



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

DOMANDA NUMERO	102007901538342
Data Deposito	05/07/2007
Data Pubblicazione	05/01/2009

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	K		

Titolo

DERIVATI DI ACIDO IALURONICO CONTENENTI GRUPPI IN GRADO DI RILASCIARE NO.

7983 M Descrizione del brevetto per invenzione industriale avente per titolo:

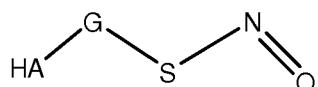
FM/mc **"DERIVATI DI ACIDO IALURONICO CONTENENTI GRUPPI IN  
GRADO DI RILASCIARE NO"**

a nome : **FIDIA FARMACEUTICI S.p.A.**

con sede in: Abano Terme (Padova)

\* \* \*

La presente invenzione riguarda derivati di acido ialuronico (Hyaluronic Acid, HA) funzionalizzati con molecole contenenti gruppi S-nitroso-tiolici di formula generale:



in cui HA indica l'acido ialuronico e G un adatto spaziatore, in particolare il frammento della molecola dell'N-acetilpenicillammina oppure la cisteina (Cys).

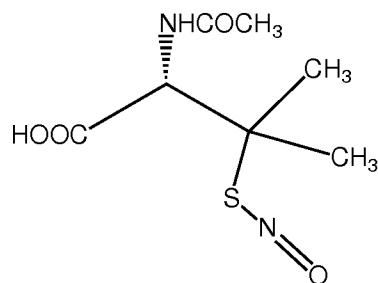
I derivati dell'invenzione sono in grado di rilasciare NO (NO-donors) e possono essere utilizzati vantaggiosamente per applicazioni dermatologiche e cosmetiche, in particolare per la correzione dei difetti cutanei e la biorivitalizzazione dei tessuti dopo somministrazione intradermica, sottocutanea, topica. I derivati dell'invenzione possono inoltre essere utilizzati per applicazioni cardiovascolari, per il rilascio controllato di farmaci e/o agenti antitumorali, antivirali, antimicrobici.

### **Stato della tecnica**

L'ossido di azoto (NO) agisce in numerosi distretti dell'organismo, essendo coinvolto in un'ampia gamma di attività biologiche che vanno dalla neurotrasmissione al rilasciamento della muscolatura liscia, dalla

vasodilatazione alla risposta agli immunogeni, e contribuisce in modo sostanziale al mantenimento dell'omeostasi, in virtù della sua azione di *scavenger* di radicali liberi. Tra i vari distretti in cui NO opera, particolarmente importante ai fini della presente invenzione è quello cutaneo, dove NO agisce a livello di fibroblasti, cheratinociti e della complessa serie di eventi definita come *wound healing* (Cals-Grierson, Nitric Oxide, 2004, 10, 179-193). L'uso di composti in grado di rilasciare, direttamente o indirettamente, ossidi di azoto è stato proposto di recente per svariate applicazioni sia in campo farmaceutico/medicale sia in campo cosmetico. Si vedano ad esempio WO 2006/097350, FR 2883170, WO 2006/095193, US 20040171589, EP 1442739, WO 2003/049593, EP 1001677, WO 2006/100154 e US 6251594.

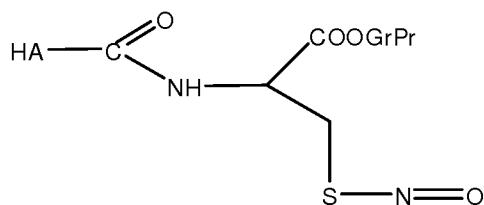
La S-nitroso-N-acetylpenicillammido (SNAP) di formula



è un noto donatore di NO disponibile in commercio utilizzato prevalentemente in studi biochimici e farmacologici (Zhang Y. et al., Free Radical Biology and Medicine 2005, volume 38, pp. 831-838 e Wang, P.G. et al., Chemical Reviews, 2002, 102, 1091 - 1134).

Un'altra molecola che ben si presta a derivatizzare HA rendendo il biopolimero capace di rilasciare ossido nitrico è la cisteina. Infatti tale amminoacido può essere legato ad HA attraverso un legame ammidico in cui HA partecipa attraverso il gruppo carbossilico dell'acido glucuronico e la

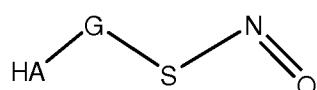
cisteina attraverso la funzione amminica primaria. La sintesi può essere compiuta in mezzo acquoso per mezzo di promotori di formazione di ammidi quali carbodiimmidi idrosolubili (ad esempio 1-Etil-3-(3-dimetilamminopropil)-carbodiimmide, EDC). Recenti lavori di letteratura (Kafedjiiski, K et. al., Int. J. Pharmaceut. 2007, doi:10.1016/J.pharm.2007.04.019), hanno messo in luce interessanti proprietà di mucoadesività per i derivati cross-linkati preparati a partire da coniugati HA-Cys, e per questo motivo gli Autori hanno proposto di utilizzarli come eccipienti multifunzionali per lo sviluppo di drug delivery systems. La presente invenzione intende invece utilizzare il coniugato HA-Cys nella forma nativa, ovvero non cross-linkata per successiva derivatizzazione a formare coniugati di formula generale:



in cui la sigla GrPr indica un generico gruppo protettore del carbossile, ad esempio un metil- oppure etil-estere.

### Descrizione dell'invenzione

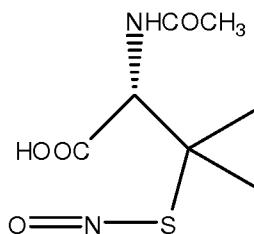
Si è ora trovato che derivati di acido ialuronico funzionalizzati con gruppi S-nitroso di formula



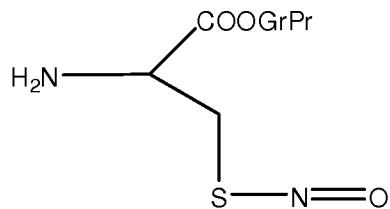
dove HA indica l'acido ialuronico e G è uno spaziatore tra un gruppo funzionale carbossi o ammino dell'acido ialuronico e un gruppo funzionale

rispettivamente ammino o carbossi di un residuo comprendente un gruppo tiolo, sono efficaci donatori di NO che possono trovare diversi impieghi in campo farmaceutico, cosmetico e medicale.

Esempi di gruppi G-S-N=O sono residui N-acetylpenicillammido di formula:



oppure residui S-nitroso cisteinici di formula:



(GrPr rappresenta un gruppo protettivo quale un gruppo C1-C4-alchile, in particolare metile o etile).

