



MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO
DIREZIONE GENERALE PER LA TUTELA DELLA PROPRIETÀ INDUSTRIALE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

UIBM

DOMANDA NUMERO	101994900353870
Data Deposito	11/03/1994
Data Pubblicazione	11/09/1995

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
C	07	D		
Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	K		

Titolo

ESTERI ATTIVI DI POLISACCARIDI CARBOSSILICI
--

- 1 -

Descrizione di una invenzione industriale dal titolo: "ESTERI ATTIVI DI POLISACCARIDI CARBOSSILICI" della Fidia Advanced Biopolymers S.r.l. con sede in Via De' Carpentieri, 3, Brindisi, Italia, nella persona del suo Legale rappresentante, Consigliere Delegato, Dr. Lanfranco Callegaro.

Inventori: Zefferino Righetto

Davide Bellini

Depositata il con N.....

PD 9 4 A 0 0 0 0 4 3

*** **

OGGETTO DELL'INVENZIONE

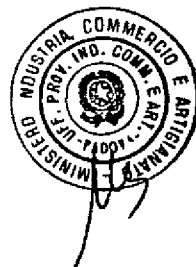
L'invenzione concerne esteri attivi di polisaccaridi carbossilici e di loro derivati semisintetici in cui una parte o la totalità delle funzioni carbossiliche é esterificata con alcoli della serie aromatica, eterociclica aromatica e N-idrossilammine e, nel caso di esteri attivi parziali, le rimanenti funzioni carbossiliche sono salificate con sali di ammonio quaternari o metalli.

L'invenzione descrive anche un metodo per la sintesi di tali esteri attivi a partire da polisaccaridi carbossilici e dai loro derivati semisintetici.

L'invenzione descrive inoltre metodi che, a partire da esteri attivi, permettono di ottenere polisaccaridi modificati ed il loro impiego nel settore biomedico.

CAMPO DELL'INVENZIONE

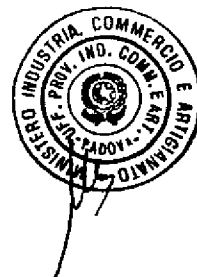
Sono noti in letteratura i metodi di sintesi e le applicazioni di esteri attivi per gli amminoacidi, i quali costituiscono degli intermedi stabili utili nella sintesi di peptidi (a tale scopo vedasi: Fields, G.B. and Noble,



- 2 -

R.L., Int. J. Peptide Protein Res., 35, (1990), 161-214; Atherton, E. and Sheppard, R. C. in "Solid Phase Peptide Synthesis, a practical approach", (1989), IRL Press at Oxford; Bodanszky, M. in "Principles of Peptide Synthesis", (1984), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg). Tali esteri permettono una maggiore reattività del gruppo carbossilico nelle reazioni di sostituzione nucleofila in quanto il gruppo fortemente elettron attrattore legato al carbonio carbonilico può essere facilmente sostituito da un nucleofilo (solfuro, ammina, ossidrilico alcolico) per dar luogo a tioesteri, ammidi ed esteri in opportune condizioni di reazione, vale a dire solvente, temperatura, catalizzatori. A questa classe di esteri attivi appartengono gli esteri con alcoli aromatici, aromatici sostituiti, eterociclici aromatici, eterociclici aromatici sostituiti e con N-idrossilammine.

I polisaccaridi carbossilici utilizzabili nella presente invenzione sono tutti quelli conosciuti e descritti nella letteratura ed i loro derivati semisintetici. Tra i primi vi sono i glicosamminoglicani, l'acido alginico, il gellano, la carbossimetilcellulosa, la carbossimetilchitina ed il carbossimetilamido. Tra i glicosamminoglicani notevole importanza riveste l'acido ialuronico. Tra i derivati semisintetici dei polisaccaridi sono da considerarsi i sali, in particolare i sali di ammonio quaternari. Altri importanti derivati semisintetici utilizzabili secondo la presente invenzione sono gli esteri parziali di polisaccaridi carbossilici con alcoli alifatici, aralifatici, eterociclici e cicloalifatici. I metodi di sintesi e le applicazioni di sali di ammonio quaternari, in particolare di sali di



- 3 -

tetrabutylammonio, e di esteri di polisaccaridi carbossilici con alcoli alifatici, aralifatici, eterociclici e cicloalifatici sono note dalla letteratura, in particolare per i derivati semisintetici dell'acido ialuronico vedasi il brevetto italiano della Richiedente nr. 1.203.815 (dep. N. 48202A86 del 30.06.1986).

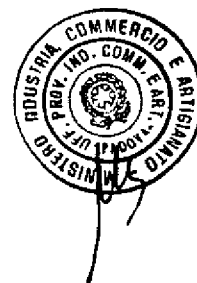
La stabilità e la versatilità degli esteri attivi di polisaccaridi carbossilici rendono questi composti utili nella sintesi di polisaccaridi modificati, in particolare nella sintesi di ammidi, e tra queste quelle che si ottengono per reazione con un'ammina primaria, un amminoacido, un peptide o una proteina, nella sintesi di tioesteri e di esteri.

DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE

Gli esteri attivi di polisaccaridi carbossilici e di loro derivati semisintetici, che costituiscono l'oggetto principale di questa invenzione, sono quelli con alcoli di tipo aromatico, aromatico sostituito, eterociclico aromatico, eterociclico aromatico sostituito ed N-idrossilammine. Gli alcoli principalmente usati sono: il pentafluorofenolo, il pentaclorofenolo, il triclorofenolo, il p-nitrofenolo, 2,4-dinitrofenolo, la 2-idrossi-piridina, la 3-idrossi-piridina, il 3,4-diidro-4-oxobenzotriazin-3-olo, il 4-idrossi-2,5-difenil-3(2H)-tiofenone-1,1-diossido, il 3-fenil-1-(p-nitrofenil)-2-pyrazolin-5-one, il 3-metil-1-(p-nitrofenil)-2-pyrazolin-5-one, l'N-idrossisuccinimide, la N-idrossitalimide.

