizado en la forma de una mezcla de reacción cruda.

DS = 5% (determinado por RMN)

RMN<sup>1</sup>H (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ,  $\delta$ ppm): 5,93 (1H,  $-\underline{\text{C}}=\text{C}-\text{CH}=\text{N}$ -, bs), 8,03 (1H,  $-\text{CH}=\text{C}-\underline{\text{C}}=\text{N}$ -, bs)

15 Ejemplo 19

Unión de anilinaa aldehído  $\alpha,\beta$ -insaturado de sulfato de condroitina

Se añadió anilina (0,3eq) a una disolución al 2% de aldehído  $\alpha,\beta$ -insaturado de sulfato de condroitina (20 mg, DS = 23%,  $M_w = 2,1 \times 10^4 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ) en  $\text{D}_2\text{O}$ . Se ajustó el pH de la reacción a 10,73 añadiendo carbonato de sodio. La reacción se agitó durante 24 h a temperatura ambiente. El producto se analizó en la forma de una mezcla de reacción cruda.

20 DS = 25% (determinado por RMN)

El análisis estructural se presenta en el Ejemplo 18.

Ejemplo 20

Unión de adipato de dihidrazidaa aldehído  $\alpha,\beta$ -insaturado de sulfato de condroitina

25 Se añadió adipato de dihidrazida (3eq) a una disolución al 2% dealdehído  $\alpha,\beta$ -insaturado de sulfato de condroitina (20 mg, DS = 23%,  $M_w = 2,1 \times 10^4 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ) en  $\text{D}_2\text{O}$ . La reacción se agitó durante 24 h a temperatura ambiente y pH = 7,50. El producto se analizó en la forma de una mezcla de reacción cruda.

DS = 20% (determinado por RMN)

30 RMN<sup>1</sup>H (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ,  $\delta$ ppm): 1,64 (4H,  $\text{DHA}_{2,3}$ , bs), 2,04 (3H, Ac-NH-, bs), 2,34 (4H,  $\text{DHA}_{1,4}$ , bs), 4,28 (1H, H<sub>2</sub>, bs), 4,36 (1H, H<sub>3</sub>, bs), 5,20 (1H, H<sub>1</sub>, bs), 5,62 (1H, H<sub>4</sub>cis, bs), 5,68 (1H, H<sub>4</sub>trans, bs), 7,52-7,48 (1H, H<sub>6</sub>cis, bs), 7,61 (1H, H<sub>6</sub>trans, bs);

RMN<sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC ( $\text{D}_2\text{O}$ ), picos de cruce,  $\delta$ ppm: 1,64-2,34, 4,28-5,20, 4,36-5,68; RMN<sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC

( $\text{D}_2\text{O}$ ), picos de cruce,  $\delta$ ppm: 1,64-24,9, 2,34-34,1, 4,28-51,0, 4,36-73,6, 5,20-98,8, 5,68-111,3, 7,61-148,5;

RMN DOSY ( $\text{D}_2\text{O}$ ), log D ((2,04, Ac-NH-), (4,28, H<sub>2</sub>), (4,36, H<sub>3</sub>), (5,20, H<sub>1</sub>), (5,62 y 5,68, H<sub>4</sub>cis/trans), (7,52 y 7,68, H<sub>6</sub>cis/trans))  $\sim -10,4 \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ ; log D (4,72, H<sub>2</sub>O)  $\sim -8,6 \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ ; IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 1640-1650 ( $\nu$  -C=N-st);

35 UV/Vis (0,1%,  $\text{H}_2\text{O}$ );  $\lambda_{\text{max}1,2}(-\text{C}=\text{N}-) = 280 \text{ nm}$  ( $\pi \rightarrow \pi^*$ ).

Ejemplo 21

Reticulación de aldehído  $\alpha,\beta$ -insaturado de sulfato de condroitina con adipato de dihidrazida

40 Se añadió adipato de dihidrazida (0,12eq, relación de sitios de unión 1:1) en PBS a una disolución al 8% dealdehído  $\alpha,\beta$ -insaturado de sulfato de condroitina (40 mg, DS = 23%,  $M_w = 2,1 \times 10^4 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ) en PBS (pH = 7,40, c = 0,9% p/v). Después de la adición de la disolución de adipato de dihidrazida, la gelificación tuvo lugar en tiempo (T<sub>g</sub> = 34 s). El gel elástico se fotografió (Fig. 1), se liofilizó, y se analizó por SEM (Fig. 2).