L'associazione tra HA ed una molecola in grado di liberare NO risulta vantaggiosa per tutte quelle applicazioni che richiedono l'attivazione di processi di riparazione cutanea e/o dermica, quali possono essere lesioni e difetti superficiali, invecchiamento e fotoinvecchiamento, biorivitalizzazione dei tessuti dermici. In queste situazioni gli effetti noti ed attribuibili a NO quali ad esempio:

- l'aumento di sintesi di collagene da parte dei cheratinociti;
- l'aumento della microcircolazione;
- la facilitazione della proliferazione di cheratinociti e fibroblasti;
- l'induzione di sintesi di TGF-b1 e di IL, con conseguente attivazione dei processi di riparazione cutanea;
- la stimolazione del rilascio di fattori chemiotattici (per esempio,

VEGF)

vengono sorprendentemente ottimizzati dall'associazione con acido ialuronico o con un suo derivato.

La presenza di acido ialuronico o di un suo derivato permette infatti di:

- sfruttare sinergicamente le proprietà cicatrizzanti, emollienti, umettanti, riparative, riempitive dell'acido ialuronico e/o dei suoi derivati;
- data la modulabilità delle caratteristiche reologiche sia di HA in quanto tale che dei suoi derivati, si possono ottenere forme farmaceutiche molto diverse tra loro e assolutamente adattabili al sito di applicazione.

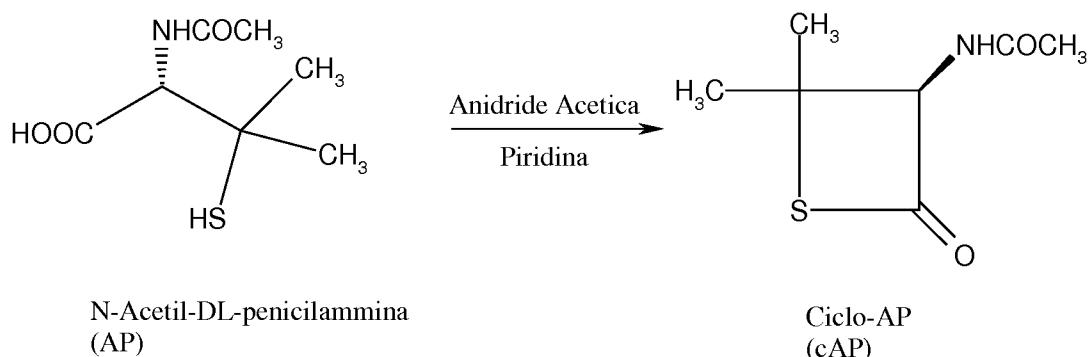
Si potrà disporre per esempio di gel iniettabili per la somministrazione intradermica e/o sottocutanea in caso di rughe, cicatrici e difetti cutanei; idrogel, creme, dressings o films per applicazione topica ad effetto cicatrizzante, biorivitalizzante e rigenerante, gel con gradi di viscosità controllata per il drug delivery, da somministrare per via sistemica o loco-regionale (ad esempio, intraarticolare) etc.

- soprattutto, mantenere il prodotto nel sito di applicazione a lungo, con conseguente rilascio progressivo di NO. La coniugazione tra HA e/o suoi derivati e la fonte di NO è infatti un legame di tipo chimico, e ciò assicura la stabilità del prodotto e garantisce che il rilascio di NO avvenga in modo costante e continuo.

La funzionalizzazione con gruppi S-nitroso-N-acetil-penicillamino può interessare gruppi amminici derivanti dalla deacetilazione dei residui di N-acetil-glucosamina dell'acido ialuronico oppure gruppi amminici introdotti esterificando i gruppi carbossilici delle unità di acido glucuronico

con residui amminoalchilici.

Nel primo caso, i derivati dell'invenzione possono essere ottenuti a partire da N-acetilpenicillammido o da suoi derivati attivati, preferibilmente dalla corrispondente anidride ciclica o 3-acetammido-4,4-dimetiltioetan-2-one (cAP), ottenuta a partire da N-acetil-DL-penicilammina (AP) in presenza di piridina e anidride acetica secondo la seguente reazione:



Tale reazione è favorita dall'ambiente anidro impiegando un eccesso di anidride acetica, preferibilmente tra 4 e 5 volte le moli di AP. La reazione avviene a bassa temperatura, compresa tra -20° e 5°C, preferibilmente 0°C in un intervallo di tempo compreso tra 10 e 120', preferibilmente 30 min. Il composto cAP (3-acetammido-4,4-dimetiltioetan-2-one) è separato dalla miscela di reazione per aggiunta di un solvente organico clorurato, preferibilmente diclorometano o cloroformio.

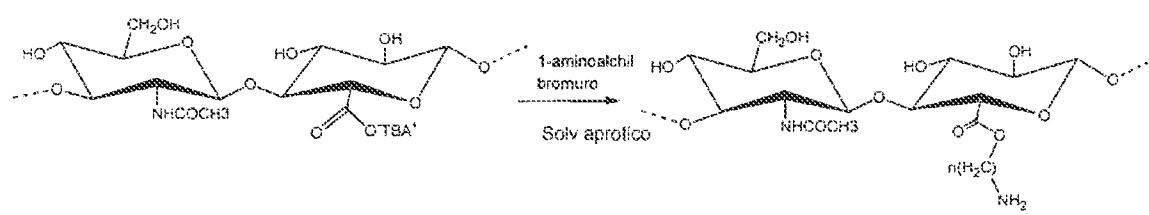
La cAP così ottenuta può quindi essere fatta reagire con acido ialuronico parzialmente deacetilato oppure con amminoalchilesteri di acido ialuronico, ottenibili da sali alcalini, preferibilmente sali sodici, di acido ialuronico che, dopo trasformazione in un sale di tetralchilammonio, preferibilmente tetrabutil ammonio (TBA) attraverso scambio ionico e successiva eventuale liofilizzazione, sono fatti reagire con composti di formula X-A-NH<sub>2</sub> in cui X è un atomo di alogeno, preferibilmente Bromo, e A

un residuo spaziatore alifatico o arilalifatico avente da 2 a 16 atomi di Carbonio, preferibilmente un gruppo  $-(CH_2)_n-$  dove n è un intero da 2 a 16, preferibilmente da 2 a 7.