Tra gli esteri che si possono ottenere certamente i più interessanti sono il p-nitrofenil estere, il pentafluorofenil estere, il 4-diidro-4-oxo-





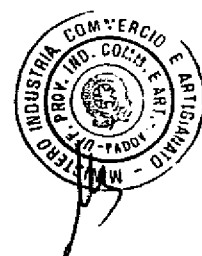
- 5 -

esteri parziali vanno ricordati gli esteri parziali dell'acido ialuronico denominati HYAFF (brevetto italiano della Richiedente nr. 1.203.815 - dep. N. 48202A86 del 30.06.1986).).

Sorprendentemente si é riusciti ad ottenere esteri attivi di polisaccaridi carbossilici e di loro derivati semisintetici senza reazioni collaterali indesiderate (tra queste é da annoverare in primo luogo la formazione di ponti intra ed inter catena che portano al cosiddetto fenomeno dell'autoreticolazione).

La reazione viene condotta aggiungendo il reattivo di esterificazione ad una soluzione del polisaccaride in forma di sale di tetrabutylammonio o ad una soluzione di estere parziale del polisaccaride, per il quale le rimanenti funzioni carbossiliche sono in forma di sale di tetrabutylammonio mediante l'impiego di solventi aprotici come dimetilsolfossido, N-metil pirrolidone ed N,N'-dimetilformammide in un intervallo di temperature compreso tra 0 e 60°C, a seconda dei reattivi usati, in particolare tra 25 e 40°C. I derivati reattivi che possono essere usati per la sintesi degli esteri attivi sono i trifluoroacetati arilici, tra cui il p-nitrofenil trifluoroacetato ed il pentafluorofenil trifluoroacetato, i fosfiti ed i solfiti arilici, tra cui il di-pentafluorofenil solfito, i carbonati, tra cui il Di-(N-succinimidil) carbonato ed il 4,6-difeniltieno-[3,4-d]-1,3-dioxol-2-one 5,5-diossido (TDO carbonato o reagente di Steglich).

Questa invenzione riguarda anche l'utilizzo di tali esteri attivi nella sintesi di nuovi derivati di polisaccaridi carbossilici. Gli esteri attivi di



polisaccaridi carbosilici e di loro derivati semisintetici mostrano una buona reattività nelle reazioni di sostituzione nucleofila al carbonio carbonilico del carbosile attivato. I nucleofili utilizzabili in queste reazioni sono le ammine primarie, gli amminoacidi, i peptidi, le proteine, i tioli e gli alcoli. Tra le ammine primarie si annoverano tutte le ammine alifatiche, aralifatiche ed i derivati sostituiti di tali ammine, tra questi le ammine alifatiche sostituite alla catena alchilica da alogeni, in particolare le perfluoroammine. Gli amminoacidi utilizzabili sono tutti quelli noti, lo stesso dicasi dei peptidi e delle proteine.

Le caratteristiche evidenziate dagli esteri attivi di polisaccaridi carbossilici e di loro derivati semisintetici, che all'esperto nel campo appariranno utilissime, sono la reattività e la selettività nei confronti delle ammine rispetto agli alcoli ed ai tioli nelle reazioni di sostituzione nucleofila. Questo comporta una notevole diminuzione delle reazioni secondarie indesiderate nella sintesi di nuovi polisaccaridi modificati che si hanno ad esempio quando si usano agenti condensanti (dicicloesilcarbodiimide, N-idrossibenzotriazolo, ecc.) o per la presenza di più gruppi funzionali (ad esempio amminico ed ossidrilico).

I nuovi polisaccaridi modificati, ottenuti a partire da un loro estere attivo, possono essere vantaggiosamente impiegati nella preparazione di articoli sanitari e chirurgici, quali ad esempio microcapsule, microsfele, fili, pellicole, garze, spugne, e trovano ampie applicazioni nel campo biomedico e farmaceutico come, ad esempio, nel settore della riparazione tissutale e nei sistemi di rilascio di sostanze biologicamente



- 7 -

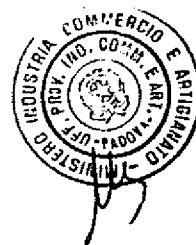
attive, in particolare di amminoacidi, peptidi e proteine.

ESEMPI

Esempio 1: Preparazione di un pentafluorofenil estere parziale di acido ialuronico sale di tetrabutylammonio - 5% dei gruppi carbossilici impegnati nella formazione dell'estere attivo - 95% dei gruppi carbossilici in forma di sale di tetrabutylammonio

6,2 grammi di acido ialuronico sale di tetrabutylammonio con un peso molecolare di 180000 Dalton corrispondenti a 10 meq. di una unità monomerica vengono solubilizzati in 310 ml di N-metilpirrolidone a 25°C. A questa soluzione si aggiungono sotto agitazione 0,040 ml di piridina (0,5 meq) e successivamente 0,088 ml di pentafluorofenil trifluoroacetato (0,5 meq). Si lascia la miscela di reazione in agitazione a 25°C per 1 ora quindi il prodotto viene precipitato per aggiunta di 2 litri di acetato di etile. Si filtra e si lava 2 volte con 500 ml di etile acetato. Quindi si secca sotto alto vuoto per 24 ore a 30°C. Si ottengono 6,15 gr del prodotto con il titolo desiderato. L'analisi quantitativa della percentuale di esterificazione é stata fatta andando a vedere mediante gascromatografia il contenuto di pentafluorofenolo dopo idrolisi alcalina dell'estere.

Esempio 2: Preparazione di un pentafluorofenil estere parziale di acido ialuronico sale di tetrabutylammonio - 10% dei gruppi carbossilici impegnati nella formazione dell'estere attivo -



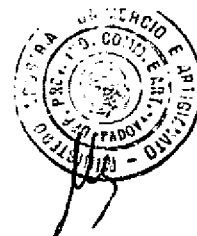
- 8 -

90% dei gruppi carbossilici in forma di sale di tetrabutylammonio

6,2 grammi di acido ialuronico sale di tetrabutylammonio con un peso molecolare di 160000 Dalton corrispondenti a 10 meq. di una unità monomerica vengono solubilizzati in 310 ml di N-metilpirrolidone a 25°C. A questa soluzione si aggiungono sotto agitazione 0,080 ml di piridina (1 meq) e successivamente 0,176 ml di pentafluorofenil trifluoroacetato (1 meq). Si lascia la miscela di reazione in agitazione a 25°C per 1 ora quindi il prodotto viene precipitato per aggiunta di 2 litri di acetato di etile. Si filtra e si lava 2 volte con 500 ml di etile acetato. Quindi si secca sotto alto vuoto per 24 ore a 30°C. Si ottengono 6,12 gr del prodotto con il titolo desiderato. L'analisi quantitativa della percentuale di esterificazione é stata fatta andando a vedere mediante gascromatografia il contenuto di pentafluorofenolo dopo idrolisi alcalina dell'estere.