Módulo de elasticidad de Young en compresión =  $9 \times 10^3 \text{ Pa}$

Máxima resistencia en compresión =  $64 \times 10^3 \text{ Pa}$

Deformación al límite elástico = 64%

Tenacidad =  $3668 \text{ J.m}^{-3}$

Ejemplo 22

Reticulación de aldehído  $\alpha,\beta$ -insaturado de sulfato de dermatán con adipato de dihidrazida

- 5 Se añadió adipato de dihidrazida (0,1 eq, relación de sitios de unión 1:1) en PBS a una disolución al 8% de aldehído  $\alpha,\beta$ -insaturado de sulfato de dermatán (40 mg, DS = 20%,  $M_w \leq 40 \text{ kDa}$ ) en PBS (pH = 7,40, c = 0,9% p/v). Después de la adición de la disolución de adipato de dihidrazida, procedió la gelificación.

Ejemplo 23

Reticulación de aldehído  $\alpha,\beta$ -insaturado de carragenina con adipato de dihidrazida

- 10 Se añadió 40  $\mu\text{L}$  de adipato de dihidrazida (0,05 eq) en PBS a una disolución al 8% de aldehído  $\alpha,\beta$ -insaturado de carragenina (40 mg, DS = 10%,  $M_w \leq 50 \text{ kDa}$ ) en PBS (pH = 7,40, c = 0,9% p/v). Después de la adición de la disolución de adipato de dihidrazida, la viscosidad aumentó.

Ejemplo 24

Reticulación de aldehído  $\alpha,\beta$ -insaturado de sulfato de condroitina con un derivado de hidrazida de ácido hialurónico

- 15 Una disolución al 4% de derivado de hidrazida de ácido hialurónico (9,2 mg, DS = 25%,  $M_w = 138 \times 10^3 \text{ g.mol}^{-1}$ ) en PBS (pH = 7,4, c = 0,9% p/v) se añadió a una disolución al 4% de aldehído  $\alpha,\beta$ -insaturado de sulfato de condroitina (10 mg, DS = 23%,  $M_w = 2,1 \times 10^4 \text{ g.mol}^{-1}$ ) en PBS. Después de mezclar las soluciones, la gelificación tuvo lugar en tiempo (T<sub>g</sub> = 109 s).

Módulo de elasticidad de Young en compresión =  $6 \times 10^3 \text{ Pa}$

- 20 Máxima resistencia en compresión =  $840 \times 10^3 \text{ Pa}$

Deformación al límite elástico = 96%

Tenacidad =  $11978 \text{ J.m}^{-3}$

Ejemplo 25

Reticulación de aldehído  $\alpha,\beta$ -insaturado de sulfato de condroitina con ácido hialurónico desacetilado

- 25 Una disolución al 2% de ácido hialurónico desacetilado (2 eq, DS = 11%,  $M_w = 116 \text{ kDa}$ , relación de sitios de unión 1:1) en PBS (pH = 7,4, c = 0,9% p/v) se añadió a una disolución al 4% de aldehído  $\alpha,\beta$ -insaturado de sulfato de condroitina (10 mg, DS = 23%,  $M_w = 2,1 \times 10^4 \text{ g.mol}^{-1}$ ) en PBS (pH = 7,40, c = 0,9% p/v). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente, en donde se observó un aumento de la viscosidad después de 0,5 h, y se formó un gel elástico después de 1 h.

- 30 Módulo de elasticidad de Young en compresión =  $3 \times 10^3 \text{ Pa}$

Máxima resistencia en compresión =  $395 \times 10^3 \text{ Pa}$

Deformación al límite elástico = 95%

Tenacidad =  $14670 \text{ J.m}^{-3}$

Ejemplo 26

- 35 Preparación de la forma ácida del sulfato de condroitina

Se preparó una disolución al 1% de sulfato de condroitina (500 mg, 1,1 mmol) en agua destilada. La disolución se enfrió a 5°C y se añadió catex Amberlite IR 120 Na (H<sup>+</sup>). La mezcla de reacción se agitó durante 24 h a 5°C. Se filtró el catex, y el producto se congeló y se liofilizó. Su solubilidad en DMSO se sometió a ensayo y se encontró satisfactoria.