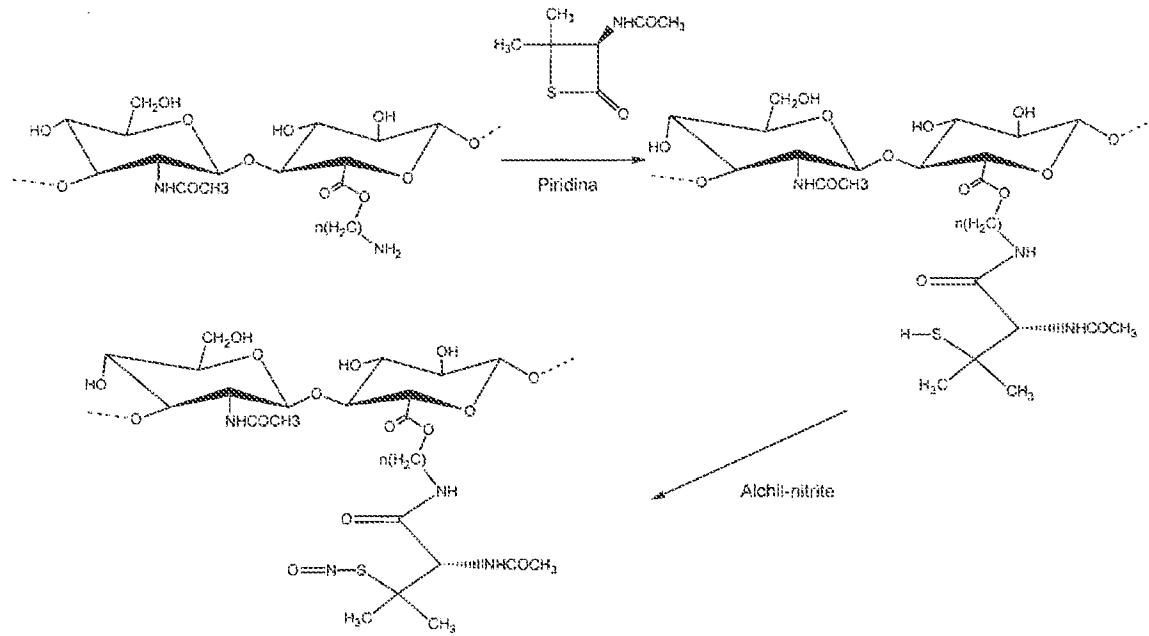
Esempi specifici di composti di formula X- $(CH_2)_n-NH_2$  sono 2-bromo-1-etilammina, 3-bromo-1-propilammina, 7-bromo-1-heptilammina. Tali diammine sono utilizzate in forma di sali, ad esempio alogenoidrati.

I derivati dell'invenzione sono infine ottenuti per successivo trattamento con un nitrito alchilico.

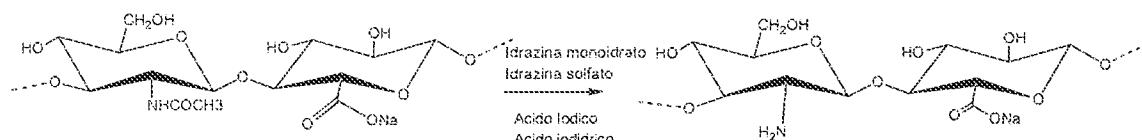
I processi sopra descritti sono illustrati nei seguenti schemi:



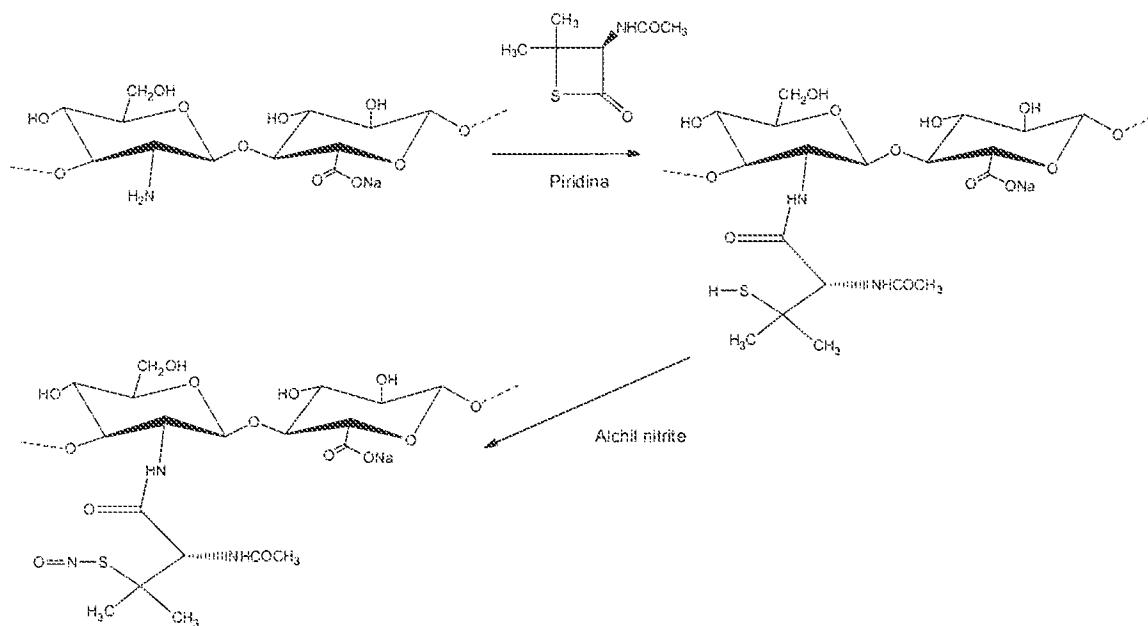
**Schema 1: Preparazione dell'amminoalchilestere di HA**



**Schema 2: Preparazione dei derivati dell'invenzione dagli amminoalchilesteri di HA**



Schema 3: Deacetilazione di HA



Schema 4: preparazione dei derivati dell'invenzione da HA parzialmente deacettillato

Più particolarmente, per la preparazione di aminoalchilesteri, il sale HA-TBA è solubilizzato in un solvente aprotico quale N-metil-pirrolidone (NMP), N,N-dimetilformammide (DMF) o DMSO, in concentrazione variabile tra 3 a 25 mg/ml in funzione del peso molecolare di HA. L'alogeno-alchilammina è aggiunta alla miscela di reazione in quantità pressoché stecchiometrica in accordo con il grado di sostituzione richiesto.

La reazione procede a temperatura compresa tra 25 e 40°C per un tempo compreso fra 24 e 96 ore. L'estere viene infine separato dalla miscela di reazione per precipitazione alcolica, preferibilmente con etanolo, previo scambio ionico tra il sale di tetralchilammonio e sodio.

Dopo essiccamiento il prodotto è disciolto in DMF insieme a cAP in

rapporto stechiometrico 1:1 rispetto ai gruppi  $-\text{NH}_2$  del coniugato estereo di HA e la reazione procede per almeno 30 min, trascorsi i quali si allontana il solvente. Ripreso sempre in DMF, si aggiunge un eccesso di alchil-nitrito, preferibilmente isopentil nitrito. La reazione procede a bassa temperatura, preferibilmente  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Il prodotto si isola per precipitazione alcolica, preferibilmente con etanolo 95°, lavando con etanolo assoluto il prodotto. Si ottiene in questo modo il coniugato estereo HA-SNAP.