Esempio 3: Preparazione di un pentafluorofenil estere parziale di acido ialuronico sale di tetrabutylammonio - 25% dei gruppi carbossilici impegnati nella formazione dell'estere attivo - 75% dei gruppi carbossilici in forma di sale di tetrabutylammonio

6,2 grammi di acido ialuronico sale di tetrabutylammonio con un peso molecolare di 120000 Dalton corrispondenti a 10 meq. di una unità monomerica vengono solubilizzati in 310 ml di N-metilpirrolidone a

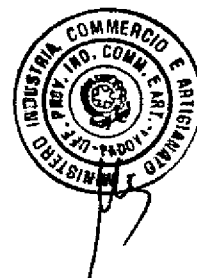


- 9 -

25°C. A questa soluzione si aggiungono sotto agitazione 0,200 ml di piridina (2,5 meq) e successivamente 0,440 ml di pentafluorofenil trifluoroacetato (2,5 meq). Si lascia la miscela di reazione in agitazione a 25°C per 1 ora quindi il prodotto viene precipitato per aggiunta di 2 litri di acetato di etile. Si filtra e si lava 2 volte con 500 ml di etile acetato. Quindi si secca sotto alto vuoto per 24 ore a 30°C. Si ottengono 6,01gr del prodotto con il titolo desiderato. L'analisi quantitativa della percentuale di esterificazione é stata fatta andando a vedere mediante gascromatografia il contenuto di pentafluorofenolo dopo idrolisi alcalina dell'estere.

Esempio 4: Preparazione di un pentafluorofenil estere parziale di acido ialuronico sale di tetrabutylammonio - 50% dei gruppi carbossilici impegnati nella formazione dell'estere attivo - 50% dei gruppi carbossilici in forma di sale di tetrabutylammonio

6,2 grammi di acido ialuronico sale di tetrabutylammonio con un peso molecolare di 80000 Dalton corrispondenti a 10 meq. di una unità monomerica vengono solubilizzati in 310 ml di N-metilpirrolidone a 25°C. A questa soluzione si aggiungono sotto agitazione 0,400 ml di piridina (5 meq) e successivamente 0,880 ml di pentafluorofenil trifluoroacetato (5 meq). Si lascia la miscela di reazione in agitazione a 25°C per 1 ora quindi il prodotto viene precipitato per aggiunta di 2 litri di acetato di etile. Si filtra e si lava 2 volte con 500 ml di etile acetato.

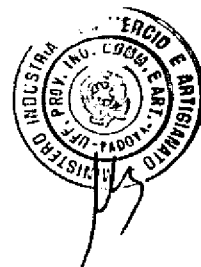


- 10 -

Quindi si secca sotto alto vuoto per 24 ore a 30°C. Si ottengono 5,82 gr del prodotto con il titolo desiderato. L'analisi quantitativa della percentuale di esterificazione é stata fatta andando a vedere mediante gascromatografia il contenuto di pentafluorofenolo dopo idrolisi alcalina dell'estere.

Esempio 5: Preparazione di un pentafluorofenil estere parziale di acido ialuronico sale di tetrabutylammonio - 75% dei gruppi carbossilici impegnati nella formazione dell'estere attivo - 25% dei gruppi carbossilici in forma di sale di tetrabutylammonio

6,2 grammi di acido ialuronico sale di tetrabutylammonio con un peso molecolare di 400000 Dalton corrispondenti a 10 meq. di una unità monomerica vengono solubilizzati in 310 ml di N-metilpirrolidone a 25°C. A questa soluzione si aggiungono sotto agitazione 0,600 ml di piridina (7,5 meq) e successivamente 1,32 ml di pentafluorofenil trifluoroacetato (7,5 meq). Si lascia la miscela di reazione in agitazione a 25°C per 1 ora quindi il prodotto viene precipitato per aggiunta di 2 litri di acetato di etile. Si filtra e si lava 2 volte con 500 ml di etile acetato. Quindi si secca sotto alto vuoto per 24 ore a 30°C. Si ottengono 5,62 gr del prodotto con il titolo desiderato. L'analisi quantitativa della percentuale di esterificazione é stata fatta andando a vedere mediante gascromatografia il contenuto di pentafluorofenolo dopo idrolisi alcalina dell'estere.



- 11 -

Esempio 6: Preparazione di pentafluorofenil estere totale di acido ialuronico - 100% dei gruppi carbossilici impegnati nella formazione dell'estere attivo

6,2 grammi di acido ialuronico sale di tetrabutylammonio con un peso molecolare di 180000 Dalton corrispondenti a 10 meq. di una unità monomerica vengono solubilizzati in 310 ml di N-metilpirrolidone a 25°C. A questa soluzione si aggiungono sotto agitazione 0,800 ml di piridina (10 meq) e successivamente 1,760 ml di pentafluorofenil trifluoroacetato (10 meq). Si lascia la miscela di reazione in agitazione a 25°C per 1 ora quindi il prodotto viene precipitato per aggiunta di 2 litri di acetato di etile. Si filtra e si lava 2 volte con 500 ml di etile acetato. Quindi si secca sotto alto vuoto per 24 ore a 30°C. Si ottengono 5,44 gr del prodotto con il titolo desiderato. L'analisi quantitativa della percentuale di esterificazione é stata fatta andando a vedere mediante gascromatografia il contenuto di pentafluorofenolo dopo idrolisi alcalina dell'estere.