- 40 Ejemplo 27

Preparación de sulfato de condroitina desacetilado

Se preparó una disolución al 1% de la forma ácida del sulfato de condroitina (200 mg, 0,44 mmol,  $M_w \leq 40 \text{ kDa}$ ) en DMSO. La disolución se desgasificó mediante una corriente de nitrógeno. Se añadieron 10,6 ml de hidrato de

hidrazinay 3 eq de sulfato de hidrazina.La mezcla de reacción se agitó durante 24 ha 60°Cen nitrógeno.Luego se añadió NaHCO<sub>3</sub> a la mezcla de reacción.El producto se aisló por precipitación con IPA.

DS = 10% (determinado por RMN), Mw = 1,8x10<sup>4</sup>g.mol<sup>-1</sup>(determinado porSECMALLS)

5 RMN<sup>1</sup>H (500 MHz, 1%NaODv D<sub>2</sub>O,δppm): 3,01(1H, -CH = C-CH = N-,bs)HSQC (500MHz, D<sub>2</sub>O,δppm):pico de cruce:3,42-52,2 ppm

Ejemplo 28

Reticulación dealdehído α,β-insaturado de sulfato de condroitina consulfato de condroitinadesacetilado

10 Una disolución al 8% desulfato de condroitinadesacetilado(2eq,DS = 10%, Mw = 1,8x10<sup>4</sup>g.mol<sup>-1</sup> en una relación de sitios de unión= 1/0,85) en PBS (pH = 7,4, c = 0,9% p/v) se añadió a una disolución al 8% de aldehído α,β-insaturado de sulfato de condroitina (20 mg, DS = 23%, Mw = 2,1x10<sup>4</sup>g.mol<sup>-1</sup>)enPBS (pH = 7,4, c = 0,9% p/v).La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente, en donde se observó un aumento de la viscosidad después de 0,5 h, y se formó un gel elástico después de 3 h.

Módulo de elasticidad de Young en compresión = 3x10<sup>3</sup> Pa

Máxima resistenciaencompresión = 774x10<sup>3</sup>Pa

15 Deformación al límite elástico = 95%

Tenacidad = 16489 J.m<sup>-3</sup>

Ejemplo29

Reticulacióndealdehído α,β-insaturado de sulfato de condroitina conpropoxiamina

20 Una disolución PBS declorhidrato de propoxiamina(0,12eq,relación de sitios de unión = 1/1) se añadióauna disolución al 10%dealdehído α,β-insaturado de sulfato de condroitina (50 mg, DS = 23%, Mw = 2,1x10<sup>4</sup>g.mol<sup>-1</sup>)en PBS (pH = 7,40, c = 0,9% p/v), en donde se formó un gel en tiempo (Tg=110s).

Módulo de elasticidad de Young en compresión = 8x10<sup>3</sup>Pa

Máxima resistenciaencompresión = 74x10<sup>3</sup>Pa

Deformación al límite elástico = 65%

25 Tenacidad = 3768 J.m<sup>-3</sup>

Ejemplo 30

Medición de la cinética de gelificación de la reacción de reticulacióndealdehído α,β-insaturado desulfato decondroitinaconderivado aminopropoxilode ácido hialurónico

30 La medición de la cinética de gelificación se realizó mediante una muestra al 4% dealdehído α,β-insaturado de sulfato de condroitina (10 mg, DS = 23%, Mw = 2,1x10<sup>4</sup>g.mol<sup>-1</sup>)enPBS (pH = 7,40, c = 0,9% p/v) con una disolución al 4% dederivadoaminopropoxilodel ácido hialurónico (1 eq, DS = 25%, Mw = 66kDa)enPBS (pH = 7,4, c = 0,9% p/v).Se determinó que el tiempo de gelificación, es decir, laetapa, cuando se formó la primera red macroscópica de gel, fue (Tg= 97s, Fig. 4).

