



MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO
DIREZIONE GENERALE PER LA LOTTA ALLA CONTRAFFAZIONE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

DOMANDA NUMERO	101998900689713
Data Deposito	06/07/1998
Data Pubblicazione	06/01/2000

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
C	08	B		

Titolo

AMMIDI DELL'ACIDO IALURONICO E DEI SUOI DERIVATI E PROCESSO PER LA LORO PREPARAZIONE.

Descrizione di una domanda di brevetto per invenzione industriale dal titolo "Ammidi dell'acido ialuronico e dei suoi derivati e processo per la loro preparazione", della Fidia Advanced Biopolymers S.r.l. con sede in Via De' Carpentieri 3, 72100 - Brindisi, Italia, nella persona del suo Presidente e Legale Rappresentante, Dr. Lanfranco Callegaro.

Inventori: Davide BELLINI

Alessandra TOPAI

Depositata il con N.

PD 98 C 0 0 0 1 6 9

**** *

OGGETTO DELL'INVENZIONE

La presente invenzione descrive ammidi dell'acido ialuronico e dei suoi derivati per la preparazione di formulazioni farmaceutiche, di biomateriali e per il rivestimento di oggetti biomedicali ed il processo per la loro preparazione.

CAMPO DELL'INVENZIONE

L'acido ialuronico è un etero polisaccaride composto da residui alternati di acido D-glucuronico e N-acetil-D-glicosammina. E' un polimero a catena lineare con peso molecolare che può variare tra 50.000 e 13.000.0000 Da a seconda della fonte dalla quale viene ottenuto e dai metodi di preparazione impiegati. E' presente in natura nei gel pericellulari, nella sostanza fondamentale del tessuto connettivo degli organismi vertebrati dei quali rappresenta uno dei componenti principali, nel fluido sinoviale delle giunture, nell'umor vitreo, nei



tessuti del cordone ombelicale umano e nelle creste di gallo.

Negli ultimi anni sono stati sintetizzati numerosi tipi di derivati dell'acido ialuronico allo scopo di ottenere composti con proprietà farmacologiche o processabili in forme diverse di biomateriali biodegradabili e biocompatibili da utilizzare nei vari settori della medicina, della chirurgia, dell'ingegneria dei tessuti.

Tra i derivati ammidici riportati nello stato dell'arte, sono note le composizioni insolubili in acqua costituite da miscele derivanti dalla reazione tra il carbossile dell'acido ialuronico, un nucleofilo, quale un composto amminico, e un agente attivante (US 5,760,200; US 4,937,270). Tali miscele vengono utilizzate principalmente nella prevenzione delle adesioni postchirurgiche.

Il brevetto americano US 5,733,891 descrive composizioni farmaceutiche contenenti derivati ammidici dell'acido ialuronico ottenute per reazione dei suoi carbossili con antitumorali basici. Questi composti hanno lo scopo di focalizzare l'azione del principio attivo nei tessuti malati e ridurre gli effetti nocivi nei tessuti sani.

Inoltre, sono note le ammidi di glicosamminoglicani, tra cui l'acido ialuronico, con composti fotosensibili legati tramite composti polifunzionali che agiscono da ponte per la formazione del legame ammidico (US 5,462,976).

Infine, è noto un processo per la preparazione di ammidi insolubili mediante la reazione degli esteri attivi dell'acido ialuronico con



ammine (WO 95/24429).

Scopo della presente invenzione è quella di fornire ammidi dell'acido ialuronico o dei suoi derivati isolate e caratterizzate, ottenute facendo reagire i gruppi carbossilici o i gruppi amminici, provenienti dalla reazione di deacetilazione, rispettivamente con ammine e con acidi della serie alifatica, aromatica, arilalifatica, cicloalifatica, eterociclica e senza l'utilizzo di catene spaziatrici.

I suddetti composti possono essere sia solubili sia insolubili in acqua, a seconda dell'acido, dell'ammina, della percentuale di legame ammidico o del derivato dell'acido ialuronico utilizzati per preparare l'ammide.

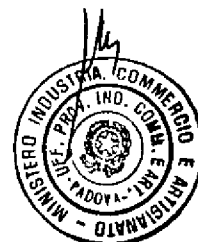
Pertanto, i prodotti secondo la presente invenzione si prestano ad una numerosa varietà di applicazioni a seconda della loro solubilità in acqua, della viscosità, della stabilità del legame ammidico.

Infatti, tali composti possono essere impiegati per la preparazione sia di composizioni farmaceutiche sia di biomateriali, inoltre, mostrano il vantaggio di poter essere formati per reazione, oltre che con ammine, anche con acidi farmacologicamente attivi.

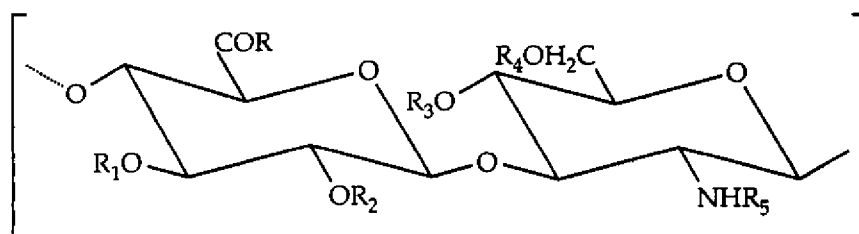
DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE

La presente invenzione descrive ammidi dell'acido ialuronico e dei suoi derivati per la preparazione di formulazioni farmaceutiche, di biomateriali e per il rivestimento di oggetti biomedicali ed il processo per la loro preparazione.

Le ammidi secondo la presente invenzione possono essere



schematizzate mediante la seguente formula generale che rappresenta l'unità ripetitiva del polimero:



in cui:

R = gruppo amminico o alcolico della serie alifatica, aromatica, arilalifatica, cicloalifatica, eterociclica, OH, O⁻, gruppo alcolico dell'acido ialuronico, gruppo amminico dell'acido ialuronico deacetilato;

R₁, R₂, R₃, R₄ = H, SO₃⁻, gruppo acilico derivante da un acido carbossilico della serie alifatica, aromatica, arilalifatica, cicloalifatica, eterociclica, -CO-(CH₂)₂-COOY; Y = carica negativa, H;

R₅ = -CO-CH₃, H, SO₃⁻, gruppo acilico derivante da un acido carbossilico della serie alifatica, aromatica,



arilalifatica, cicloalifatica, eterociclica, gruppo
acilico dell'acido ialuronico.

Si tratta quindi di ammidi ottenute per reazione di un'ammina con il
carbossile libero dell'acido ialuronico o di un suo derivato oppure per
reazione di un acido con il gruppo amminico deacetilato dell'acido
ialuronico o di un suo derivato.

Tra i derivati dell'acido ialuronico impiegabili nella preparazione delle
ammidi secondo la presente invenzione sono da preferire i seguenti:

- gli esteri dell'acido ialuronico in cui una parte o tutte le funzioni
carbossiliche sono esterificate con alcoli della serie alifatica,
aromatica, arilalifatica, cicloalifatica, eterociclica (EP 0216453 B1);
- gli esteri autoreticolati dell'acido ialuronico in cui una parte o la
totalità dei gruppi carbossilici sono esterificate con le funzioni
alcoliche della stessa catena polisaccaridica o di altre catene (EP
0341745 B1);
- i composti reticolati dell'acido ialuronico in cui una parte o la totalità
dei gruppi carbossilici sono esterificate con polialcoli della serie
alifatica, aromatica, arilalifatica, cicloalifatica, eterociclica, generando
delle reticolazioni mediante catene spaziatrici (EP 0265116 B1);
- gli emiesteri dell'acido succinico o i sali di metalli pesanti
dell'emiestere dell'acido succinico con acido ialuronico o con esteri
parziali o totali dell'acido ialuronico (WO 96/357207);
- i derivati O-solfatati (WO 95/25751) o N-solfatati



(PCT/EP98/01973).

Tra le ammidi ottenute per reazione di un'ammina sul carbossile dell'acido ialuronico o di un suo derivato risultano di particolare interesse quelle solubili in acqua.

Tali ammidi possono essere utilizzate vantaggiosamente per la preparazione di composizioni farmaceutiche, ad esempio in forma di gel, per il trasporto ed il rilascio di farmaci o di sostanze biologicamente attive, per l'uso in chirurgia viscoelastica o in chirurgia oftalmica.