Esempio 7: Preparazione di un 4-nitrofenil estere parziale di acido ialuronico sale di tetrabutylammonio - 25% dei gruppi carbossilici impegnati nella formazione dell'estere attivo - 75% dei gruppi carbossilici in forma di sale di tetrabutylammonio

6,2 grammi di acido ialuronico sale di tetrabutylammonio con un peso molecolare di 120000 Dalton corrispondenti a 10 meq. di una unità

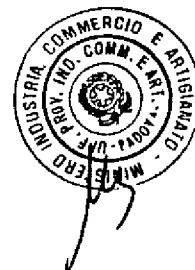


- 12 -

monomerica vengono solubilizzati in 310 ml di dimetilsolfossido a 25°C. A questa soluzione si aggiungono sotto agitazione 0,200 ml di piridina (2,5 meq) e successivamente 0,59 gr di 4-nitrofenil trifluoroacetato solubilizzato in 1 ml di dimetilsolfossido (2,5 meq). Si lascia la miscela di reazione in agitazione a 25°C per 1 ora quindi il prodotto viene precipitato per aggiunta di 2 litri di acetato di etile. Si filtra e si lava 2 volte con 500 ml di etile acetato. Quindi si secca sotto alto vuoto per 24 ore a 30°C. Si ottengono 5,8 gr del prodotto con il titolo desiderato. L'analisi quantitativa della percentuale di esterificazione è stata fatta andando a vedere mediante cromatografia liquida il contenuto di 4-nitrofenolo dopo idrolisi alcalina dell'estere.

Esempio 8: Preparazione di un estere parziale di acido ialuronico sale di tetrabutylammonio con il 4-idrossi-2,5-difenil-3(2H)-tiofene-1,1-diossido - 50% dei gruppi carbossilici impegnati nella formazione dell'estere attivo - 50% dei gruppi carbossilici in forma di sale di tetrabutylammonio

6,2 grammi di acido ialuronico sale di tetrabutylammonio con un peso molecolare di 800000 Dalton corrispondenti a 10 meq. di una unità monomerica vengono solubilizzati in 310 ml di dimetilsolfossido a 25°C. A questa soluzione si aggiungono sotto agitazione 1,63 gr di 4,6-difeniltieno-[3,4-d]-1,3-dioxol-2-one 5,5-diossido (reagente di Steglich) solubilizzati in 5 ml di dimetilsolfossido (5 meq). Si lascia la miscela di reazione in agitazione a 25°C per 30 minuti quindi il

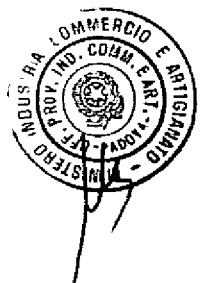


- 13 -

prodotto viene precipitato per aggiunta di 2 litri di acetato di etile. Si filtra e si lava 2 volte con 500 ml di etile acetato. Quindi si secca sotto alto vuoto per 24 ore a 30°C. Si ottengono 6,39 gr del prodotto con il titolo desiderato. L'analisi quantitativa della percentuale di esterificazione é stata fatta andando a vedere mediante cromatografia liquida il contenuto di 4-idrossi-2,5-difenil-3(2H)-tiofenone-1,1-diossido dopo idrolisi alcalina dell'estere.

Esempio 9: Preparazione di un pentafluorofenil estere parziale di acido alginico sale di tetrabutyl ammonio - 20% dei gruppi carbossilici impegnati nella formazione dell'estere attivo - 80% dei gruppi carbossilici in forma di sale di tetrabutylammonio

4,17 grammi di acido alginico sale di tetrabutylammonio con un peso molecolare di 100000 Dalton corrispondenti a 10 meq. di una unità monomerica vengono solubilizzati in 210 ml di N-metilpirrolidone a 25°C. A questa soluzione si aggiungono sotto agitazione 0,160 ml di piridina (2 meq) e successivamente 0,352 ml di pentafluorofenil trifluoroacetato (2 meq). Si lascia la miscela di reazione in agitazione a 25°C per 1 ora quindi il prodotto viene precipitato per aggiunta di 2 litri di acetato di etile. Si filtra e si lava 2 volte con 500 ml di etile acetato. Quindi si secca sotto alto vuoto per 24 ore a 30°C. Si ottengono 4,04 gr del prodotto con il titolo desiderato. L'analisi quantitativa della percentuale di esterificazione é stata fatta andando a vedere mediante



- 14 -

gascromatografia il contenuto di pentafluorofenolo dopo idrolisi alcalina dell'estere.

Esempio 10: Preparazione di un pentafluorofenil estere parziale di HYAFF 7p50 (estere etilico dell'acido ialuronico) sale di tetrabutylammonio - 25% dei gruppi carbossilici impegnati nella formazione dell'estere attivo - 50% dei gruppi carbossilici esterificati con etanolo - 25% dei gruppi carbossilici in forma di sale di tetrabutylammonio

5,2 grammi di HYAFF 7p50 sale di tetrabutylammonio con un peso molecolare di 170000 Dalton corrispondenti a 10 meq. di una unità monomerica vengono solubilizzati in 260 ml di N-metilpirrolidone a 25°C. A questa soluzione si aggiungono sotto agitazione 0,200 ml di piridina (2,5 meq) e successivamente 0,440 ml di pentafluorofenil trifluoroacetato (2,5 meq). Si lascia la miscela di reazione in agitazione a 25°C per 1 ora quindi il prodotto viene precipitato per aggiunta di 2 litri di acetato di etile. Si filtra e si lava 2 volte con 500 ml di etile acetato. Quindi si secca sotto alto vuoto per 24 ore a 30°C. Si ottengono 5 gr del prodotto con il titolo desiderato. L'analisi quantitativa della percentuale di esterificazione é stata fatta andando a vedere mediante gascromatografia il contenuto di pentafluorofenolo dopo idrolisi alcalina dell'estere.