Per la preparazione dei derivati da HA parzialmente de-N-acetilato, si solubilizza HA in idrazina o idrazina idrato aventi una purezza non inferiore al 95%, in concentrazione compresa tra 1 a 50 mg/ml, preferibilmente tra 5 e 25 mg/ml. Alla soluzione così ottenuta viene aggiunta una quantità di idrazina solfato compresa tra 0,1 e 3% p/v, preferibilmente 1%.

La reazione è condotta in un intervallo di temperatura compreso tra 40 e  $90^{\circ}\text{C}$ , preferibilmente  $60^{\circ}\text{C}$ , sotto agitazione costante. Il tempo di reazione dipende dalla percentuale di de-N-acetilazione che si intende ottenere ed è comunque compreso tra qualche ora fino a 50 ore. La reazione è quindi bloccata mediante la precipitazione con un solvente polare, preferibilmente etanolo. Il precipitato, dopo essere stato parzialmente essiccato sotto vuoto, viene trattato con acido iodico avente una concentrazione molare compresa tra 0,1 e 1 M, preferibilmente 0,5 M, e successivamente con acido iodidrico al 57% (p/v). Il pH della soluzione è mantenuto tra 5-7 mediante aggiunta di una soluzione 10% (p/v) di sodio acetato.

La fase acquosa contenente il polisaccaride modificato è sottoposta ad estrazione attraverso il ripetuto trattamento con etere etilico, fino a completa

decolorazione della fase acquosa (inizialmente di colore giallo-bruno intenso).

Infine si precipita con solvente polare, preferibilmente etanolo. Il prodotto recuperato come precipitato di colore bianco, viene essiccato sotto vuoto per almeno 48-72 ore a 30°C.

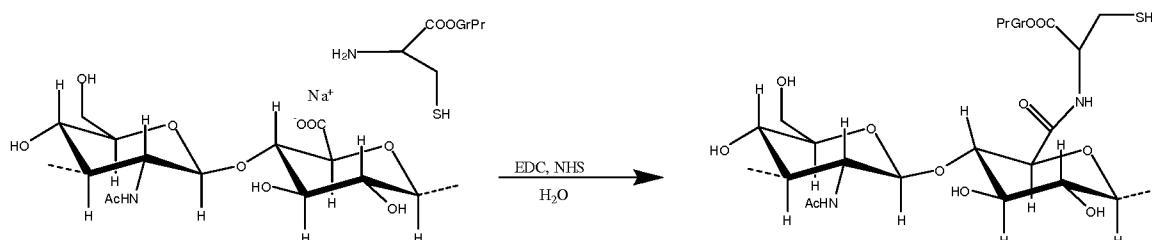
La derivatizzazione di HA con residui S-Nitroso cisteinici comprende 2 steps sintetici: reazione fra HA e cisterna (Cys) e successiva trasformazione nel derivato S-Nitroso.

La reazione fra il biopolimero e l'amminoacido è convenientemente condotta a partire da cisteina o derivati, quali ad esempio suoi esteri carbossilici (in cui la Cys partecipa al legame estereo come acido) oppure tioesteri (in cui la Cys partecipa al legame tioestereo come tiolo). Cys o i suoi derivati sono fatti reagire con acido ialuronico oppure i suoi sali alcalini, preferibilmente il sale sodico, in mezzo acquoso. Alternativamente, la reazione può essere condotta in solvente polare aprotico quale N-metil-pirrolidone (NMP), N,N-dimetilformammide (DMF) o dimetilsolfossido (DMSO) utilizzando un sale di tetralchilammonio di HA. Tali sali sono ottenibili da sali alcalini, preferibilmente sodici, di HA attraverso scambio ionico ed eventuale liofilizzazione.

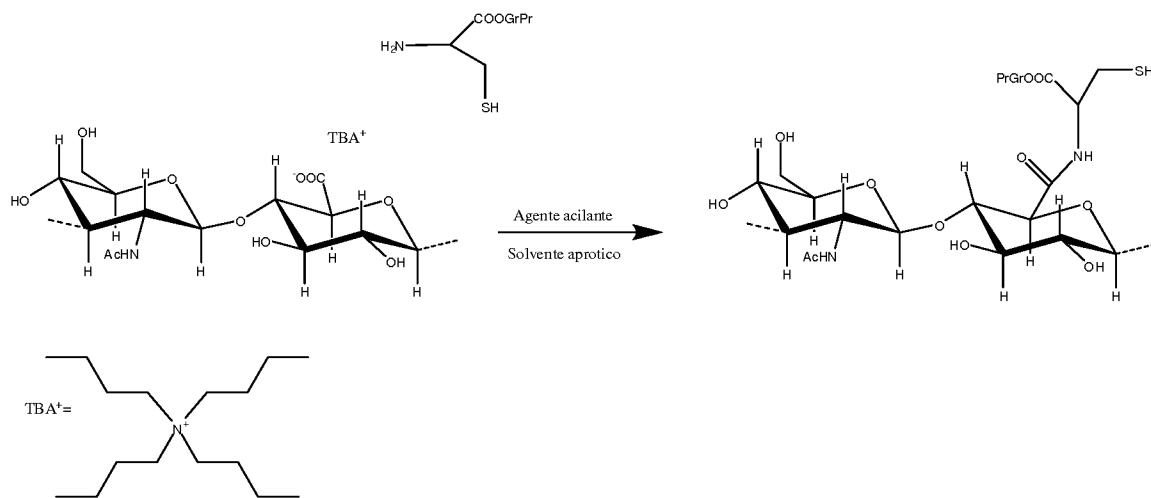
La formazione del legame ammidico fra HA e Cys è promossa dall'aggiunta alla miscela di reazione di un agente attivante, quale una carbodiimmide, oppure carbonil-di-imidazolo, o più in generale utilizzando un qualsiasi agente attivante utilizzato classicamente nella sintesi peptidica. Se la reazione è condotta in acqua, Cys e HA o i suoi sali alcalini sono fatti reagire attraverso 1-Etil-3-(3-dimetilamminopropil)-carbodiimmide (EDC) in presenza di N-idrossisuccinimmide (NHS). In assenza di NHS la reazione

decorrerebbe attraverso la formazione di O-acilisourea, un intermedio instabile con la tendenza a riarrangiare ad N-acilurea, composto non più reattivo nei confronti delle ammine. È noto che l'aggiunta di NHS permette la formazione di un intermedio sotto forma di estere attivato non riarrangiabile, rendendo possibile il coupling dell'ammina primaria all'HA (J Biomed Mater Res. 1999 Nov;47(2):152-169 PMID: 10449626). La reazione procede ad un pH inferiore a 8, ed è favorita da un pH leggermente acido. La preparazione è condotta ad una temperatura compresa fra 0 e 45°C e giunge a completezza in un tempo inferiore a 24 ore, trascorse le quali il coniugato viene isolato per precipitazione con un solvente costituito da miscela idroalcolica, alcool-acetone, oppure alcool. Il derivato può essere purificato attraverso lavaggi con miscela idroalcolica direttamente sul solido, oppure per dialisi.