Le ammidi secondo la presente invenzione possono essere salificate con i metalli pesanti sui gruppi carbossilici liberi o solforici, dove per metalli pesanti si intendono gli elementi del 4°, 5°, 6° periodo della tavola periodica come, ad esempio, l'argento, il ferro, il cobalto, il rame, lo zinco, l'arsenico, lo stronzio, lo zirconio, l'antimonio, l'oro, il cesio, il tungsteno, il selenio, il platino, il rutenio, il bismuto, lo stagno, il titanio, il mercurio. Tali sali possono essere utilizzati in dermatologia, in oftalmologia, in odontostomatologia, in reumatologia, in urologia, in ginecologia, in chirurgia interna, come integratori alimentari, agenti anti-ossidanti, antireumatici, antitumorali, antiinfiammatori, analgesici, antiulcera.

Inoltre, i derivati ammidici possono essere ottenuti mediante reazione del carbossile o dell'azoto deacetilato dell'acido ialuronico o di un suo derivato rispettivamente con un ammina e con un acido farmacologicamente attivi oppure possono essere salificati o



semplicemente associati a detti composti.

Tra le sostanze farmacologicamente attive sono da preferire le seguenti: antibiotici, antiinfettivi, antimicrobici, antivirali, citostatici, citotossici, antitumorali, antiinfiammatori, cicatrizzanti, anestetici, analgesici, vasocostrittori, agonisti e antagonisti colinergici o adrenergici, antitrombotici, anticoagulanti, emostatici, fibrinolitici, trombolitici, proteine e loro frammenti, peptidi, polinucleotidi.

Di seguito sono riportati alcuni esempi di sostanze farmacologicamente attive facenti parte delle suddette classi di farmaci:

- antibiotici: amino glucosidici, macrolidici, tetracicline, peptidi, come per esempio la gentamicina, la neomicina, la streptomicina, la diidrostreptomicina, la kanamicina, la amikacina, la tobramicina, la spectinomina, la eritromicina, la oleandomicina, la carbamicina, la spiramicina, la ossitetraciclina, la rolitetraciclina, la bacitracina, la polimixina B, la gramicidina, la colistina, il cloramfenicolo, la lincomicina, la vancomicina, la novobiocina, la ristocetina, la clindamicina, l'amfotericina B, la griseofulvina, la nostatina e i loro sali;
- antiinfettivi: dietilcarbamazina, il mebendazolo, i sulfamidici come la sulfacetamide, la sulfadiazina, il sulfisoxazolo;
- antivirali e antitumorali: iododeossiuridina, l'adenina, l'adenina arabinoside, la trifluorotimidina, l'aciclovir, la etildeossiuridina, la bromovinildeossiuridina, la 5-iodo-5'-amino-2',5'-dideossiuridina;



- anti-infiammatori steroidei: dexametasone, l'idrocortisone, il prednisolone, il fluorometolone, il medrisone e i loro esteri;
- antiinfiammatori non steroidei: la indometacina, l'ossifenbutazone, il flurbiprofene, diclofenac, ibuprofene;
- anestetici: il benoxinato, la proparacaina, la dibucaina, la lidocaina, la benzocaina, benzidamina, bupivacaina e i loro sali;
- agonisti colinergici: la pilocarpina, la metacolina, la carbamilcolina, l'aceclidina, la fisostigmina, la neostigmina, il demecarium e i loro sali;
- antagonisti colinergici: atropina e suoi sali;
- agonisti adrenergici: la noradrenalina, l'adrenalina, la nafazolina, la metoxamina e i loro sali;
- antagonisti adrenergici: propranololo, il timololo, il pindololo, il bupranololo, l'atenololo, il metoprololo, l'oxprenololo, il practololo, la butoxamina, il sotalolo, la butadrina, il labetalolo e loro sali;
- antibatterici e disinfettanti: nitrofurazone, la mafenide, la clorexidina, i derivati della 8-idrossichinolina e i loro sali;
- citotossici: il fluorouracile, il metotrexato, la podofillina.

Di particolare interesse sono le forme per il trasporto e il rilascio delle suddette sostanze e di quelle biologicamente attive quali, ad esempio, proteine e loro frammenti, peptidi, polinucleotidi, fattori di crescita, enzimi, vaccini, sostanze impiegate nel trattamento delle malattie associate ai difetti genetici come, ad esempio, quelle che dipendono da



una ipo- o iper-attività enzimatica dovuta a difetti del gene che codifica per un dato enzima, malattie malformanti e malattie ereditarie.

I derivati ammidici secondo la presente invenzione, in associazione con sostanze radioattive e non, usate nei sistemi di contrasto, possono essere utilizzati come traccianti nella diagnostica in vivo, per l'individuazione e la cura dei tessuti tumorali o che hanno subito lesioni.

Un notevole vantaggio risulta dalla possibilità di poter processare i composti ammidici e i loro sali in diverse forme di biomateriali quali, ad esempio, spugne, pellicole, membrane, fili, tamponi, tessuto non tessuto, microsfele, nanosfele, garze, gel, tubicini. Tali biomateriali, utilizzati in una o più forme associate, possono essere costituiti da uno o da più derivati ammidici e da loro sali anche in associazione con altri polimeri naturali, sintetici, semisintetici e, opzionalmente, con sostanze biologicamente attive.

Tra i polimeri naturali si possono usare ad esempio, collagene, coprecipitati di collagene e glicosamminoglicani, cellulosa, polisaccaridi in forma di gel quali la chitina, il chitosano, la pectina o l'acido pectico, l'agar, l'agarosio, lo xantano, il gellano, l'acido alginico o gli alginati, polimannani o poliglicani, amido, gomme naturali.

I polimeri semisintetici, ad esempio, possono essere scelti dal gruppo consistente in collagene reticolato con agenti quali aldeidi o precursori delle stesse, acidi dicarbossilici o loro alogenuri, diammine, derivati



della cellulosa, dell'acido ialuronico, della chitina o del chitosano, del gellano, dello xantano, della pectina o dell'acido pectico, dei poliglicani, del polimannano, dell'agar, dell'agarosio, della gomma naturale, dei glicosamminoglicani.

Infine, tra i polimeri sintetici possono essere usati, ad esempio, l'acido polilattico, acido poliglicolico o copolimeri degli stessi o dei loro derivati, polidiossani, polifosfazeni, resine polisulfoniche, poliuretani, PTFE.

I suddetti biomateriali possono essere impiegati vantaggiosamente in diversi campi chirurgici, ad esempio nella chirurgia interna, osteoarticolare, nervosa, anastomotica, viscoelastica, oftalmica, oncologica, plastica estetica, otorinolaringologica, addomino pelvica, uroginecologica, cardiovascolare, nella prevenzione delle adesioni post chirurgiche e di cicatrici ipertrofiche.

Inoltre, i composti ammidici in associazione con fibrina, ed eventualmente con altre sostanze biologicamente attive, possono essere usati per la preparazione di colle chirurgiche.

I biomateriali secondo la presente invenzione possono essere utilizzati, oltre che nel campo chirurgico, in emodialisi, cardiologia, dermatologia, oftalmologia, otorinolaringoiatria, odontologia, ortopedia, ginecologia, urologia, nella circolazione ed ossigenazione extra-corporea, in cosmesi, in angiologia.

I suddetti biomateriali nelle diverse forme, possono essere usati



vantaggiosamente come supporto per la crescita delle cellule quali, ad esempio cellule mesenchimali o cellule mature per l'ottenimento di tessuto connettivo, ghiandolare, nervoso.

Questi biopolimeri possono anche essere impiegati nei processi di rivestimento di oggetti utilizzati sia in campo medico sia in altri settori dell'industria, fornendo nuove caratteristiche biologiche alla superficie del materiale impiegato come supporto.

Gli oggetti che possono essere rivestiti sono ad esempio cateteri, tubicini, sonde, valvole cardiache, protesi di tessuto molle, protesi di origine animale quali, ad esempio, valvole cardiache di maiale, tendini artificiali, protesi ossee e cardiovascolari, lenti a contatto, ossigenatori di sangue, reni, cuore, pancreas, fegato artificiali, sacche per sangue, siringhe, strumenti chirurgici, sistemi di filtrazione, strumenti da laboratorio, contenitori per colture e per la rigenerazione di cellule e tessuti, supporti per peptidi, proteine, anticorpi.

Il processo di rivestimento della superficie di tali oggetti può avvenire, ad esempio, mediante la tecnica del Plasma Coating, descritta nella domanda di brevetto internazionale della richiedente, Pubbl. No. WO96/24392.