- 15 -

Esempio 11: Preparazione di un pentafluorofenil estere di HYAFF 11p75 (estere benzilico di acido ialuronico) sale di tetrabutylammonio - 25% dei gruppi carbossilici impegnati nella formazione dell'estere attivo - 75% dei gruppi carbossilici esterificati con alcool benzilico

5,07 grammi di HYAFF 11p75 sale di tetrabutylammonio con un peso molecolare di 120000 Dalton corrispondenti a 10 meq. di una unità monomerica vengono solubilizzati in 260 ml di N-metilpirrolidone a 25°C. A questa soluzione si aggiungono sotto agitazione 0,200 ml di piridina (2,5 meq) e successivamente 0,440 ml di pentafluorofenil trifluoroacetato (2,5 meq). Si lascia la miscela di reazione in agitazione a 25°C per 1 ora quindi il prodotto viene precipitato per aggiunta di 2 litri di acetato di etile. Si filtra e si lava 2 volte con 500 ml di etile acetato. Quindi si secca sotto alto vuoto per 24 ore a 30°C. Si ottengono 4,8 gr del prodotto con il titolo desiderato. L'analisi quantitativa della percentuale di esterificazione é stata fatta andando a vedere mediante gascromatografia il contenuto di pentafluorofenolo dopo idrolisi alcalina dell'estere.

Esempio 12: Preparazione della N-etil ammido parziale dell'acido ialuronico sale sodico - 10% delle funzioni carbossiliche trasformate in N-etil ammidi - 90% delle funzioni carbossiliche salificate con sodio

6,13 grammi dell'estere attivo ottenuto nell'esempio 2 corrispondenti a

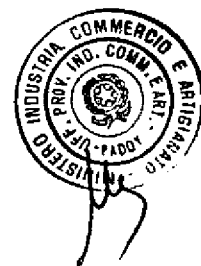


- 16 -

10 meq di unità monomerica vengono solubilizzati in 305 ml di N-metil pirrolidone a 25°C. A questa soluzione vengono aggiunti sotto agitazione 66 µl di etilammina (1 meq). Si lascia sotto agitazione per 2 ore quindi si aggiungono 100 ml di una soluzione al 2% di sodio cloruro in acqua deionizzata. L'aggiunta a questa miscela di reazione di 800 ml di acetone provoca la formazione di un precipitato che viene filtrato e lavato per 3 volte con 100 ml di acetone/acqua 5:1, per 3 volte con 100 ml di acetone ed infine essicato in alto vuoto per 24 ore a 30°C. Si ottengono 4.0 gr del prodotto desiderato. La determinazione quantitativa dei gruppi ammidici viene condotta analizzando il contenuto di etilammina dopo idrolisi alcalina.

Esempio 13: Preparazione della N-benzil ammido parziale dell'acido ialuronico sale sodico - 50% delle funzioni carbossiliche trasformate in N-benzil ammidi - 50% delle funzioni carbossiliche salificate con sodio

5,83 grammi dell'estere attivo ottenuto nell'esempio 4 corrispondenti a 10 meq di unità monomerica vengono solubilizzati in 290 ml di N-metil pirrolidone a 25°C. A questa soluzione vengono aggiunti sotto agitazione 5,46 ml di benzilammina (5 meq). Si lascia sotto agitazione per 2 ore quindi si aggiungono 100 ml di una soluzione al 2% di sodio cloruro in acqua deionizzata. L'aggiunta a questa miscela di reazione di 800 ml di acetone provoca la formazione di un precipitato che viene



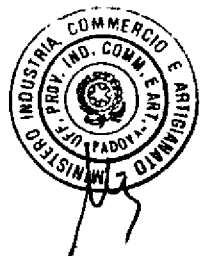
- 17 -

filtrato e lavato per 3 volte con 100 ml di acetone/acqua 5:1, per 3 volte con 100 ml di acetone ed infine essicato in alto vuoto per 24 ore a 30°C. Si ottengono 4.3 gr del prodotto desiderato. La determinazione quantitativa dei gruppi ammidici viene condotta analizzando il contenuto di benzilammina dopo idrolisi alcalina.

Esempio 14: Sintesi di un derivato ammidico dell'acido ialuronico con arginina - 100% delle funzioni carbossiliche trasformate in ammidi dell'acido ialuronico con arginina

5,45 grammi dell'estere attivo ottenuto nell'esempio 6 corrispondenti a 10 meq di unità monomerica vengono solubilizzati in 270 ml di N-metil pirrolidone a 25°C. A questa soluzione vengono aggiunti sotto agitazione 1,74 gr di D-arginina (10 meq) solubilizzati in 10 ml di N-metil pirrolidone. Si lascia sotto agitazione per 2 ore quindi si aggiungono 800 ml di acetone. Si ha la formazione di un precipitato che viene filtrato, lavato per 3 volte con 100 ml di acetone ed infine essicato in alto vuoto per 24 ore a 30°C. Si ottengono 5,35 gr del prodotto desiderato. La determinazione quantitativa dei gruppi ammidici viene condotta analizzando il contenuto di arginina dopo idrolisi acida in acido cloridrico 6N (analisi amminoacidica).

Esempio 15: Sintesi di un derivato peptidico di HYAFF 7p50 (estere etilico di acido ialuronico) con un peptide avente sequenza H-Arg-Gly-Asp-OH - 50% delle funzioni carbossiliche



- 18 -

esterificate con etanolo - 25% delle funzioni carbossiliche
trasformate in ammidi dell'acido ialuronico con il peptide -
25% delle funzioni carbossiliche salificate con sodio

4,95 grammi dell'estere attivo ottenuto nell'esempio 10 corrispondenti a 10 meq di unità monomerica vengono solubilizzati in 250 ml di N-metil pirrolidone a 25°C. A questa soluzione vengono aggiunti sotto agitazione 1,08 gr del peptide considerato avente sequenza H-Arg-Gly-Asp-OH (2,5 meq) solubilizzati in 10 ml di N-metil pirrolidone. Si lascia sotto agitazione per 2 ore quindi si aggiungono 100 ml di una soluzione al 2% di sodio cloruro in acqua deionizzata. L'aggiunta a questa miscela di reazione di 800 ml di acetone provoca la formazione di un precipitato che viene filtrato e lavato per 3 volte con 100 ml di acetone/acqua 5:1, per 3 volte con 100 ml di acetone ed infine essiccato in alto vuoto per 24 ore a 30°C. Si ottengono 4,8 gr del prodotto desiderato. La determinazione quantitativa dei gruppi ammidici viene condotta analizzando il contenuto di amminoacidi.