Ejemplo 31

35 Comparación de las propiedades mecánicas de los hidrogeles basados en el aldehído α,β-insaturado reticuladode sulfato de condroitina yel aldehído α,β-insaturadoreticuladode hialuronano

Solución 1: disolución al 4% dealdehído α,β-insaturado de sulfato de condroitina (DS = 23%, Mw = 2,1x10<sup>4</sup>g.mol<sup>-1</sup>, Ejemplo 1) en PBS (pH = 7,40, c = 0,9% p/v).

40 Solución 2: disolución al 4%dealdehído α,β-insaturado de ácido hialurónico (DS = 7%, Mw =2,5x10<sup>4</sup>g.mol<sup>-1</sup>)en PBS (pH = 7,40, c = 0,9% p/v).

Solución 3: disolución al 4% dederivadodeaminopropoxilode ácido hialurónico (DS = 25%, Mw = 66kDa) en PBS (pH = 7,40, c = 0,9% p/v).

45 Los hidrogeles se prepararon a partir de dichas soluciones mezclando sus relaciones de volumen equivalentes en las siguientes combinaciones: disolución 1+ disolución 3 (muestra A) y disolución 2+ disolución 3(muestra B).Las muestras A y B se dejaron madurar a temperatura ambiente durante 3 horas.Después se midieron las propiedades

mecánicas de los materiales, a saber, el módulo de Young de elasticidad en compresión, máxima resistencia en compresión, y la deformación al límite elástico (Tabla 2).

Tabla 2: Comparación de las propiedades mecánicas de los hidrogeles basados en aldehídos  $\alpha,\beta$ -insaturados reticulados derivados de sulfato de condroitina y ácido hialurónico

Muestra	Módulo de Young de elasticidad en compresión (kPa)	Máxima resistencia en compresión (kPa)	Elongación al límite elástico (%)
A	11	30	52
B	7	58	76

10 Los datos medidos indican las ventajas del uso del material de un mayor grado de sustitución en el derivado de sulfato de condroitina (muestra A), debido a que los hidrogeles preparados a partir de este derivado tienen una mayor rigidez y muestran una menor tasa de deformación en comparación con el derivado del ácido hialurónico (muestra B). Como las muestras eran del mismo peso molecular y se analizaron en las mismas condiciones, este hecho parece ser la consecuencia de una mayor densidad de reticulación y se correlaciona directamente, mientras se mantiene el mismo peso molecular, con el mayor grado de sustitución del aldehído  $\alpha,\beta$ -insaturado en la estructura del polisacárido modificado.

Ejemplo 32

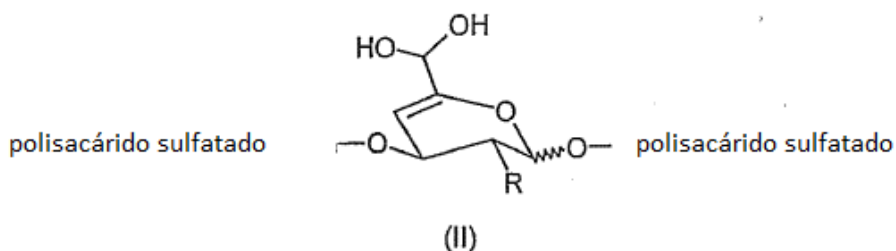
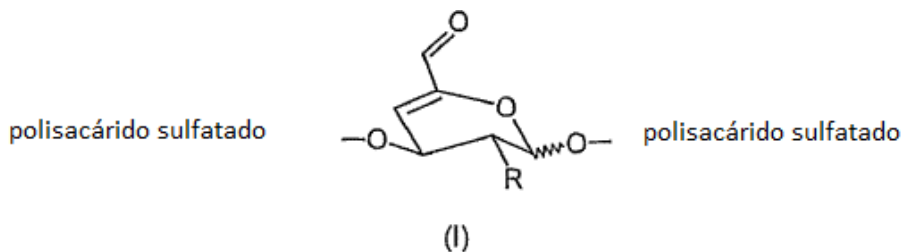
15 Ensayos de viabilidad de fibroblastos 3T3 en presencia de aldehído  $\alpha,\beta$ -insaturado de sulfato de condroitina