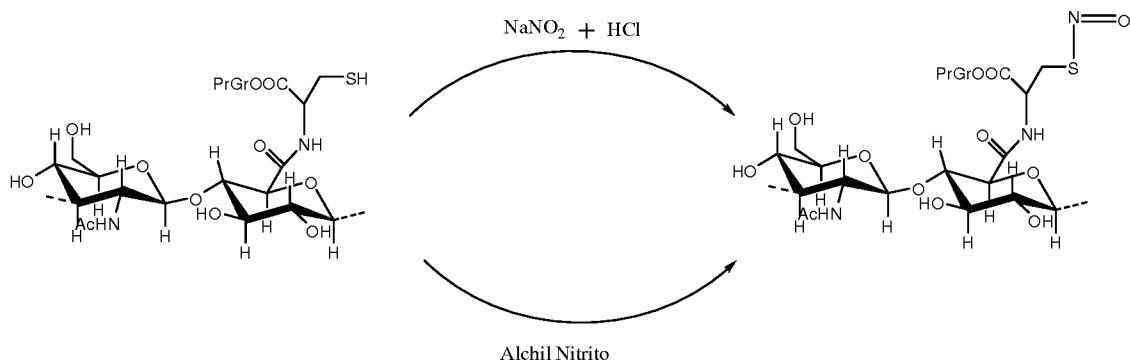
I processi sopra descritti sono illustrati nei seguenti schemi:



**Schema 5: Preparazione del coniugato HA-Cisteina in acqua**



**Schema 6: Preparazione del coniugato HA-Cisteina in solvente polare aprotico**



**Schema 7: Preparazione dei derivati dell'invenzione a partire dal coniugato HA-Cisteina**

Più in particolare, la sintesi del coniugato HA-Cys (schema 5) è condotta solubilizzando HA (o i suoi sali alcalini) in acqua realizzando una concentrazione compresa tra 1 e 50 mg/ml, preferibilmente tra 3 e 25 mg/ml; alla soluzione così ottenuta si addiziona una quantità di HCl/NaOH in concentrazione compresa fra 0,1 e 1M tale da portare il pH all'interno dell'intervallo 5,0-6,0, preferibilmente intorno a 5,5. A questo punto si addizionano EDC, NHS e la Cys, preferibilmente sotto forma di estere etilico. Mentre l'amminoacido protetto è aggiunto in quantità stocchiometrica rispetto

al grado di sostituzione che si vuole ottenere, EDC ed NHS sono aggiunti in leggero eccesso stochiometrico rispetto alla cisteina. Prima di incubare la reazione si corregge ulteriormente il pH, portandolo ad un valore compreso fra 5 e 7, preferibilmente intorno a 6. La sintesi è condotta ad una temperatura compresa fra 0 e 45°C, per un tempo compreso fra 4 e 24 ore, al termine delle quali si addiziona alla miscela di reazione una quantità di precipitante compresa fra 3 e 10 volte il volume della miscela di reazione. Il solvente precipitante è costituito da miscele di solventi polari quali alcoli o acetone. Il prodotto è isolato per filtrazione oppure decantazione, quindi lavato fino ad abbattimento del contenuto di ioni in soluzione, come verificato dalla conducibilità specifica delle acque di lavaggio, che deve arrivare ad un valore inferiore a 30 µS/cm. L'ultimo lavaggio si effettua con etanolo assoluto.

Come alternativa, la purificazione può avvenire per dialisi contro soluzione di NaCl di concentrazione compresa tra 0,5 e 5% p/v, preferibilmente 1%, o alternativamente contro acqua demineralizzata. Il prodotto è quindi isolato come solido per liofilizzazione.

Se la reazione al posto che in acqua è condotta in solvente polare aprotico (schema 6), quale promotore di acilazione del gruppo amminico primario della cisteina è possibile utilizzare carbodiimmidi quali N,N'-dicloesilcarbodiimmide, N,N'-di-isopropilcarbodiimmide, N,N'-ditoluilcarbodiimmide, oppure carbonil-di-imidazolo in presenza di acido metan-solforico.

In questo caso l'acido ialuronico di partenza sotto forma di sale di tetraalchil ammonio, preferibilmente tetrabutil ammonio, è sciolto nel solvente aprotico (NMP oppure DMF oppure DMSO) in concentrazione

variabile fra 1 e 25 mg/ml in funzione del peso molecolare di HA. La Cys, preferibilmente sotto forma di estere etilico, è addizionata alla miscela di reazione in quantità stochiometrica oppure in leggero eccesso rispetto al grado di sostituzione desiderato, insieme al rispettivo agente attivante. La reazione procede ad una temperatura compresa tra 0 e 45°C, per un tempo inferiore alle 24 ore. Il prodotto a questo punto è sotto forma di estere parziale dell'acido ialuronico, i restanti gruppi carbossilici essendo accompagnati da controioni tetrabutilammonio. Si effettua scambio con ioni sodio mediante aggiunta di un volume pari al 5-10% del volume della miscela di reazione di soluzione satura di sodio cloruro oppure sodio bromuro, lasciando sotto agitazione per un tempo non inferiore a 30 minuti. Il prodotto precipita addizionando da 3 a 10 volumi di miscele di solventi polari quali alcoli o acetone, dopo di che è isolato per filtrazione oppure decantazione, quindi lavato fino ad abbattimento del contenuto di ioni in soluzione, come verificato dalla conducibilità specifica delle acque di lavaggio, che deve arrivare ad un valore non superiore a 30 µS/cm. L'ultimo lavaggio si effettua con etanolo assoluto.

Il derivato HA-Cys si conserva al riparo da aria ed umidità, preferibilmente in frigorifero ad una temperatura compresa fra 2 e 8°C.

Il coniugato HA-Cys viene poi trasformato nel derivato S-Nitroso (Schema 7). Tale trasformazione si può realizzare per reazione con HNO<sub>2</sub>, generato *in situ* per acidificazione di NaNO<sub>2</sub> con HCl oppure per reazione con un nitrito alchilico.

La sintesi è condotta ad una temperatura compresa fra -5°C e 25°C in solvente acquoso, oppure in miscele acqua/solvente etereo, quale tetraidrofurano (THF) oppure diossano, e arriva a completamento in 24-48 ore.

Il prodotto si isola per precipitazione addizionando miscele etanolo/acqua (preferibilmente tanolo/acqua 96/4) oppure metanolo-acetone, preferibilmente nel rapporto 2/1 oppure 1/1.