Il processo per la preparazione delle ammidi sull'azoto dell'acido ialuronico o di un suo derivato deacetilati può essere riassunto nelle seguenti fasi:

- reazione di deacetilazione, ad esempio, per reazione con idrazina



solfato (J. Riesenfeld, *Analy. Bioch.* 1990, vol. 188, pp 383-389);

- preparazione del sale di ammonio quaternario del composto deacetilato come, ad esempio, il sale di tetrabutylammonio;
- preparazione dell'agente acilante sotto forma di estere attivo, ad esempio, di paranitrofenilestere dell'acido alifatico, aromatico, arilalifatico, cicloalifatico, eterociclico, scelto per la formazione dell'ammide;
- reazione di N-acilazione tra il sale di ammonio quaternario dell'acido ialuronico o di un suo derivato deacetilati e l'agente acilante.

La caratterizzazione analitica dei composti avviene tramite i seguenti metodi:

- *Analisi della percentuale di gruppi amminici liberi;*

viene utilizzata la metodica descritta da J. Riesenfeld (*Analy. Bioch.* 1990, vol. 188, pp 383-389);

- *Peso molecolare medio;*

viene determinato mediante GPC utilizzando un set di colonne Shadex B-803 e B-806, un rivelatore RI ed un rivelatore MALLS;

- *Analisi mediante spettroscopia IR ed UV;*
- *Analisi mediante TLC*

il campione viene idrolizzato in una soluzione 1 molare di idrossido di sodio per 2-4 ore a 70°C e quindi acidificato con una soluzione 1 molare di acido cloridrico. L'acido che si libera durante l'idrolisi viene estratto con solvente organico. L'estratto organico secco viene



analizzato mediante HPLC.

- % di N-acilazione (idrolisi dell'ammide)

per ricavare la percentuale dei gruppi N-acilati vengono eseguiti due tipi di analisi:

- a) metodica descritta da J. Riesenfeld (Analy. Bioch. 1990, vol. 188, pp 383-389);
- b) il campione viene idrolizzato in una soluzione 1 molare di idrossido di sodio per 2-4 ore a 70°C e quindi acidificato con una soluzione 1 molare di acido cloridrico. L'acido che si libera durante l'idrolisi viene estratto con solvente organico. L'estratto organico secco viene analizzato mediante HPLC.

La preparazione delle ammidi sul carbossile dell'acido ialuronico o di un suo derivato consiste nell'attivare i gruppi carbossilici mediante reazione degli stessi, nella forma acida o di sale di ammonio quaternario, con un agente come, ad esempio, il carbonildiimidazolo, che converte l'acido carbossilico nella forma reattiva di agente acilante.

Tale reazione può essere eseguita con catalisi per acido cloridrico o resina acida e con un'ammina della serie alifatica, aromatica, arilalifatica, cicloalifatica, eterociclica.

La caratterizzazione dei composti comprende le seguenti metodiche:

- Analisi mediante spettroscopia IR ed UV;
- Analisi mediante Cromatografia:

il campione viene idrolizzato in una soluzione 1 molare di



idrossido di sodio per 2-4 ore a 70°C e l'ammina che si libera durante l'idrolisi viene estratta con solvente organico. L'estratto organico secco viene analizzato mediante HPLC.

Esempio 1

Preparazione di acido ialuronico parzialmente N-deacetilato in forma di sale sodico (DHA/Na)

1 g di ialuronato di sodio, con peso molecolare medio 600 KDa, viene solubilizzato in 50 ml di una soluzione all'1% di idrazina solfato in idrazina monoidrato.

La reazione viene lasciata procedere, sotto agitazione, per 5 giorni (120 ore) a 55°C e quindi viene bloccata mediante l'aggiunta di 100 ml di etanolo.

Il precipitato che si forma viene filtrato su filtro Gooch, lavato con etanolo ed, infine, essiccato a temperatura ambiente e a pressione ridotta.

La probabile idrazide dell'acido ialuronico che si forma durante la reazione di idrazinolisi viene distrutta mediante reazione con HIO_3 (acido iodico). Poiché la reazione può essere molto vigorosa, viene condotta mediante raffreddamento del contenitore di reazione in un bagno di acqua e ghiaccio.

Il prodotto dell'idrazinolisi viene solubilizzato in 50 ml di una soluzione di Acetato di sodio al 5% e fatto reagire con 25 ml di una soluzione 0,5 M di Acido iodico. La reazione procede per 30 min. in



agitazione, quindi si aggiungono 5 ml di una soluzione al 57% di HI per distruggere l'eventuale HIO_3 non reagito.

Lo iodio formatosi viene estratto dalla soluzione acquosa con almeno 3 aliquote di 30 ml di etere etilico (fino a completa decolorazione della fase acquosa). La soluzione acquosa viene portata a pH neutro mediante aggiunta di una soluzione di NaOH 0,5 M e quindi trattata con 100 ml di etanolo. Il precipitato ottenuto viene filtrato su filtro Gooch, lavato con etanolo ed infine essiccato a temperatura ambiente e a pressione ridotta.

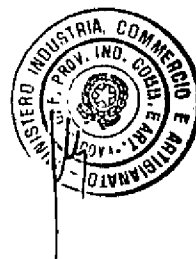
Il prodotto ottenuto viene caratterizzato analiticamente per determinare la percentuale dei gruppi N-deacetilati ed il peso molecolare medio.

Resa della reazione	90%
% di N-deacetilazione:	26%
PM medio	130 KDa

Esempio 2

Preparazione del sale dell'acido ialuronico parzialmente N-deacetilato con tetrabutylammonio (DHA/TBA)

1 g (2,5 mmoli) di sale sodico dell'acido ialuronico parzialmente N-deacetilato viene solubilizzato in 60 ml di acqua e la soluzione viene fatta percolare attraverso una colonna preriempita con 25 ml di una resina solfonica in forma di sale di tetrabutylammonio (TBA). La resina solfonica in forma H^+ viene attivata con una soluzione al 40% p/v di



TBAOH.

L'eluato, contenente acido ialuronico N-deacetilato sale di TBA, viene raccolto e sottoposto ad un ciclo di liofilizzazione.

Esempio 3

Preparazione del p-NO₂-fenilestere dell'acido benzoico (agente acilante)

10 g (0,082moli) di acido benzoico vengono solubilizzati in 800 ml di CH₂Cl₂, quindi si aggiungono 11,4 g (0,082 moli) di p-NO₂-fenolo e 16,9 g (0,082moli) di DCC (Dicicloesilcarbodiimmide). La reazione procede per 2 ore, mantenendo la soluzione in ebollizione a ricadere mediante l'uso di un refrigerante a bolle.

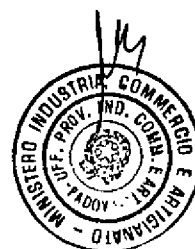
Successivamente si filtra la dicicloesilurea che si viene a formare ed il filtrato viene essiccato, mediante l'utilizzo di un rotavapor, a pressione ridotta. Il prodotto ottenuto viene purificato mediante ripetute cristallizzazioni in acetato di etile, i cristalli vengono filtrati e messi ad essiccare a temperatura ambiente a pressione ridotta.

Il derivato viene caratterizzato mediante analisi su TLC (eluente: CH₂Cl₂/acetato di etile 90/10 ed R_f=0,77) e mediante spettroscopia IR ed UV.

Resa di reazione 92%

Esempio 4

Preparazione di p-NO₂-fenilestere dell'acido cinnamico (agente acilante)



12g (0,082 moli) di acido cinnamico vengono solubilizzati in 800 ml di CH_2Cl_2 , quindi si aggiungono 11,4 g (0,082moli) di p- NO_2 -fenolo e 16,9 g (0,082 moli) di DCC (Dicicloesilcarbodiimmide). La reazione procede per 2 ore, mantenendo la soluzione in ebollizione a ricadere mediante l'uso di un refrigerante a bolle.

Successivamente si filtra la dicicloesilurea che si viene a formare ed il filtrato viene essiccato, mediante l'utilizzo di un rotavapor a pressione ridotta. Il prodotto ottenuto viene purificato mediante ripetute cristallizzazioni in etanolo, i cristalli vengono filtrati e messi ad essiccare a temperatura ambiente a pressione ridotta.

Il derivato viene caratterizzato mediante analisi su TLC (eluente: CH_2Cl_2 /acetato di etile 90/10 ed $R_f=0,77$) e mediante spettroscopia IR ed UV.

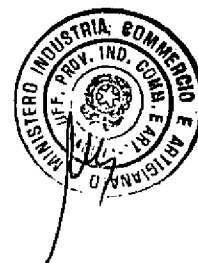
Resa di reazione 89%

Esempio 5

Preparazione p- NO_2 -fenilestere dell'acido dodecanoico (agente acilante)

16 g di acido dodecanoico vengono solubilizzati in 1 l di CH_2Cl_2 , quindi si aggiungono 11,4 (0,082 moli) g di p- NO_2 -fenolo e 16,9 g (0,082 moli) di DCC (Dicicloesilcarbodiimmide). La reazione procede per 2 ore, mantenendo la soluzione in ebollizione a ricadere mediante l'uso di un refrigerante a bolle.