20 La sustancia ensayada, aldehído  $\alpha,\beta$ -insaturado de sulfato de condroitina (DS=20%, Mw=40kDa), se disolvió en un medio 3T3 completo. La disolución se filtró a través de un filtro de 0,22  $\mu\text{m}$ . Las concentraciones de ensayo finales de la disolución ensayada fueron 10, 100, 500 y 1000  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Se inocularon células 3T3 de la densidad de 3000 células por pocillo en placas de 96 pocillos. Antes del tratamiento, las células se cultivaron durante 24 horas en un medio completo. La viabilidad celular se evaluó por espectrofotometría por medio de bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazolio (método MTT) en los intervalos de 0, 24, 48,72 horas. El experimento se complementó con un conjunto de controles no tratados y muestras en blanco.

25 Los datos de densidad óptica medida se convirtieron en porcentaje de formulación con relación al control en las horas de tiempo T0 (la relación de la densidad óptica de la muestra tratada con respecto a la densidad óptica del control no tratado T0, multiplicada por 100) y se calculó el error estándar de la media (SEM). Los resultados de la prueba se presentan gráficamente en la Fig. 3.

REIVINDICACIONES

1. Un derivado de un polisacárido sulfatado que tiene como una parte de su cadena de polímero al menos un anillo de galactopiranosamodificado según la fórmula general I o II, conteniendo dicho anillo un doble enlace en la 4ª y 5ª posición en una conjugación con un aldehído en la 6ª posición según la fórmula general I o adyacente a su forma hidratada según la fórmula general II.



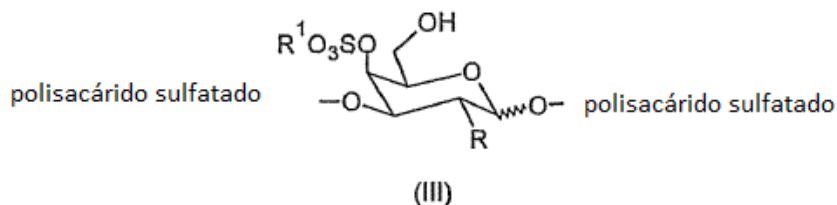
donde

R es OH, O-SO<sub>2</sub>-OH, O-SO<sub>2</sub>-ONa o NH-Ac.

10 2. El derivado de un polisacárido sulfatado según la reivindicación 1, caracterizado porque el polisacárido se selecciona del grupo que comprende sulfato de condroitina, sulfato de dermatán, carragenina y sus derivados y/o sales farmacéuticamente aceptables.

3. El derivado de un polisacárido sulfatado según la reivindicación 1 o 2, caracterizado porque el polisacárido tiene el peso molecular dentro del intervalo de 1x10<sup>3</sup> a 5x10<sup>4</sup> g.mol<sup>-1</sup> y el grado de sustitución dentro del intervalo de 1 a 40%, preferiblemente 10 a 25%.

15 4. Un método de preparación de los derivados de polisacáridos sulfatados según las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque el polisacárido sulfatado, que es soluble en agua en su forma nativa y que contiene al menos una unidad de galactopiranosulfatada en la 4ª posición que se une vía enlace O-glicosídico α(1→3) o β(1→3) en la cadena de polímero, según la fórmula estructural general (III).



20 donde

R es OH, O-SO<sub>2</sub>-OH, O-SO<sub>2</sub>-ONa o NH-C(O)CH<sub>3</sub>, R<sup>1</sup> es HO<sub>2</sub>Na, se oxida a un aldehído en la 6ª posición, e inmediatamente después de la oxidación la mezcla de reacción se somete a eliminación en la misma mezcla de reacción para formar el derivado del polisacárido sulfatado definido en las reivindicaciones 1 a 3.

25 5. El método de preparación según la reivindicación 4, caracterizado porque se utiliza un polisacárido sulfatado del peso molecular dentro del intervalo de 1x10<sup>4</sup> a 5x10<sup>6</sup> g.mol<sup>-1</sup>.