L'HA utilizzato nella presente invenzione può derivare da qualsiasi fonte; può essere prodotto ad esempio per estrazione da creste di gallo (EP 138572 B1), per via fermentativa (EP 716688 B1), o per via biotecnologica, ed avere un peso molecolare compreso tra i 400 e  $3 \times 10^6$  Da, in particolare tra  $1 \times 10^5$  Da e  $1 \times 10^6$  Da, ancor più in particolare tra 200.000 e 750.000 Da.

La reazione di derivatizzazione dell'invenzione può essere applicata sia al polisaccaride tal quale, che allo stesso preventivamente modificato. Si otterranno quindi reti molecolari a partire da acido ialuronico variamente modificato secondo metodi noti ed in particolare:

**HA** salificato con basi organiche e/o inorganiche (EP 138572 B1);

**HYAFF<sup>®</sup>**: esteri dell'HA con alcoli della serie alifatica, arilifatica, cicloalifatica, aromatica, ciclica ed eterociclica, con una percentuale di esterificazione che può variare a seconda del tipo e della lunghezza dell'alcool usato, preferibilmente tra il 50 e il 100%, mentre la restante percentuale di HA non esterificata può essere salificata con basi organiche e/o inorganiche (EP 216453 B1);

**HYADD<sup>®</sup>**: ammidi dell'HA con ammine della serie alifatica, aralifatica, cicloalifatica, aromatica, ciclica ed eterociclica, con una percentuale di amidazione da 0,1 al 50%, mentre la restante percentuale di HA non sottoposta ad amidazione può essere salificata con basi organiche e/o inorganiche (EP 1095064 B1);

**derivati O-solfatati** dell'HA fino al 4° grado di solfatazione (EP 702699 B1);

**ACP®:** esteri interni dell'HA con una percentuale di esterificazione non superiore al 20%, preferibilmente tra lo 0,05 e il 10% di esterificazione, mentre la restante percentuale di HA non esterificata può essere salificata con basi organiche e/o inorganiche (EP 341745 B1);

**deacetilati dell'HA:** derivano dalla deacetilazione dei residui N-acetil-glucosamina presenti in HA, con una percentuale di deacetilazione preferibilmente tra lo 0,1 e il 30%, mentre tutti i gruppi carbossilici dell'HA possono essere salificati con basi organiche e/o inorganiche (EP 1313772 B1);

**HYOXX™:** derivati percarbossilati dell'HA ottenuti dall'ossidazione dell'ossidrile primario della frazione N-acetyl-glucosamina con grado di percarbossilazione tra lo 0,1 e il 100% e, preferibilmente, tra il 25 e il 75%. Tutti i gruppi carbossilici dell'HA possono essere salificati con basi organiche e/o inorganiche (EP 1339753 A).

Come già detto, i trovati dell'invenzione ottenuti dopo derivatizzazione dell'acido ialuronico conservano le proprietà biologiche del polisaccaride di partenza ma sono caratterizzati da proprietà meccaniche e reologiche differenti. A seconda del tipo di applicazione prescelta per il prodotto finale, sarà possibile dunque selezionare il derivato più adatto.

L'invenzione è descritta in maggior dettaglio nei seguenti Esempi.

**Esempio 1: Preparazione del derivato HA-estere propil amminico (200 kDa)**

5,00 g di acido ialuronico di origine estrattiva sale sodico frazione hyalastine (Mw 200 kDa) sono disciolti in 250 ml di acqua e la soluzione

risultante è fatta percolare attraverso una colonna di vetro preriempita con 100 cm<sup>3</sup> di resina Dowex in forma di tetrabutilammonio. La soluzione di HA, sale di TBA eluita viene raccolta e liofilizzata. Si ottengono 7,50 g di prodotto, che vengono disiolti in 400 ml di N-metil-pirrolidone (NMP).

In seguito alla completa solubilizzazione del sale di HA, si aggiungono 0,53 g di 3-bromopropanoammina idrobromuro e si lascia reagire a 35°C per 48 h sotto blanda agitazione. La reazione è infine arrestata aggiungendo 0,1 volumi di una soluzione acquosa satura di NaCl e, a distanza di 30 minuti, la soluzione è addizionata a 3 volumi di etanolo assoluto per separare l'estere di HA dalla miscela di reazione. Il precipitato è lavato sempre in etanolo ed infine essiccato in alto vuoto a 40°C. Si ottengono 4,49 g di derivato estereo HA-COO(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>.NH<sub>2</sub>. Il grado di sostituzione è di 25% moli/moli.

**Esempio 2: Preparazione del derivato HA-estere etil amminico (750 kDa)**

3,00 g di acido ialuronico di origine estrattiva sale sodico frazione hyalactine (Mw ca. 750 kDa) sono disolti in 600 ml di acqua e la soluzione risultante è fatta percolare attraverso una colonna di vetro preriempita con 100 cm<sup>3</sup> di resina Dowex in forma di tetrabutilammonio. La soluzione di HA, sale di TBA eluita viene raccolta e liofilizzata. Si ottengono 4,20 g di prodotto, che vengono disolti in 400 ml di n-metil-pirrolidone (NMP).

Dopo completa solubilizzazione del sale di HA, si aggiungono 0,90 g di 2-bromo etilammina idrobromuro e si lascia reagire a 35°C per 48 h sotto blanda agitazione. La reazione è infine arrestata aggiungendo 0,1 volumi di una soluzione acquosa satura di NaCl e, a distanza di 30', la soluzione è addizionata a 2.5 volumi di etanolo assoluto per separare l'estere di HA dalla

miscela di reazione. Il precipitato è lavato sempre in etanolo ed infine essiccato in alto vuoto a 40°C. Si ottengono 2,25 g di derivato estereo HA-COO(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>.NH<sub>2</sub>. Il grado di sostituzione è di 50% moli/moli.

**Esempio 3: Preparazione del derivato HA-estere eptil amminico (15 kDa)**

6,00 g di acido ialuronico di origine fermentativa sale sodico frazione LMW (Low Molecular Weight) a 15 kDa sono disiolti in 300 ml di acqua e la soluzione risultante è fatta percolare attraverso una colonna di vetro preriempita con 120 cm<sup>3</sup> di resina Dowex in forma di tetrabutilammonio. La soluzione di HA, sale di TBA eluita viene raccolta e liofilizzata. Si ottengono 8,43 g di prodotto, che viene disiolto in 420 ml di N,N dimetil formammide (DMF).