Esempio 16: Sintesi di un derivato peptidico di HYAFF 11p75 (estere benzilico di acido ialuronico) con un peptide avente sequenza H-Gly-Pro-Arg-OH - 75% delle funzioni carbossiliche esterificate con alcool benzilico - 25% delle funzioni carbossiliche trasformate in ammidi dell'acido ialuronico con il peptide

4,8 grammi dell'estere attivo ottenuto nell'esempio 11 corrispondenti a

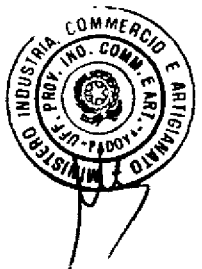


- 19 -

10 meq di unità monomerica vengono solubilizzati in 240 ml di N-metil pirrolidone a 25°C. A questa soluzione vengono aggiunti sotto agitazione 0,82 gr del peptide considerato avente sequenza H-Gly-Pro-Arg-OH (2,5 meq) solubilizzati in 5 ml di N-metil pirrolidone. Si lascia sotto agitazione per 2 ore quindi si aggiungono 100 ml di una soluzione al 2% di sodio cloruro in acqua deionizzata. L'aggiunta a questa miscela di reazione di 800 ml di acetone provoca la formazione di un precipitato che viene filtrato e lavato per 3 volte con 100 ml di acetone/acqua 5:1, per 3 volte con 100 ml di acetone ed infine essiccato in alto vuoto per 24 ore a 30°C. Si ottengono 5,2 gr del prodotto desiderato. La determinazione quantitativa dei gruppi ammidici viene condotta analizzando il contenuto di amminoacidi.

Esempio 17: Preparazione di un materiale spugnoso fatto con il derivato peptidico di HYAFF 7p50 (estere etilico di acido ialuronico) con un peptide avente sequenza H-Arg-Gly-Asp-OH.

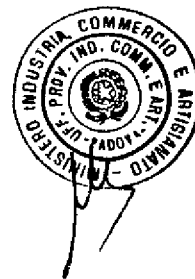
4 grammi del derivato peptidico di HYAFF 7p50 con un peptide avente sequenza H-Arg-Gly-Asp-OH (descritto nell'esempio 15) vengono solubilizzati in 120 ml di dimetilsolfossido. La soluzione viene filtrata e versata su un vassoio di acciaio inox 3 x 4 cm. Il vassoio viene inserito all'interno di un ambiente controllato alla temperatura di 25°C e saturo di vapor acqueo, che ha la funzione di coagulante. Si ottiene un pannello gelatinoso che viene ritagliato in pezzi di 1 x 1 cm immersi



successivamente in 2 l di una soluzione acquosa di NaCl al 5%. Il materiale che si ottiene viene quindi sottoposto a liofilizzazione. Si ottiene un materiale spugnoso che viene lavato 3 volte con 1 l di acqua distillata per eliminare il sodio cloruro incorporato. Si ottengono pezzi di materiale spugnoso di dimensioni 0,9 x 0,9 cm e di spessore 4 mm.

Esempio 18: Preparazione di microsfere ottenute a partire dal derivato peptidico di HYAFF 11p75 (estere benzilico di acido ialuronico) con un peptide avente sequenza H-Gly-Pro-Arg-OH, descritto nell'esempio 16.

Il derivato peptidico di HYAFF 11p75 con un peptide avente sequenza H-Gly-Pro-Arg-OH, descritto nell'esempio 16, viene solubilizzato in dimetilsolfossido ad una concentrazione del 7% p/v (50 ml). A parte viene preparata una miscela di olio minerale ad alta viscosità contenente arlacel, tensioattivo non ionico, alla concentrazione 1% p/v (800 ml). A quest'ultima miscela viene aggiunta sotto agitazione la soluzione del derivato peptidico. Si forma un emulsione alla quale si aggiunge etile acetato (2,5 l), miscibile con le fasi dell'emulsione ma nel quale il derivato peptidico risulta insolubile. La sospensione che si ottiene viene filtrata e le microsfere ottenute vengono lavate con 6 l di n-esano. La grandezza media particellare é di 15 µm.



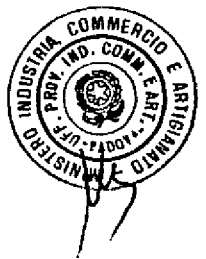
- 21 -

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. Esteri attivi di polisaccaridi carbossilici e di loro derivati semisintetici nei quali una parte o la totalità delle funzioni carbossiliche è esterificata con alcoli della serie aromatica, eterociclica aromatica e N-idrossilammine e, nel caso di esteri parziali, i rimanenti gruppi carbossilici sono salificati con sali di ammonio quaternari, metalli alcalini o alcalino-terrosi.
2. Esteri attivi di polisaccaridi carbossilici e di loro derivati semisintetici secondo la rivendicazione 1 con alcoli aromatici, in particolare fluoroderivati, cloderivati e nitroderivati.
3. Esteri attivi di polisaccaridi carbossilici e di loro derivati semisintetici secondo le rivendicazioni 1 e 2 dove gli alcoli aromatici sono costituiti da pentafluorofenolo, pentaclorofenolo e 4-nitrofenolo.
4. Esteri attivi di polisaccaridi carbossilici e di loro derivati semisintetici secondo la rivendicazione 1 con alcoli eterociclici aromatici, in particolare i benzotriazolin derivati, i tiofen derivati,



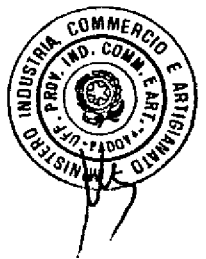
- 21 -

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. Esteri attivi di polisaccaridi carbossilici e di loro derivati semisintetici nei quali una parte o la totalità delle funzioni carbossiliche è esterificata con alcoli della serie aromatica, eterociclica aromatica e N-idrossilammine e, nel caso di esteri parziali, i rimanenti gruppi carbossilici sono salificati con sali di ammonio quaternari, metalli alcalini o alcalino-terrosi.
2. Esteri attivi di polisaccaridi carbossilici e di loro derivati semisintetici secondo la rivendicazione 1 con alcoli aromatici, in particolare fluoroderivati, cloderivati e nitroderivati.
3. Esteri attivi di polisaccaridi carbossilici e di loro derivati semisintetici secondo le rivendicazioni 1 e 2 dove gli alcoli aromatici sono costituiti da pentafluorofenolo, pentaclorofenolo e 4-nitrofenolo.
4. Esteri attivi di polisaccaridi carbossilici e di loro derivati semisintetici secondo la rivendicazione 1 con alcoli eterociclici aromatici, in particolare i benzotriazolin derivati, i tiofen derivati,



- 22 -

le idrossipiridine ed i pirazolin derivati.