Successivamente si filtra la dicicloesilurea che si viene a formare ed il



filtrato viene essiccato, mediante l'utilizzo di un rotavapor, a pressione ridotta. Il prodotto ottenuto viene purificato mediante ripetute cristallizzazioni in acetato di etile, i cristalli vengono filtrati e messi ad essiccare a temperatura ambiente a pressione ridotta.

Il derivato viene caratterizzato mediante analisi su TLC (eluente: CH_2Cl_2 /Acetato di etile 90/10 ed $R_f = 0,77$) e mediante spettroscopia IR.

Resa di reazione 93%

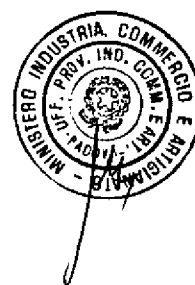
Esempio 6

Preparazione p-NO₂-fenilestere dell'acido stearico (agente acilante)

23,3 g di acido stearico vengono solubilizzati in 1 l di CH_2Cl_2 , quindi si aggiungono 11,4 (0,082 moli) g di p-NO₂-fenolo e 16,9 g (0,082 moli) di DCC (Dicicloesilcarbodiimmide). La reazione procede per 2 ore, mantenendo la soluzione in ebollizione a ricadere mediante l'uso di un refrigerante a bolle.

Successivamente si filtra la dicicloesilurea che si viene a formare ed il filtrato viene essiccato, mediante l'utilizzo di un rotavapor, a pressione ridotta. Il prodotto ottenuto viene purificato mediante ripetute cristallizzazioni in etanolo assoluto, i cristalli vengono filtrati e messi ad essiccare a temperatura ambiente a pressione ridotta.

Il derivato viene caratterizzato mediante analisi su TLC (eluente: CH_2Cl_2 /Acetato di etile 90/10 ed $R_f = 0,82$) e mediante spettroscopia IR.



Resa di reazione 87%

Esempio 7

Preparazione p-NO₂-fenilestere dell'acido o-acetil salicilico (agente acilante)

14,7 g di acido acetilsalicilico vengono solubilizzati in 1 l di CH₂Cl₂, quindi si aggiungono 11,4 (0,082 moli) g di p-NO₂-fenolo e 16,9 g (0,082 moli) di DCC (Dicicloesilcarbodiimmide). La reazione procede per 2 ore, mantenendo la soluzione in ebollizione a ricadere mediante l'uso di un refrigerante a bolle.

Successivamente si filtra la dicicloesilurea che si viene a formare ed il filtrato viene essiccato, mediante l'utilizzo di un rotavapor, a pressione ridotta. Il prodotto ottenuto viene purificato mediante ripetute cristallizzazioni in etanolo assoluto, i cristalli vengono filtrati e messi ad essiccare a temperatura ambiente a pressione ridotta.

Il derivato viene caratterizzato mediante analisi su TLC (eluente: CH₂Cl₂/Acetato di etile 90/10 ed R_f = 0,82) e mediante spettroscopia IR.

Resa di reazione 80%

Esempio 8

Preparazione di acido ialuronico parzialmente N-acilato (con il derivato dell'acido benzoico)

1 g (1,6 mmoli) di DHA/TBA (26% deacetilazione) viene solubilizzato in 50 ml di DMSO, quindi si aggiungono 5 ml di una soluzione al 10%



di p-NO₂-fenilestere dell'acido benzoico (preparato secondo l'esempio 3) in DMSO. La reazione procede per 24 ore, in agitazione, a temperatura ambiente quindi viene bloccata mediante l'aggiunta di 2,5 ml di una soluzione satura di NaCl. Si lascia reagire per 30 min. ed infine si aggiungono lentamente 100 ml di etanolo. Il precipitato ottenuto viene filtrato su filtro Gooch, lavato con etanolo ed etere etilico ed infine essiccato a T ambiente a pressione ridotta.

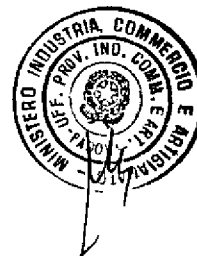
Il derivato viene analizzato mediante TLC (previa idrolisi dell'ammide), analisi colorimetrica della percentuale di gruppi NH₂ liberi e analisi spettroscopica IR ed UV.

Resa reazione	85%
% NH ₂ liberi	11%
% N-Acilazione	15%

Esempio 9

Preparazione di acido ialuronico parzialmente N-acilato (con il derivato dell'acido cinnamico)

1 g (1,6 mmoli) di DHA/TBA (26% deacetilazione) viene solubilizzato in 50 ml di NMP, quindi si aggiungono 10 ml di una soluzione al 10% di p-NO₂-fenilestere dell'acido cinnamico (preparato secondo l'esempio 4) in NMP. La reazione procede per 24 ore, in agitazione, a temperatura ambiente quindi viene bloccata mediante l'aggiunta di 2,5 ml di una soluzione satura di NaCl. Si lascia reagire per 30 min. ed infine si aggiungono lentamente 100 ml di etanolo. Il precipitato ottenuto viene



filtrato su filtro Gooch, lavato con etanolo/acqua 9:1, etere etilico ed infine essiccato a temperatura ambiente a pressione ridotta.

Il derivato viene analizzato mediante TLC (previa idrolisi dell'ammide), analisi colorimetrica della percentuale di gruppi NH_2 liberi e analisi spettroscopica IR ed UV.

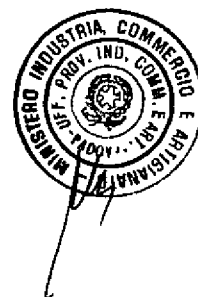
Resa reazione	85%
% NH_2 liberi	11%
% N-Acilazione	15%

Esempio 10

Preparazione di acido ialuronico parzialmente N-acilato (con derivato dell'acido dodecanoico)

1 g (1,6 mmoli) di DHA/TBA (26% deacetilazione) viene solubilizzato in 50 ml di NMP, quindi si aggiungono 3,2 ml di una soluzione al 10% di p- NO_2 -fenilestere dell'acido dodecanoico (preparato secondo l'esempio 5) in NMP. La reazione procede per 24 ore, in agitazione, a temperatura ambiente quindi viene bloccata mediante l'aggiunta di 2,5 ml di una soluzione satura di NaCl. Si lascia reagire per 30 min. ed infine si aggiungono moderatamente 100 ml di etanolo. Il precipitato ottenuto viene filtrato su filtro Gooch, lavato con etanolo ed etere etilico ed infine essiccato a temperatura ambiente a pressione ridotta.

Il derivato viene analizzato mediante TLC (previa idrolisi dell'ammide), analisi colorimetrica della percentuale di gruppi NH_2 liberi e analisi spettroscopica IR ed UV.



Resa reazione	88%
% NH ₂ liberi	10%
% N-Acilazione	16%

Esempio 11

Preparazione di acido ialuronico parzialmente N-acilato (con il derivato dell'acido stearico)

1 g (1,6 mmoli) di DHA/TBA (26% deacetilazione) viene solubilizzato in 50 ml di NMP, quindi si aggiungono 6 ml di una soluzione al 10% di p-NO₂-fenilestere dell'acido stearico (preparato secondo l'esempio 6) in NMP. La reazione procede per 24 ore, in agitazione, a temperatura ambiente quindi viene bloccata mediante l'aggiunta di 2,5 ml di una soluzione satura di NaCl. Si lascia reagire per 30 min. ed infine si aggiungono lentamente 100 ml di etanolo. Il precipitato ottenuto viene filtrato su filtro Gooch, lavato con etanolo ed etere etilico ed infine essiccato a temperatura ambiente a pressione ridotta.

Il derivato viene analizzato mediante TLC (previa idrolisi dell'ammide), analisi colorimetrica della percentuale di gruppi NH₂ liberi e analisi spettroscopica IR ed UV.

Resa reazione	85%
% NH ₂ liberi	12%
% N-Acilazione	14%

Spettroscopia IR (Figura 1): la figura mostra le differenze tra lo spettro IR dell'ammide a quello del sale sodico dell'acido ialuronico. Nello



spettro dell'ammide risulta evidente il picco nella zona dei 2900 cm⁻¹ dovuto allo stretching dei CH₂ dello stearato.