In seguito alla completa solubilizzazione del sale di HA LMW, si aggiungono 0,66 g di 7-bromo eptilammina idrobromuro e si lascia reagire a 35°C per 72 h sotto blanda agitazione. La reazione è infine arrestata aggiungendo 0,1 volumi di una soluzione acquosa satura di NaCl e, a distanza di 30', la soluzione è addizionata a 2.5 volumi di etanolo assoluto per separare l'estere di HA dalla miscela di reazione. Il precipitato è lavato sempre in etanolo ed infine essiccato in alto vuoto a 40°C. Si ottengono 4,70 g di derivato estero HA-COO(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>.NH<sub>2</sub>. Il grado di sostituzione è di 10% moli/moli.

**Esempio 4: Preparazione del derivato HA-estere propil-SNAPP25**

4,00 g del composto N-acetil-DL-penicillammina (AP) sono disiolti in 8 ml di piridina in presenza di 8 ml di anidride acetica. La reazione procede per 30' a 0°C e overnight a temperatura ambiente sempre in condizioni di

blanda agitazione. La reazione è bloccata attraverso evaporazione e successiva ripresa del residuo con almeno 100 ml di diclorometano. La soluzione organica è quindi estratta per almeno 3 volte con 50 ml di una soluzione acquosa acida (HCl ca. 1 M), filtrata ed infine evaporata fino a portare a secchezza. Il residuo è lavato con 50 ml di etere etilico. Si ottengono 1,80 g di derivato ciclico cAP (3-acetammido-4,4-dimetiltioetan-2-one).

4,00 g del derivato ottenuto dall'esempio 1 e 1,70 g di cAP sono disolti in 200 ml di DMF e l'agitazione viene mantenuta per 30' a temperatura ambiente. Dopo allontanamento del solvente, il residuo è ripreso con il minimo volume di DMF e trattato con isopentil nitrito a -20°C per 2 ore. Dopo aver alzato la temperatura, portandola tra 15 e 25°C, si precipita in 3 volumi di etanolo lavando il prodotto con etanolo assoluto. Infine si essicca in alto vuoto. Si ottengono 4,11 g del derivato HA-estere propil-SNAPP25.

#### **Esempio 5: Preparazione del derivato HA-estere etil-SNAPP50**

3,00 g del composto N-acetyl-DL-penicillammina (AP) sono disolti in 6 ml di piridina in presenza di 6 ml di anidride acetica. La reazione procede per 30' a 0°C e overnight a temperatura ambiente sempre in condizioni di blanda agitazione. La reazione è bloccata attraverso evaporazione e successiva ripresa del residuo con almeno 80 ml di diclorometano. La soluzione organica è quindi estratta per almeno 3 volte con 50 ml di una soluzione acquosa acida (HCl ca. 1 M), filtrata ed infine evaporata fino a portare a secchezza. Il residuo è lavato con 50 ml di etere etilico. Si ottengono 1,21 g di derivato ciclico cAP (3-acetammido-4,4-dimetiltioetan-2-one).

2,00 g del derivato ottenuto dall'esempio 2 e 1,10 g di cAP sono disolti in 100 ml di DMF e l'agitazione viene mantenuta per 30' a

temperatura ambiente. Dopo allontanamento del solvente, il residuo è ripreso nel minimo volume di DMF e trattato con isopentil nitrito a -20°C per 2 h. Dopo aver alzato la temperatura, portandola tra 15 e 25°C si precipita in 3 volumi di etanolo lavando il prodotto con etanolo assoluto. Infine si essicca in alto vuoto. Si ottengono 2,27 g del derivato HA-estere etil-SNAPP50.

**Esempio 6: Preparazione del derivato HA-estere eptil-SNAPP10**

2,00 g del composto N-acetil-DL-penicillammina (AP) sono disciolti in 4 ml di piridina in presenza di 4 ml di anidride acetica. La reazione procede per 30' a 0°C e overnight a temperatura ambiente sempre in condizioni di blanda agitazione. La reazione è bloccata attraverso evaporazione e successiva ripresa del residuo con almeno 60 ml di diclorometano. La soluzione organica è quindi estratta per almeno 3 volte con 50 ml di una soluzione acquosa acida (HCl ca. 1 M), filtrata ed infine evaporata fino a portare a secchezza. Il residuo è lavato con 50 ml di etere etilico. Si ottengono 0,90 g di derivato ciclico cAP (3-acetammido-4,4-dimetiltioetan-2-one).

4,00 g del derivato ottenuto dall'esempio 3 e 0,70 g di cAP sono disciolti in 200 ml di DMF e l'agitazione viene mantenuta per 30' a temperatura ambiente. Dopo allontanamento del solvente, il residuo è ripreso con nel minimo volume di DMF e trattato con isopentil nitrito a -20°C per 2 h. Dopo aver alzato la temperatura tra 15 e 25°C si precipita in 3 volumi di etanolo lavando il prodotto con etanolo assoluto. Infine si essicca in alto vuoto. Si ottengono 3,25 g del derivato HA-estere eptil-SNAPP10.

**Esempio 7: Preparazione del derivato HA-De-N acetilato al 23%**

1,00 g di HA di origine fermentativa, con peso molecolare 210 kDa, sono solubilizzati in 100 ml di idrazina monoidrato insieme a 1,00 g di

idrazina solfato.

La soluzione è mantenuta in agitazione per 48 h a 60°C, trascorse le quali la reazione è bloccata dall'aggiunta di 150 ml di etanolo. Il precipitato in forma di gel è lavato ed essiccato a temperatura ambiente per una notte.

L'intermedio viene quindi ridisciolto in 100 ml di acqua distillata e 20 ml di soluzione di sodio acetato al 10% p/v e, quindi, vengono aggiunti 30 ml di soluzione 0,5 M di acido iodico. Dopo 30 minuti, si addizionano 5 ml di acido iodidrico al 57%. Nel corso di questa ultima operazione la temperatura viene mantenuta a 0°C mediante bagno in ghiaccio.

La soluzione acquosa, fortemente colorata di bruno, è trattata per estrazione liquido-liquido almeno cinque volte con 50 ml di etere etilico. Infine, dopo aver portato il pH della soluzione decolorata contenente il polisaccaride modificato tra 6,5 e 7 con NaOH 1 N, si precipita con 200 ml di etanolo. Il precipitato, di colore bianco, dopo lavaggio con etanolo è essiccato sotto vuoto per almeno 48 ore. Si ottengono 0,94 g di HA-De-Acetilato e il grado di de-acetilazione risulta essere del 23%.

### **Esempio 8: Preparazione del derivato HA-N-SNApp23**

2,00 g del composto N-acetyl-DL-penicillammina (AP) sono disciolti in 4 ml di piridina in presenza di 4 ml di anidride acetica. La reazione procede per 30' a 0°C e overnight a temperatura ambiente sempre in condizioni di blanda agitazione. La reazione è bloccata attraverso evaporazione e successiva ripresa del residuo con almeno 60 ml di dclorometano. La soluzione organica è quindi estratta per almeno 3 volte con 50 ml di una soluzione acquosa acida (HCl ca. 1 M), filtrata ed infine evaporata fino a portare a secchezza. Il residuo è lavato con 50 ml di etere etilico. Si ottengono 0,92 g di derivato

ciclico cAP (3-acetamido-4,4-dimetiletan-2-one).