- 6.El método de preparación según las reivindicaciones 4 o 5, caracterizado porque se utiliza un polisacárido sulfatado seleccionado del grupo que comprende sulfato de condroitina,sulfato de dermatán, carragenina y sus derivados y/osaes farmacéuticamente aceptables.
- 5 7.El método de preparación según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6,caracterizado porque la oxidación se realiza mediante el sistema  $R^3$ -TEMPO/NaClO, en donde  $R^3$  es hidrógeno o N-acetilo, en agua o en una disolución acuosa de sales inorgánicas, a una temperatura de 5 a 25°C.
- 10 8.El método de preparación según la reivindicación 7,caracterizado porque la cantidad molar de  $R^3$ -TEMPO es de 0,01 a 0,2 equivalentes y la cantidad molar de NaClO está dentro del intervalo de 0,1 a 2,0 equivalentes con respecto a un dímero del polisacárido sulfatado, y/o la disolución acuosa de sales inorgánicas es una disolución acuosa que contiene una sal de metal alcalino y/o un tampón, p. ej., el tampón fosfato.
- 9.El método de preparación según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8,caracterizado porque la eliminación se desarrolla a una temperatura de 5 a 25°C, y sin el aislamiento del aldehído C6 saturado en la subunidad de galactopiranosasulfatada en la 4ª posición.
- 15 10.Un método de modificación del derivado definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3,caracterizado porque el derivado reacciona con una amina según la fórmula general  $R^2-NH_2$ , en donde  $R^2$  es una cadena de alquilo, arilo, heterilo, lineal o ramificada de  $C_{12}$  a  $C_{30}$ , que opcionalmente contiene átomos de N, S u O.
- 20 11. El método de modificación según la reivindicación 10,caracterizado porque la amina es una amina biológicamente activa, principalmente un aminoácido o un péptido, o un polímero biológicamente aceptable con un grupo amino libre.
- 25 12.El método de modificación según la reivindicación 11,caracterizado porque el grupo amino del polímero biológicamente aceptable con un grupo amino libre es una parte directa del polímero seleccionado del grupo que comprende gelatina, quitosano, ácido hialurónico desacetilado y sulfato de condroitina desacetilado, y/o porque el grupo amino del polímero biológicamente aceptable con un grupo amino libre está unido al polímero vía un enlazador que contiene un grupo amino, hidrazina, hidrazida, aminoalcoxi, hidroxilo, carboxilo, tiol, o cualquier combinación de los mismos.
- 30 13. El método de modificación según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12,caracterizado porque la cantidad de amina, aminoácido, péptido o grupos amino libres del polímero está dentro del intervalo de 0,05 a 3,0 equivalentes con respecto a un dímero del polisacárido sulfatado.
- 35 14. El método de modificación según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13,caracterizado porque la reacción con amina, aminoácido, péptido o polímero que contiene un grupo amino libre se desarrolla en agua, tampón fosfato o sistema de agua-disolvente orgánico a la temperatura dentro del intervalo de 20 a 60°C, durante 10 min a 150 h.
- 40 15. El método de modificación según la reivindicación 14,caracterizado porque el disolvente orgánico se selecciona del grupo que comprende alcoholes miscibles en agua, en particular isopropanol y etanol, y disolventes apróticos polares miscibles en agua, en particular dimetilsulfóxido, en donde el contenido de agua en la mezcla es al menos 50% en vol.
- 45 16. El método de modificación del derivado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3,caracterizado porque el derivado reacciona con N-nucleófilo bi y polifuncional biocompatible e hidrosoluble seleccionado del grupo que comprende alquilaminas, arilaminas, heteroalquilaminas, heterilaminas, aminoácidos, péptidos, polímeros con un grupo amino libre, hidrazinas, hidroxilaminas, hidrazidas, semicarbazidas y otiosemicarbazidas, en donde se produce la reticulación del derivado.
- 17.El método de modificación según la reivindicación 16,caracterizado porque el nucleófilo es hidrazida, polisacárido desacetilado, alcoxiamina, y porque la reacción procede en tampón fosfato.
- 18.El uso de los derivados según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, como portadores de sustancias biológicamente activas con liberación controlada mediante el cambio de valor de pH, en el campo de la cosmética y la farmacia.
- 19.El uso de los derivados modificados por el método según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 17, como materiales biocompatibles para aplicaciones biomédicas y la formación de armazones para ingeniería de tejidos, o para medicina regenerativa.