Esempio 12

Preparazione di acido ialuronico parzialmente N-acilato (con derivato dell'acido acetil salicilico)

1 g (1,6 mmoli) di DHA/TBA viene solubilizzato in 50 ml di NMP, quindi si aggiungono 3,2 ml di una soluzione al 10% di p-NO₂-fenilestere dell'acido acetil salicilico (preparato secondo l'esempio 7) in NMP. La reazione procede per 24 ore, in agitazione, a temperatura ambiente quindi viene bloccata mediante l'aggiunta di 2,5 ml di una soluzione satura di NaCl. Si lascia reagire per 30 min. ed infine si aggiungono lentamente 100 ml di etanolo. Il precipitato ottenuto viene filtrato su filtro Gooch, lavato con etanolo ed etere etilico ed infine essiccato a temperatura ambiente a pressione ridotta.

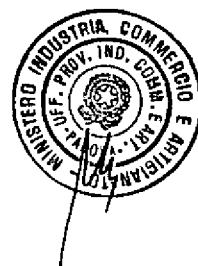
Il derivato viene analizzato mediante TLC (previa idrolisi dell'ammide), analisi colorimetrica della percentuale di gruppi NH₂ liberi e analisi spettroscopica IR ed UV.

Resa reazione	90%
% NH ₂ liberi	10%
% N-Acilazione	16%

Esempio 13

Preparazione di benzilammide dell'acido ialuronico

2 g (3,2mmoli) di sale di tetrabutylammonio dell'acido ialuronico



(HA/TBA) vengono solubilizzati in 100 ml di DMSO. Alla soluzione si aggiungono rispettivamente 3 ml di resina acida umida in DMSO e 784 mg (4,8 mmoli) di 1,1-carbonildiimidazolo. Si lascia reagire, in agitazione, per 12 ore; quindi si filtra su filtro Gooch, per eliminare la resina, e al filtrato si aggiunge 1 ml (9,6 mmoli) di benzilammina. Si lascia reagire per 48 ore quindi si aggiungono 5 ml di una soluzione satura di NaCl e si lascia in agitazione per 30 min.. Si aggiungono 200 ml di acetone, il precipitato ottenuto viene filtrato ed essiccato a pressione ridotta.

Il derivato secco viene caratterizzato mediante TLC, IR ed analisi HPLC.

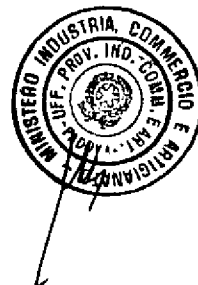
% Ammidazione 5%

Spettroscopia IR (Figura 2 e 3): nello spettro in figura 2 risultano evidenti il picco a 1537 cm^{-1} dovuto al bending nel piano dell'NH (II banda delle ammidi) e il picco a circa 730 cm^{-1} dovuto al bending dei CH fuori del piano dell'anello aromatico. La figura 3 mostra le differenze tra il grafico relativo all'ammide e quello del sale sodico dell'acido ialuronico.

Esempio 14

Preparazione di benzilammide dell'acido ialuronico

2 g (3,2mmoli) di sale di tetrabutylammonio dell'acido ialuronico (HA/TBA) vengono solubilizzati in 100 ml di DMSO. La soluzione viene portata a pH 3 con HCl 1M e quindi vi si aggiungono 784 mg (4,8



mmoli) di 1,1-carbonildiimidazolo. Si lascia reagire, in agitazione, per 12 ore; quindi si filtra su filtro Gooch, per eliminare la resina, ed al filtrato si aggiunge 1 ml (9,6 mmoli) di benzilammina. Si lascia reagire per 48 ore, quindi si aggiungono 5 ml di una soluzione satura di NaCl e si lascia in agitazione per 30 min.. Si aggiungono 200 ml di acetone, il precipitato ottenuto viene filtrato ed essiccato a pressione ridotta.

Il derivato secco viene caratterizzato mediante TLC, IR ed analisi HPLC.

% Ammidazione

7%

Esempio 15

Preparazione di benzilammide dell'acido ialuronico

2 g (5,2mmoli) di acido ialuronico sotto forma acida vengono solubilizzati in 100 ml di DMF. Alla soluzione si aggiungono 854 mg (5,2 mmoli) di 1,1-carbonildiimidazolo. Si lascia reagire, in agitazione, per 6 ore quindi si aggiunge 1,13 ml (10,4 mmoli) di benzilammina. La reazione procede per 48 ore, quindi si blocca mediante aggiunta di 200 ml di acetone, il precipitato ottenuto viene filtrato ed essiccato a pressione ridotta.

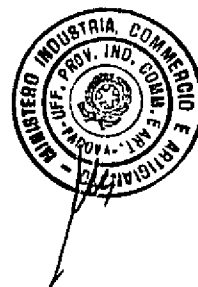
Il derivato secco viene caratterizzato mediante TLC, IR ed analisi HPLC.

% Ammidazione

7%

Esempio 16

Preparazione di benzilammide dell'acido ialuronico



2 g (5,2mmoli) di acido ialuronico sotto forma acida vengono solubilizzati in 100 ml di DMF. Alla soluzione si aggiungono 2 ml di piridina, 3,68 g (0,026 moli) di p-NO₂-fenolo e piridincloruro fino a pH 7/8. Infine si aggiungono 5,3 g (0,026moli) di DCC e 2,8 ml (0,026 moli) di benzilammina. Si lascia reagire, in agitazione, per 16 ore quindi si blocca la reazione mediante aggiunta di 200 ml di acetone. Il precipitato ottenuto viene filtrato ed essiccato a pressione ridotta.

Il derivato secco viene caratterizzato mediante TLC, IR ed analisi HPLC.

% Ammidazione

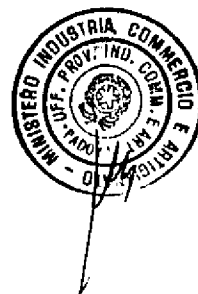
5%

*** **

Essendo l'invenzione così descritta, è chiaro che questi metodi possono essere modificati in vari modi. Tali modificazioni non sono da considerarsi come divergenze dallo spirito e dalle prospettive dell'invenzione e tutte quelle modificazioni che apparirebbero evidenti ad un esperto nel campo sono comprese nell'ambito delle seguenti rivendicazioni:

RIVENDICAZIONI

- 1) Composti ammidici dell'acido ialuronico e dei suoi derivati ottenuti per reazione del gruppo amminico deacetilato o di quello carbossilico dell'acido ialuronico e dei suoi derivati rispettivamente con un gruppo acilico derivante da un acido carbossilico o con un'ammina appartenenti alla serie alifatica,



2 g (5,2mmoli) di acido ialuronico sotto forma acida vengono solubilizzati in 100 ml di DMF. Alla soluzione si aggiungono 2 ml di piridina, 3,68 g (0,026 moli) di p-NO₂-fenolo e piridincloruro fino a pH 7/8. Infine si aggiungono 5,3 g (0,026moli) di DCC e 2,8 ml (0,026 moli) di benzilammina. Si lascia reagire, in agitazione, per 16 ore quindi si blocca la reazione mediante aggiunta di 200 ml di acetone. Il precipitato ottenuto viene filtrato ed essiccato a pressione ridotta.

Il derivato secco viene caratterizzato mediante TLC, IR ed analisi HPLC.

% Ammidazione

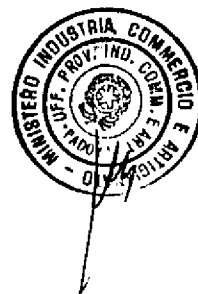
5%

*** **

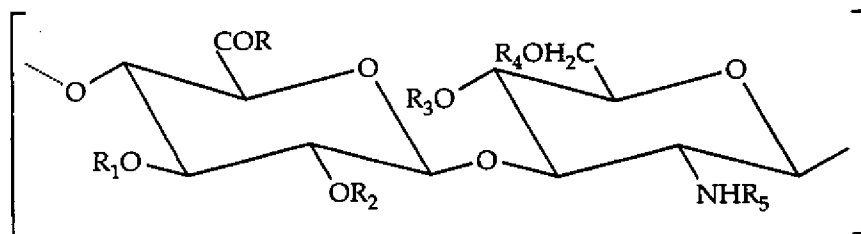
Essendo l'invenzione così descritta, è chiaro che questi metodi possono essere modificati in vari modi. Tali modificazioni non sono da considerarsi come divergenze dallo spirito e dalle prospettive dell'invenzione e tutte quelle modificazioni che apparirebbero evidenti ad un esperto nel campo sono comprese nell'ambito delle seguenti rivendicazioni:

RIVENDICAZIONI

- 1) Composti ammidici dell'acido ialuronico e dei suoi derivati ottenuti per reazione del gruppo amminico deacetilato o di quello carbossilico dell'acido ialuronico e dei suoi derivati rispettivamente con un gruppo acilico derivante da un acido carbossilico o con un'ammina appartenenti alla serie alifatica,



aromatica, arilalifatica, cicloalifatica, eteroalifatica, secondo la seguente formula di struttura:



in cui:

R = gruppo amminico o alcolico della serie alifatica, aromatica, arilalifatica, cicloalifatica, eterociclica, OH, O⁻, gruppo alcolico dell'acido ialuronico, gruppo amminico dell'acido ialuronico deacetilato;

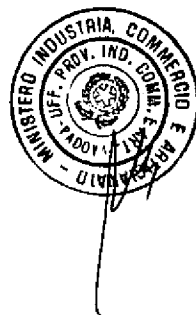
R₁, R₂, R₃, R₄ = H, SO₃⁻, gruppo acilico derivante da un acido carbossilico della serie alifatica, aromatica, arilalifatica, cicloalifatica, eterociclica, -CO-(CH₂)₂-COOY; Y = carica negativa, H;

R₅ = -CO-CH₃, H, SO₃⁻, gruppo acilico derivante da un acido carbossilico della serie alifatica, aromatica, arilalifatica, cicloalifatica, eterociclica, gruppo acilico dell'acido ialuronico.