5. Esteri attivi di polisaccaridi carbossilici e di loro derivati semisintetici secondo le rivendicazioni 1 e 4 dove gli alcoli eterociclici aromatici sono costituiti da 2-idrossi-piridina, 3-idrossi-piridina, 3,4-diidro-4-oxobenzotriazin-3-olo, 4-idrossi-2,5-difenil-3(2H)-tiofenone 1,1-diossido, 3-fenil-1-(p-nitrofenil)-2-pyrazolin-5-one, 3-metil-1-(p-nitrofenil)-2-pyrazolin-5-one.
6. Esteri attivi di polisaccaridi carbossilici e di loro derivati semisintetici secondo la rivendicazione 1 con N-idrossilammine, in particolare la N-idrossisuccinimide e N-idrossiftalimide.
7. Sali di esterii attivi parziali di polisaccaridi carbossilici e di loro derivati semisintetici secondo la rivendicazione 1 con metalli alcalini, alcalino-terrosi e sali di ammonio quaternari.
8. Sali di esterii attivi parziali di polisaccaridi carbossilici e di loro derivati semisintetici secondo le rivendicazioni 1 e 7 dove i sali di ammonio quaternario vengono scelti nel gruppo formato dai sali di tetraalchil ammonio.
9. Sali di esterii attivi parziali di polisaccaridi carbossilici e di loro derivati semisintetici secondo la rivendicazione 8 dove il sale di tetraalchil ammonio é costituito da tetrabutylammonio.
10. Esteri attivi secondo le rivendicazioni da 1 a 6 sintetizzati a partire da polisaccaridi carbossilici scelti nel gruppo formato da glicosamminoglicani, acido alginico, gellano, carbossimetilcellulosa, carbossimetilchitina e carbossimetilamido.



- 23 -

11. Esteri attivi secondo la rivendicazione da 10 dove il glicosamminoglicano usato é l'acido ialuronico.
12. Esteri attivi secondo le rivendicazioni da 1 a 6 sintetizzati a partire da sali di tetrabutylammonio di glicosamminoglicani, acido alginico, gellano, carbossimetilcellulosa, carbossimetilchitina e carbossimetilamido.
13. Esteri attivi secondo la rivendicazione da 12 sintetizzati a partire da sali di tetrabutylammonio di acido ialuronico.
14. Esteri attivi secondo le rivendicazioni da 1 a 6 di derivati semisintetici di polisaccaridi carbossilici secondo le rivendicazioni 10 e 11.
15. Esteri attivi secondo la rivendicazione 14 in cui i derivati semisintetici di polisaccaridi carbossilici appartengono alla categoria degli esteri parziali di tali polisaccaridi carbossilici e in particolare esteri con alcoli della serie alifatica, aralifatica, cicloalifatica ed eterociclica.
16. Esteri attivi secondo la rivendicazione 15 in cui i derivati semisintetici di polisaccaridi carbossilici sono esteri parziali con alcoli della serie alifatica aventi un numero di atomi di carbonio compreso tra 2 e 34.
17. Esteri attivi secondo la rivendicazione 16 in cui i derivati semisintetici di polisaccaridi carbossilici sono esteri parziali con alcool etilico.
18. Esteri attivi secondo la rivendicazione da 17 in cui i derivati



- 24 -

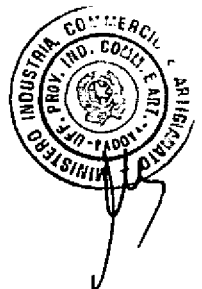
semisintetici di polisaccaridi carbossilici sono esteri parziali con alcoli della serie aralifatica.

19. Esteri attivi secondo la rivendicazione 18 in cui i derivati semisintetici di polisaccaridi carbossilici sono esteri parziali con alcool benzilico.
20. Un estere attivo ottenuto secondo la rivendicazione 1 scelto nel gruppo formato da:
 - Pentafluorofenil estere di acido ialuronico con il 5% dei gruppi carbossilici coinvolti nella formazione dell'estere attivo ed il rimanente 95% dei gruppi carbossilici salificato con tetrabutylammonio;
 - Pentafluorofenil estere di acido ialuronico con il 10% dei gruppi carbossilici coinvolti nella formazione dell'estere attivo ed il rimanente 90% dei gruppi carbossilici salificato con tetrabutylammonio;
 - Pentafluorofenil estere di acido ialuronico con il 25% dei gruppi carbossilici coinvolti nella formazione dell'estere attivo ed il rimanente 75% dei gruppi carbossilici salificato con tetrabutylammonio;
 - Pentafluorofenil estere di acido ialuronico con il 50% dei gruppi carbossilici coinvolti nella formazione dell'estere attivo ed il rimanente 50% dei gruppi carbossilici salificato con tetrabutylammonio;
 - Pentafluorofenil estere di acido ialuronico con il 75% dei



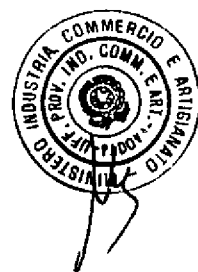
- 25 -

- gruppi carbossilici coinvolti nella formazione dell'estere attivo ed il rimanente 25% dei gruppi carbossilici salificato con tetrabutylammonio;
- Pentafluorofenil estere di acido ialuronico con il 100% dei gruppi carbossilici coinvolti nella formazione dell'estere attivo;
 - 4-nitrofenil estere di acido ialuronico con il 25% dei gruppi carbossilici coinvolti nella formazione dell'estere attivo ed il rimanente 75% dei gruppi carbossilici salificato con tetrabutylammonio;
 - 2,5-difenil-tiofen-4-il-3(2H)-one-1,1-diossido estere di acido ialuronico con il 50% dei gruppi carbossilici coinvolti nella formazione dell'estere attivo ed il rimanente 50% dei gruppi carbossilici salificato con tetrabutylammonio;
 - Pentafluorofenil estere di acido alginico con il 20% dei gruppi carbossilici coinvolti nella formazione dell'estere attivo ed il rimanente 80% dei gruppi carbossilici salificato con tetrabutylammonio;
 - Pentafluorofenil estere di estere etilico di acido ialuronico p50 con il 25% dei gruppi carbossilici impegnati nella formazione dell'estere attivo, 50% dei gruppi carbossilici esterificati con etanolo ed il rimanente 25% dei gruppi carbossilici salificato con tetrabutylammonio;
 - Pentafluorofenil estere di estere benzilico di acido ialuronico p75 con il 25% dei gruppi carbossilici impegnati nella



formazione dell'estere attivo ed il rimanente 75% dei gruppi carbossilici esterificati con alcol benzilico.