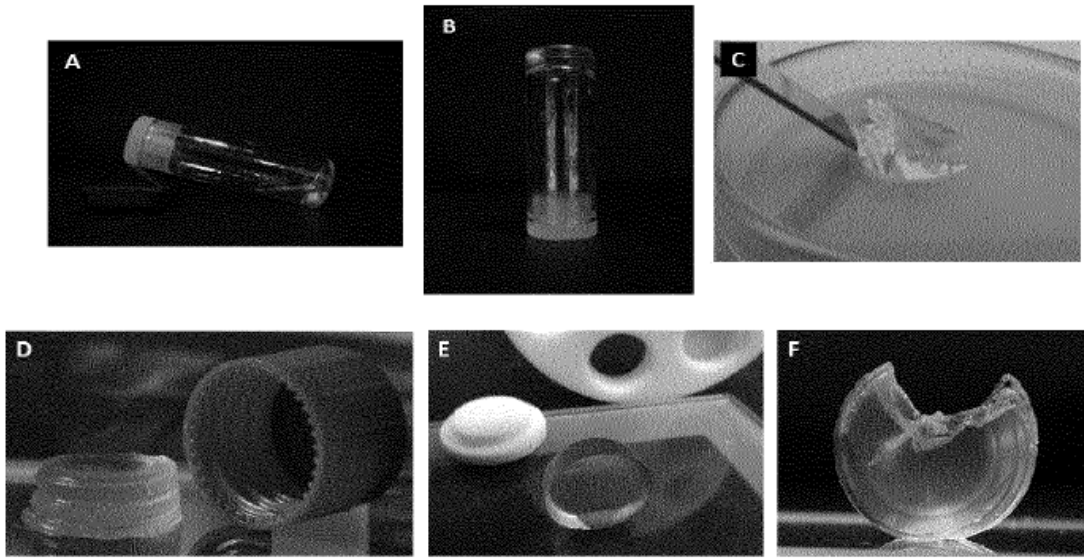


Fig. 1

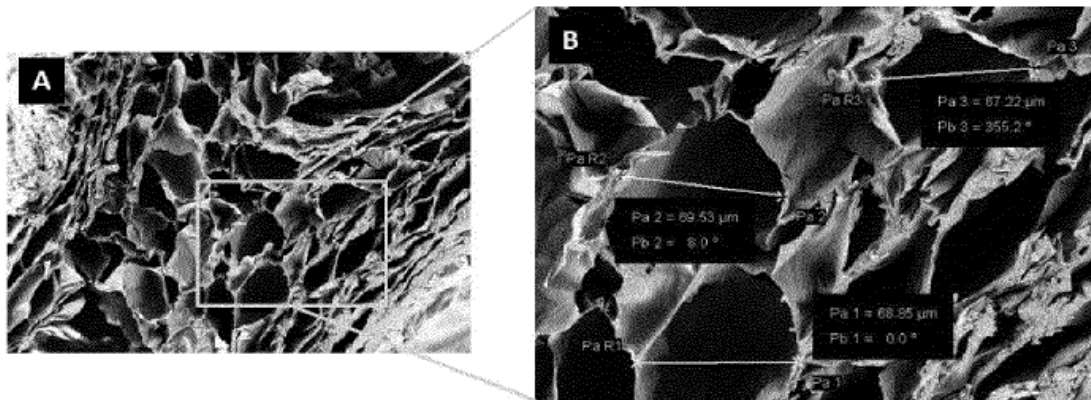


Fig. 2