2) Composti ammidici solubili in acqua ottenuti per reazione dei gruppi carbossilici dell'acido ialuronico con un gruppo amminico



- della serie alifatica, aromatica, arilalifatica, cicloalifatica, eterociclica da utilizzare in oftalmologia e in chirurgia oftalmica.
- 3) Composti ammidici secondo la rivendicazione 1, in cui i derivati dell'acido ialuronico sono esteri totali o parziali con alcoli alifatici, aromatici, arilalifatici, cicloalifatici, eteroalifatici.
 - 4) Composti ammidici secondo la rivendicazione 1, in cui i derivati dell'acido ialuronico sono composti reticolati in cui una parte o la totalità dei gruppi carbossilici del residuo D-glucuronico formano esteri interni o inter-molecolari con le funzioni alcoliche, rispettivamente, della stessa catena polisaccaridica o di altre catene.
 - 5) Composti ammidici secondo la rivendicazione 1, in cui i derivati dell'acido ialuronico sono composti reticolati in cui una parte o la totalità dei gruppi carbossilici del residuo D-glucuronico sono fatti reagire con polialcoli della serie alifatica, aromatica, arilalifatica, cicloalifatica, eterociclica, generando reticolazioni mediante catene spaziatrici.
 - 6) Composti ammidici secondo la rivendicazione 1, salificati con metalli pesanti.
 - 7) Composti ammidici secondo la rivendicazione 6, in cui i metalli pesanti sono quelli del 4°, 5° e 6° gruppo della tavola degli elementi e preferibilmente, argento, cobalto, ferro, rame, zinco, arsenico, stronzio, zirconio, antimonio, oro, cesio, tungsteno,



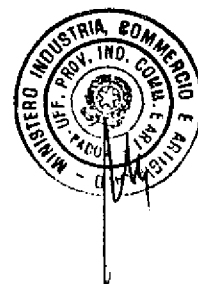
selenio, platino, rutenio, bismuto, stagno, titanio, mercurio.

- 8) Composti ammidici secondo le rivendicazioni 1-7, salificati con sostanze farmacologicamente attive.
- 9) Composti ammidici secondo la rivendicazione 8, in cui le sostanze farmacologicamente attive sono antibiotici, antiinfettivi, antimicrobici, antivirali, citostatici, antitumorali, antiinfiammatori, cicatrizzanti, anestetici, agonisti ed antagonisti colinergici o adrenergici, antitrombotici, anticoagulanti, emostatici, fibrinolitici, trombolitici, proteine e loro frammenti, peptidi, polinucleotidi.
- 10) Composti ammidici e loro sali di cui alle rivendicazioni 1-9, da soli o in associazione tra loro e/o con sostanze farmacologicamente attive per la preparazione di composizioni farmaceutiche.
- 11) Composti ammidici e loro sali di cui alla rivendicazione 10, in cui le sostanze farmacologicamente attive sono antibiotici, antiinfettivi, antimicrobici, antivirali, citostatici, antitumorali, antiinfiammatori, cicatrizzanti, anestetici, agonisti e antagonisti colinergici o adrenergici, antitrombotici, anticoagulanti, emostatici, fibrinolitici, trombolitici, proteine e loro frammenti, peptidi, polinucleotidi, fattori di crescita, enzimi, vaccini, sostanze impiegate nel trattamento delle malattie associate ai difetti genetici, malattie malformanti e malattie ereditarie.
- 12) Composti ammidici secondo le rivendicazioni precedenti, in associazione con sostanze radioattive e non, usate nei sistemi di



contrasto, da usare come traccianti nella diagnostica in vivo, per l'individuazione e la cura dei tessuti tumorali o che hanno subito lesioni.

- 13) Composizioni farmaceutiche contenenti i composti ammidici e i loro sali secondo le rivendicazioni da 1-9, da soli o in associazione tra loro o con altre sostanze farmacologicamente attive.
- 14) Biomateriali costituiti dai composti ammidici e dai loro sali secondo le rivendicazioni da 1 a 9, da soli o in associazione tra loro o con altri polimeri naturali, semisintetici, sintetici ed, opzionalmente, con sostanze biologicamente attive.
- 15) Biomateriali secondo la rivendicazione 14, in cui i polimeri naturali sono collagene, coprecipitati di collagene e glicosamminoglicani, cellulosa, polisaccaridi in forma di gel quali la chitina, il chitosano, la pectina o l'acido pectico, l'agar, l'agarosio, lo xantano, il gellano, l'acido alginico o gli alginati, polimannani o poliglicani, amido, gomme naturali.
- 16) Biomateriali secondo la rivendicazione 14, in cui i polimeri semisintetici sono collagene reticolato con agenti quali aldeidi o precursori delle stesse, acidi dicarbossilici o loro alogenuri, diammine, derivati della cellulosa, dell'acido ialuronico, della chitina o del chitosano, del gellano, dello xantano, della pectina o dell'acido pectico, dei poliglicani, del polimannano, dell'agar, dell'agarosio, della gomma naturale, dei glicosamminoglicani.

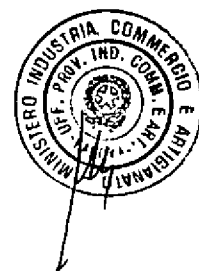


- 17) Biomateriali secondo la rivendicazione 14, in cui i polimeri sintetici sono l'acido polilattico, acido poliglicolico o copolimeri degli stessi o dei loro derivati, polidiossani, polifosfazeni, resine polisulfoniche, poliuretani, PTFE.
- 18) Biomateriali secondo le rivendicazioni 14-17, in associazione con fibrina, ed eventualmente con altre sostanze biologicamente attive, per la preparazione di colle chirurgiche.
- 19) Biomateriali secondo le rivendicazioni 14-17, per la preparazione di supporti per colture cellulari.
- 20) Biomateriali secondo le rivendicazioni 14-17, per la preparazione di articoli sanitari chirurgici.
- 21) Biomateriali secondo la rivendicazione 14-17, in forma di tubicini, garze, fili, gel, idrogel, tamponi, pellicole, membrane, spugne, tessuto non tessuto, microsfere, nanosfere e loro associazioni.
- 22) Articoli sanitari e chirurgici secondo la rivendicazione 20, in forma di tubicini, garze, fili, gel, idrogel, tamponi, pellicole, membrane, spugne, tessuto non tessuto, microsfere, nanosfere.
- 23) Biomateriali secondo le rivendicazioni 14-17, per impieghi in chirurgia, emodialisi, cardiologia, dermatologia, oftalmologia, otorinolaringoiatria, odontologia, ortopedia, ginecologia, urologia, nella circolazione ed ossigenazione extra-corporea, in cosmesi, in angiologia.
- 24) Biomateriali secondo la rivendicazione 23, dove per chirurgia si

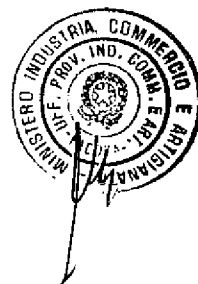


intende chirurgia interna, osteoarticolare, nervosa, anastomotica, viscoelastica, oftalmica, oncologica, plastica, estetica, otorinolaringologica, addomino pelvica, uroginecologica, cardiovascolare come, ad esempio, nella preparazione di valvole cardiache, "stent" vascolari, nella prevenzione delle adesioni post chirurgiche e di cicatrici ipertrofiche.