21. Processo per la sintesi di esteri attivi secondo le rivendicazioni 1-9 che consiste nel far reagire un sale di tetrabutylammonio del polisaccaride carbossilico o un sale di tetrabutylammonio di un derivato semisintetico con un derivato reattivo della funzione alcolica che si vuol legare al carbossile in un solvente aprotico ad una temperatura compresa tra 0 e 60°C.
22. Processo secondo la rivendicazione 21 per la sintesi di esteri attivi di polisaccaridi carbossilici o di loro derivati semisintetici dove il derivato reattivo della funzione alcolica che si vuol legare al carbossile viene scelto tra i trifluoroacetati, i carbonati, gli ossalati, i solfiti ed i fosfiti.
23. Processo secondo le rivendicazioni 21 e 22 per la sintesi di esteri attivi di polisaccaridi carbossilici o di loro derivati semisintetici dove il derivato reattivo della funzione alcolica che si vuol legare al carbossile viene scelto nel gruppo formato da 4-nitrofenil trifluoroacetato, pentafluorofenil trifluoroacetato, di-pentafluorofenil solfito, Di-(N-succinimidil) carbonato e 4,6-difeniltieno[3,4-d]-1,3-dioxol-2-one 5,5-diossido.
24. Processo secondo la rivendicazione 21 per la sintesi di esteri attivi di polisaccaridi carbossilici o di loro derivati semisintetici dove il solvente aprotico viene scelto tra dimetilsolfossido, N-metil pirrolidone e N,N'-dimetilformammide.



- 27 -

25. Processo secondo la rivendicazione 21 per la sintesi di esteri attivi di polisaccaridi carbossilici o di loro derivati semisintetici dove il materiale di partenza é in forma di sale di tetrabutylammonio.
26. Esteri attivi secondo la rivendicazione 1 per la preparazione di polisaccaridi modificati e di derivati semisintetici modificati.
27. Esteri attivi secondo la rivendicazione 26 per la preparazione di polisaccaridi modificati e di derivati semisintetici modificati dove tali modifiche sono costituite principalmente dalla formazione di nuovi legami esterei, tioesterei ed ammidici.
28. Esteri attivi secondo le rivendicazioni 26-27 per la preparazione di polisaccaridi modificati e di derivati semisintetici modificati dove tali modifiche sono costituite dalla formazione di ammidi per reazione con ammine, amminoacidi, peptidi e proteine.
29. Derivati ammidici secondo le rivendicazioni 26-28 ottenuti dalla reazione degli esteri attivi con ammine primarie, alifatiche, aralifatiche, alifatiche sostituite, aralifatiche sostituite, amminoacidi, peptidi e proteine.
30. Derivati ammidici secondo le rivendicazioni 26-28 ottenuti dalla reazione degli esteri attivi con amminoacidi, peptidi e proteine biologicamente attivi.
31. Un derivato ammidico scelto nel gruppo formato da:
 - N-etil ammido dell'acido ialuronico con il 10% dei gruppi carbossilici coinvolti nella formazione dell'ammido ed il rimanente 90% dei gruppi carbossilici salificato con sodio;



- 28 -

- N-benzil ammido dell'acido ialuronico con il 50% dei gruppi carbossilici coinvolti nella formazione dell'ammido ed il rimanente 50% dei gruppi carbossilici salificato con sodio;
 - derivato ammidico dell'acido ialuronico con l'arginina dove il 100% dei gruppi carbossilici risulta coinvolto nella formazione dell'ammido;
 - derivato peptidico di estere etilico di acido ialuronico p50 con un peptide inibitore della funzione fibronettinica avente sequenza H-Arg-Gly-Asp-OH con il 50% delle funzioni carbossiliche esterificate con etanolo, il 25% delle funzioni carbossiliche coinvolto nella formazione dell'ammido con il peptide ed il rimanente 25% delle funzioni carbossiliche salificate con sodio
 - derivato peptidico di estere benzilico di acido ialuronico p75 con un peptide inibitore della fibrinolisi avente sequenza H-Gly-Pro-Arg-OH con il 75% delle funzioni carbossiliche esterificate con alcol benzilico ed il 25% delle funzioni carbossiliche coinvolto nella formazione dell'ammido con il peptide.
32. Processo per la sintesi di ammidi secondo le rivendicazioni 26-30 di polisaccaridi carbossilici o di loro derivati semisintetici che consiste nel far reagire l'estere attivo del polisaccaride carbossilico o l'estere attivo di un suo derivato semisintetico con un'ammina, un amminoacido, un peptide o una proteina in un solvente aprotico



- 29 -

ad una temperatura compresa tra 0 e 60°C.

33. Impiego di polisaccaridi modificati secondo le rivendicazioni precedenti nel campo biomedico e farmaceutico.
34. Impiego di polisaccaridi modificati secondo la rivendicazione 33 per la preparazione di articoli sanitari e chirurgici quali microcapsule, microsfele, fili, pellicole, garze e spugne.
35. Impiego di polisaccaridi modificati secondo le rivendicazioni 33-34 nel settore della riparazione tissutale.
36. Impiego di polisaccaridi modificati secondo le rivendicazioni 33-35 nei sistemi di rilascio controllato di sostanze biologicamente e farmacologicamente attive, dove tali sostanze sono costituite da amminoacidi, peptidi e proteine biologicamente attivi.

Fidia Advanced Polysiloxane Srl
[Handwritten signature]