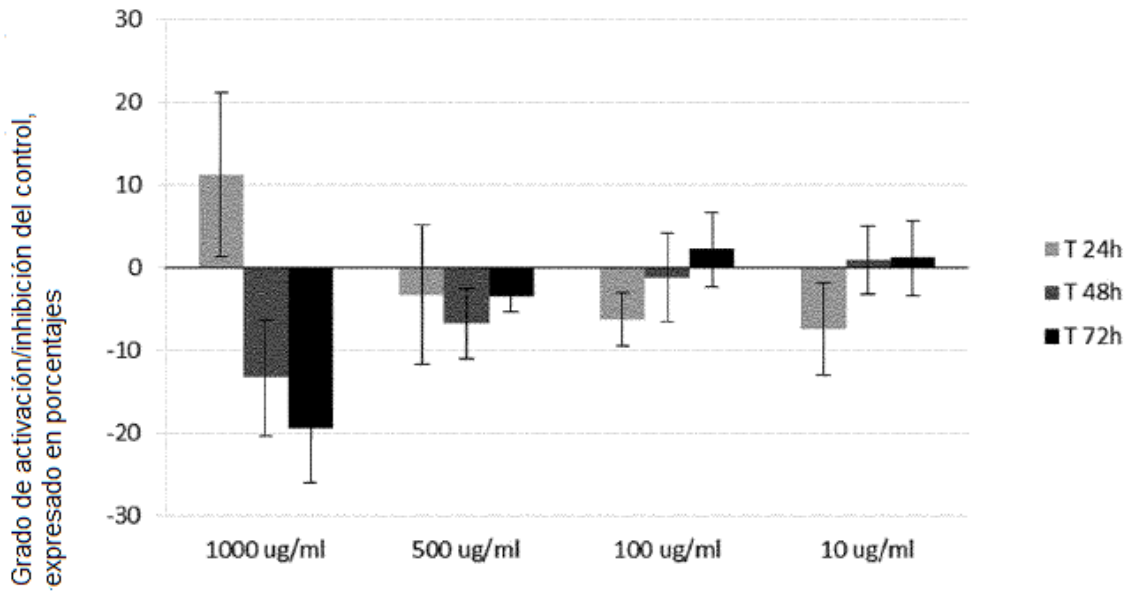


Fig. 3

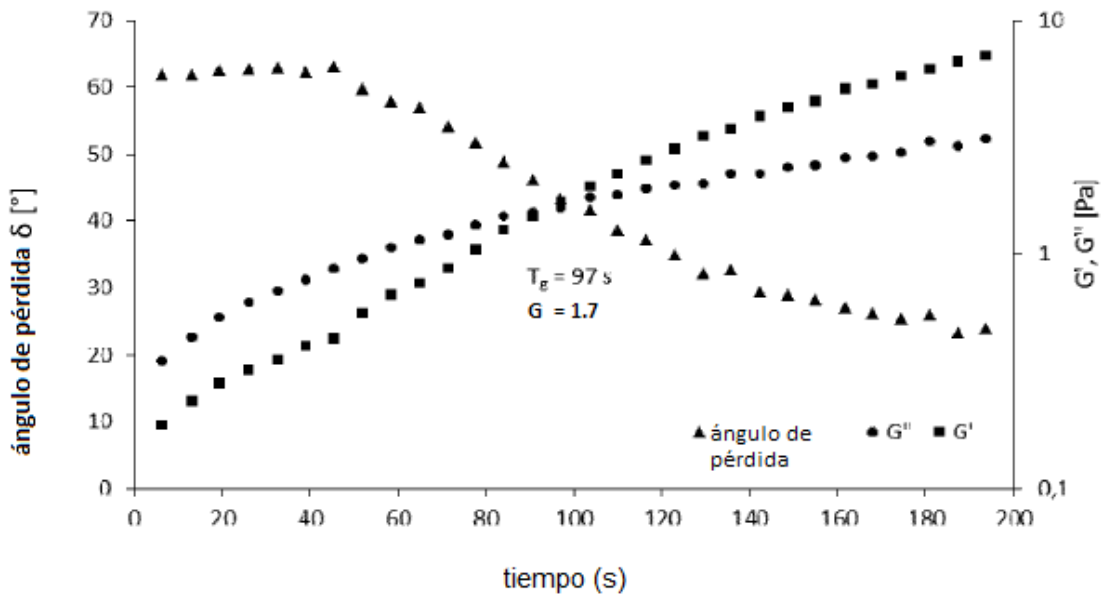


Fig. 4