- 25) Composti ammidici e loro sali di cui alle rivendicazioni da 1 a 9 per il rivestimento di oggetti biomedicali quali bypass, cateteri venosi, shunt, cateteri, tubicini, sonde, valvole cardiache, tendini artificiali, protesi ossee e cardiovascolari, lenti a contatto, protesi di tessuto molle, protesi di origine animale, ossigenatori di sangue, reni, cuore, pancreas, fegato artificiali, sacche per sangue, siringhe, strumenti chirurgici, sistemi di filtrazione, strumenti da laboratorio, contenitori per colture e per la rigenerazione di cellule e tessuti, supporti per peptidi, proteine, anticorpi.
- 26) Uso dei composti ammidici secondo le rivendicazioni 7-8, in dermatologia, oftalmologia, odontostomatologia, reumatologia, urologia, ginecologia, chirurgia interna, come integratori alimentari, agenti anti-ossidanti, antireumatici, antitumorali, antiinfiammatori, analgesici, antiulcera.
- 27) Uso dei composti ammidici di cui alle rivendicazioni 1-5, per la preparazione di sali con sostanze farmacologicamente attive.
- 28) Uso dei composti ammidici e dei loro sali secondo le

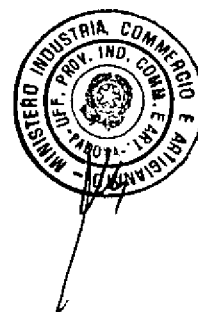


- rivendicazioni 1-9, da soli o in associazione tra di loro e/o con sostanze farmacologicamente attive per la preparazione di composizioni farmaceutiche, di biomateriali, di articoli sanitari-chirurgici, sistemi a lento rilascio e per il rivestimento di oggetti biomedicali.
- 29) Uso dei composti ammidici e dei loro sali secondo le rivendicazioni 1-9, in associazione con sostanze radioattive e non, usate nei sistemi di contrasto, come traccianti nella diagnostica in vivo, per l'individuazione e la cura dei tessuti tumorali o che hanno subito lesioni.
- 30) Uso dei composti ammidici e dei loro sali secondo la rivendicazione 28, in cui i biomateriali sono in forma di tubicini, garze, fili, gel, idrogel, tamponi, pellicole, membrane, spugne, tessuto non tessuto, microsfele, nanosfele e loro associazioni.
- 31) Uso dei composti ammidici di cui alle rivendicazioni precedenti, in chirurgia, emodialisi, cardiologia, dermatologia, oftalmologia, otorinolaringoiatria, odontologia, ortopedia, ginecologia, urologia, nella circolazione ed ossigenazione extra-corporea, in cosmesi, in angiologia.
- 32) Uso dei composti ammidici secondo la rivendicazione 31, dove per chirurgia si intende chirurgia interna, osteoarticolare, nervosa, anastomotica, viscoelastica, oftalmica, oncologica, plastica estetica, otorinolaringologica, addomino pelvica, uroginecologica,

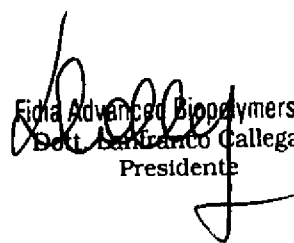


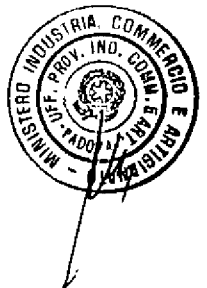
cardiovascolare come, ad esempio, nella preparazione di valvole cardiache, "stent" vascolari, nella prevenzione delle adesioni post chirurgiche e di cicatrici ipertrofiche.

- 33) Uso dei biomateriali secondo le rivendicazioni 14-17, in associazione con fibrina, ed eventualmente con altre sostanze biologicamente attive, per la preparazione di colle chirurgiche.
- 34) Uso dei biomateriali secondo le rivendicazioni 14-17, per la preparazione di supporti per colture cellulari.
- 35) Processo per la preparazione delle ammidi sull'azoto dell'acido ialuronico o di un suo derivato deacetilati comprendente le seguenti fasi:
 - a) reazione di deacetilazione;
 - b) preparazione del sale di ammonio quaternario del composto deacetilato;
 - c) preparazione dell'agente acilante sotto forma di estere attivo;
 - d) reazione di N-acilazione tra il sale di ammonio quaternario dell'acido ialuronico o di un suo derivato deacetilati e l'agente acilante.
- 36) Processo secondo la rivendicazione 35, in cui la reazione di deacetilazione avviene mediante l'utilizzo di idrazina solfato/idrazina.
- 37) Processo secondo la rivendicazione 35, in cui il sale di ammonio quaternario è il sale di tetrabutylammonio.



- 38) Processo secondo la rivendicazione 35, in cui l'estere attivo è il paranitrofenilestere dell'acido alifatico, aromatico, arilalifatico, cicloalifatico, eterociclico, scelto per la formazione dell'ammide.
- 39) Processo per la preparazione delle ammidi sul carbossile dell'acido ialuronico o di un suo derivato comprendente le seguenti fasi:
- a) attivazione dei gruppi carbossilici mediante reazione degli stessi, nella forma acida o di sale di ammonio quaternario, con un agente attivante, in soluzione acida o su resina acida;
 - b) reazione con un'ammina della serie alifatica, aromatica, arilalifatica, cicloalifatica, eterociclica.
- 40) Processo secondo la rivendicazione 39, in cui l'agente attivante è il 1,1-carbonildiimidazolo.


Fidia Advanced Biopolymers s.r.l.
Dott. Gianfranco Callegaro
Presidente



sale sodico dell'acido ialuronico
ammide dell'acido ialuronico con l'acido stearico

Figura 1

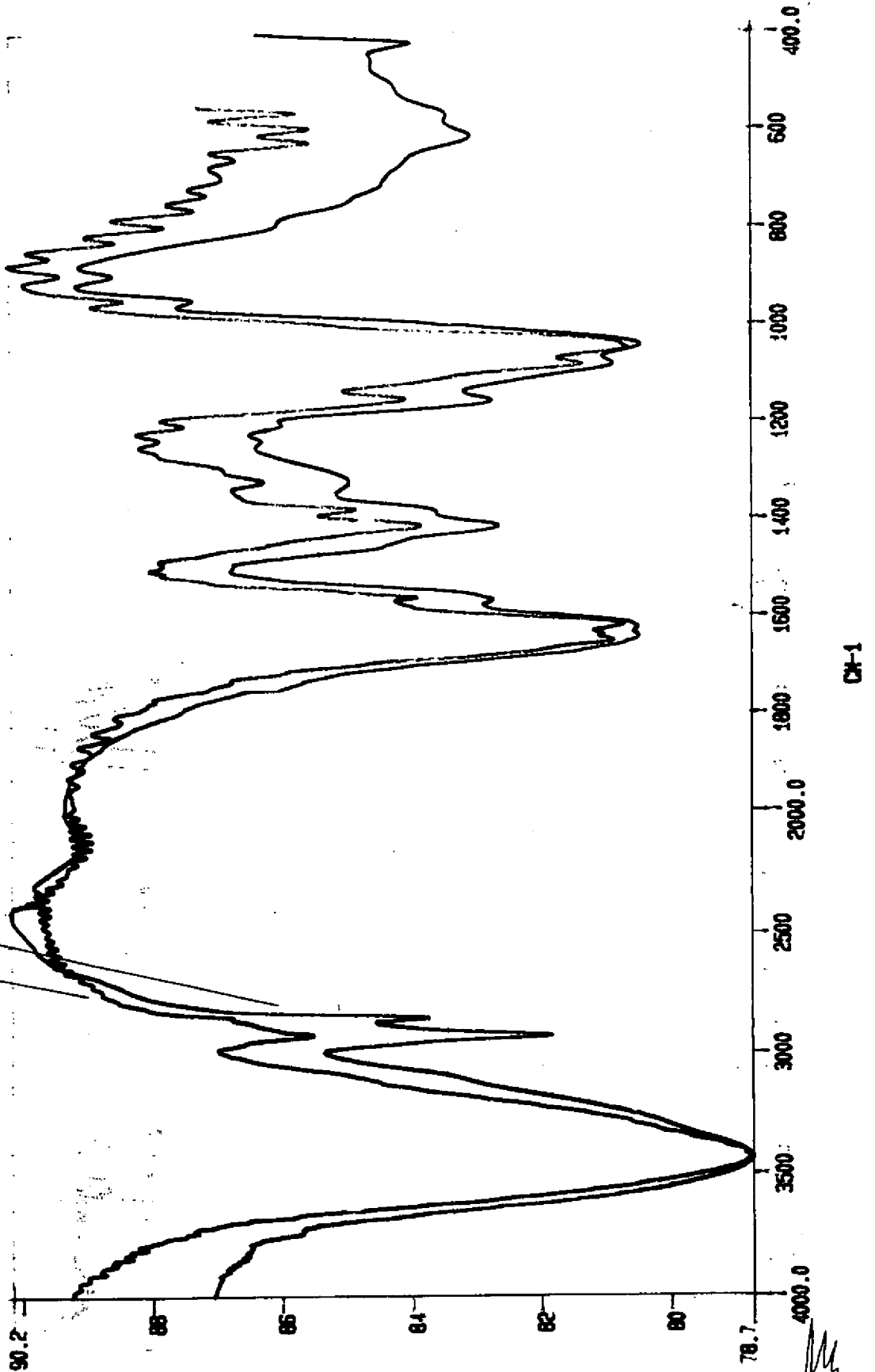
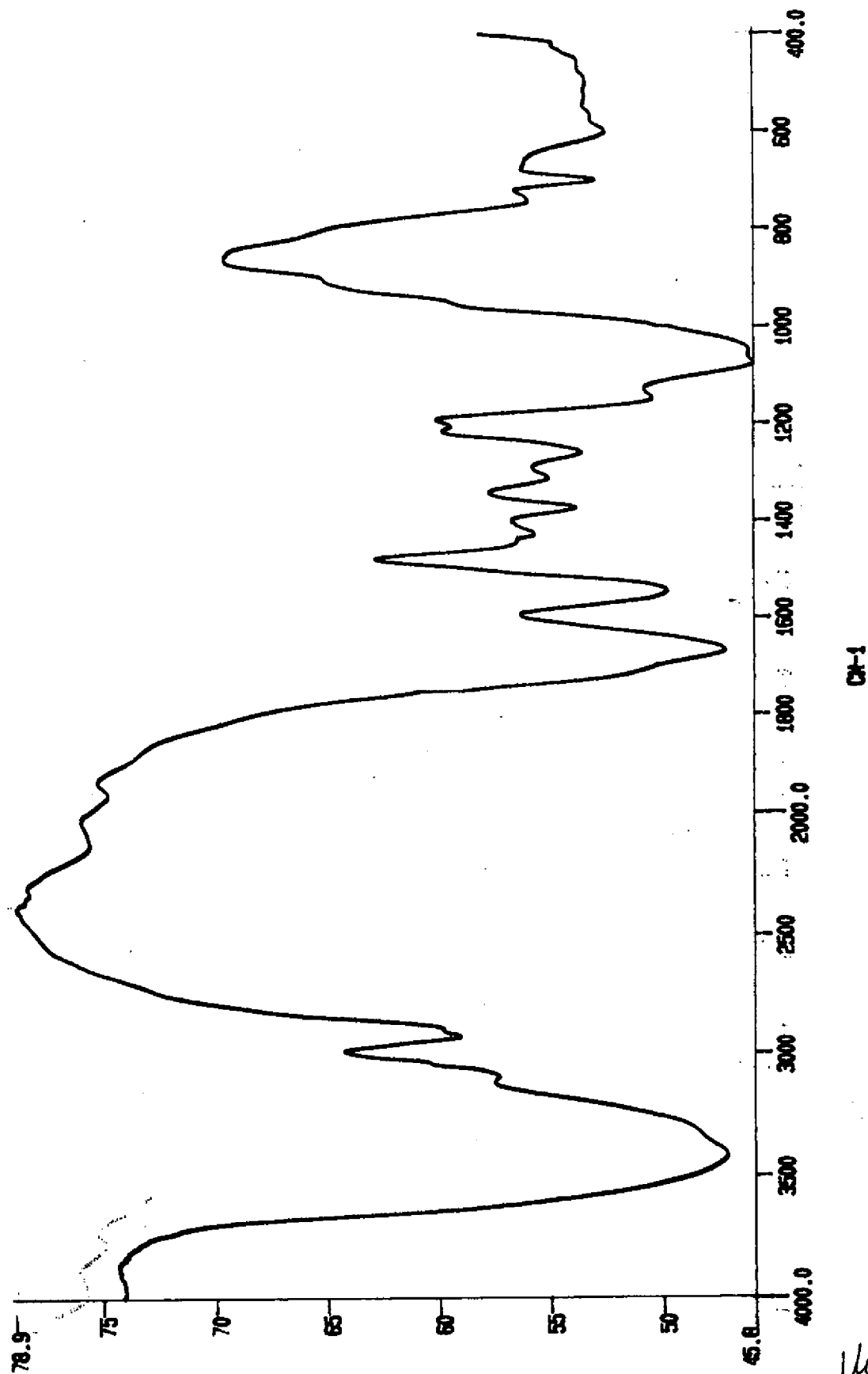


Figura 2

benzilammide dell'acido ialuronico



benzilammide dell'acido ialuronico

sale sodico dell'acido ialuronico

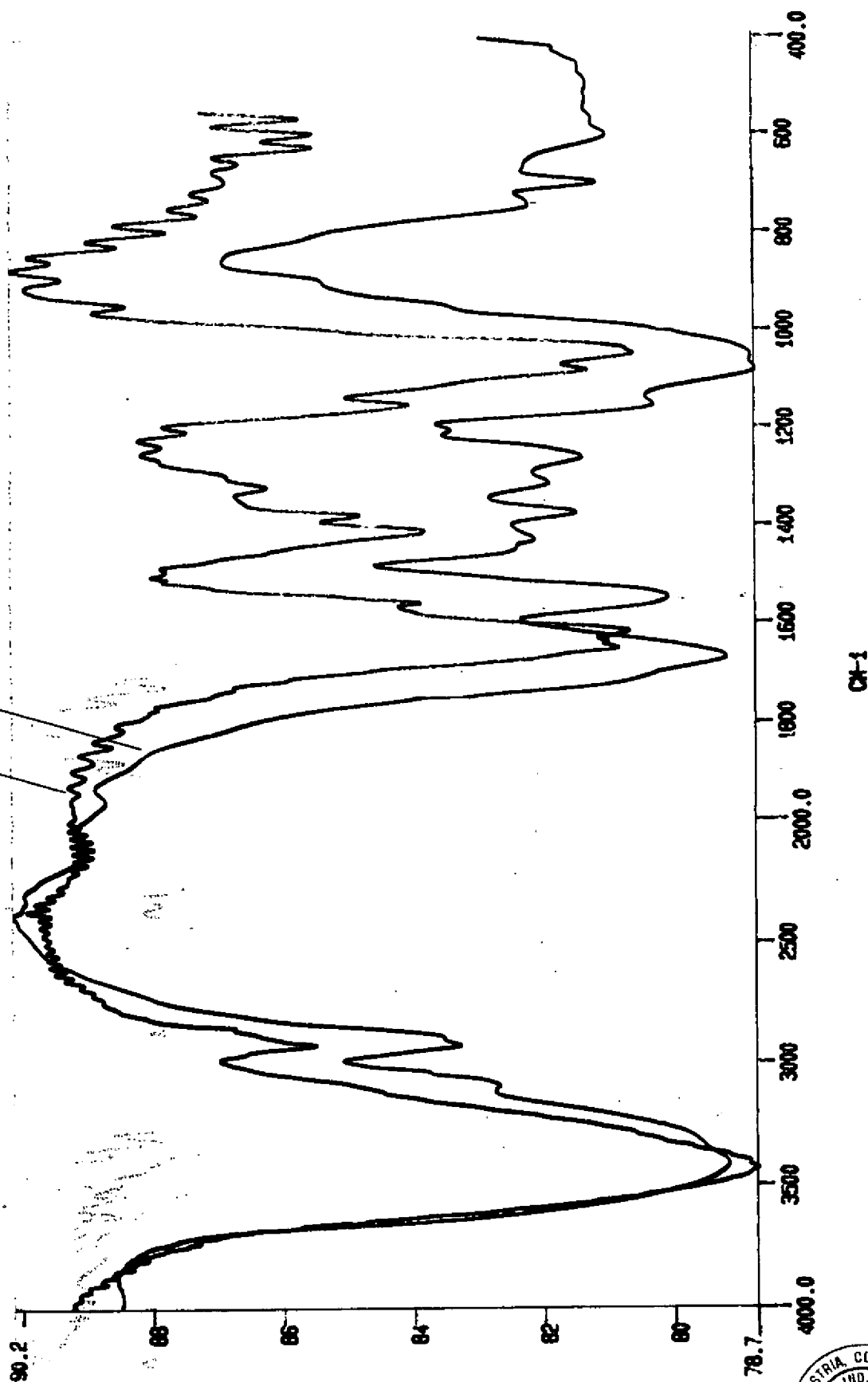


Figura 3