0,80 g del derivato ottenuto dall'esempio 7 e 0,70 g di cAP sono disciolti in 100 ml di DMF e l'agitazione viene mantenuta per 30' a temperatura ambiente. Dopo allontanamento del solvente, il residuo è ripreso nel minimo volume di DMF e trattato con isopentil nitrito a -20°C per 2 h. Dopo aver alzato la temperatura, portandola tra 15 e 25°C si precipita in 3 volumi di etanolo lavando il prodotto con etanolo assoluto. Infine si essicca in alto vuoto. Si ottengono 1,04 g del derivato HA-N-SNAPP23.

#### **Esempio 9: Preparazione del derivato HA-Cys p25 (200kDa)**

5,00 g di acido ialuronico di origine fermentativa sale sodico frazione hyalastine (Mw 200 kDa) sono disciolti in 300 ml di acqua. Alla soluzione si addiziona una quantità di HCl/NaOH 1M tale da portare il pH a 5,5. Si aggiungono 0,60 g di cisteina-etil estere idrocloruro, 0,61 g di EDC e 0,36 g di NHS, dissolti i quali si porta il pH della miscela di reazione intorno a 6. Si lascia reagire a temperatura ambiente (24°C) per 24 ore, avendo cura di controllare periodicamente il pH, ed eventualmente correggendo con HCl/NaOH 0,1 M di modo da mantenere il valore intorno a 6 (la reazione decorre con diminuzione di pH). Al termine della reazione si porta il pH intorno a 7, e si precipita con 4 volumi di etanolo 96%.

Il prodotto è isolato per filtrazione, quindi lavato con miscele etanolo/acqua 8/2, poi 9/1, fino ad abbattimento del contenuto di ioni in soluzione, come verificato dalla conducibilità specifica delle acque di lavaggio, che deve arrivare ad un valore inferiore a 30 $\mu$ S/cm. Dopo un ultimo lavaggio con etanolo assoluto si secca sotto vuoto a 40°C fino a peso costante. Il prodotto si presenta come solido bianco igroscopico, del peso di 4,44 g. Si

conserva in frigo sotto atmosfera d'azoto. Il grado di sostituzione risulta 24% moli/moli.

**Esempio 10: Preparazione del derivato HA-Cys p50 (750kDa)**

3,00 g di acido ialuronico di origine estrattiva sale sodico frazione hyalactine (Mw ca. 750 kDa) sono disciolti in 600 ml di acqua e la soluzione risultante è fatta percolare attraverso una colonna di vetro preriempita con 100 cm<sup>3</sup> di resina Dowex in forma di tetrabutilammonio. La soluzione di HA, sale di TBA eluita viene raccolta e liofilizzata. Si ottengono 4,12 g di prodotto, che vengono disciolti in 450 ml di DMSO. Si aggiungono 0,60 g di cisteina-etil estere idrocloruro e 0,70 g di N,N'-di-cicloesilcarbodiimmide (DCC). Si lascia reagire a temperatura ambiente (24°C) per 24 ore, e si aggiungono lentamente 50 ml di soluzione satura di NaCl (330 g/l). Si precipita il prodotto aggiungendo lentamente 2 l di etanolo 96°. Dopo lavaggio con miscela etanolo acqua 8/2 fino a conducibilità specifica inferiore a 30 µS/cm si lava con etanolo assoluto e si secca sotto vuoto a 40°C fino a peso costante. Il prodotto si presenta come solido bianco igroscopico, del peso di 3,09 g. Si conserva in frigo sotto atmosfera d'azoto. Il grado di sostituzione risulta del 47% in moli.

**Esempio 11: Preparazione del derivato HA-Cys p50 LMW**

5,00 g di acido ialuronico di origine fermentativa sale sodico a basso peso molecolare (Mw 15 kDa) sono disciolti in 250 ml di acqua. Alla soluzione si addiziona una quantità di HCl/NaOH 1M tale da portare il pH a 5,5. Si aggiungono 1,20 g di cisteina-etil estere idrocloruro, 1,22 g di EDC e 0,72 g di NHS, dissolti i quali si porta il pH della miscela di reazione intorno a 6. Si lascia reagire a temperatura ambiente (24°C) per 24 ore, avendo cura di

controllare periodicamente il pH, ed eventualmente correggendo con HCl/NaOH 0,1 M di modo da mantenere il valore intorno a 6 (la reazione decorre con diminuzione di pH). Al termine della reazione si porta il pH intorno a 7, e si precipita con 3 volumi di miscela metanolo/acetone 1/1. Il prodotto è isolato per filtrazione, quindi lavato con etanolo 96%, fino ad abbattimento del contenuto di ioni in soluzione, come verificato dalla conducibilità specifica delle acque di lavaggio, che deve arrivare ad un valore inferiore a 30  $\mu$  S/cm. Dopo un ultimo lavaggio con etanolo assoluto si secca sotto vuoto a 40°C fino a peso costante. Il prodotto si presenta come solido bianco igroscopico, del peso di 4,32 g. Si conserva in frigo sotto atmosfera d'azoto. Il grado di sostituzione risulta 52% moli/moli.

**Esempio 12: Preparazione del derivato HA-Cys-S-nitrossido p50**

**LMW**

Si solubilizzano 4,00 g del prodotto ottenuto come da esempio 11 in 250 ml di acqua. Si addizionano 0,50 g di nitrito di sodio NaNO<sub>2</sub>, si porta la miscela di reazione alla temperatura di 5°C e si aggiungono lentamente 7,2 ml di HCl 1N. Dopo 2 ore si lascia riscaldare a temperatura ambiente. Si isola il prodotto per precipitazione con etanolo 96%, si lava con lo stesso solvente, e si secca a 40°C sotto vuoto. Si ottengono 3,87 g di prodotto da conservare in frigo a 2-6°C sotto atmosfera d'azoto.

**Esempio 13: Preparazione del derivato HA-Cys-S-nitrossido p50  
(750kDa)**

Si solubilizzano 3,00 g del prodotto ottenuto come da esempio 10 in 350 ml di acqua. Si addizionano 0,30 g di nitrito di sodio NaNO<sub>2</sub>, si porta la miscela di reazione alla temperatura di 5°C e si aggiungono lentamente 4,3 ml

di HCl 1N. Dopo 2 ore si lascia riscaldare a temperatura ambiente. Si isola il prodotto per precipitazione con etanolo 96%, si lava con lo stesso solvente, e si secca a 40°C sotto vuoto. Si ottengono 2,69 g di prodotto da conservare in frigo a 2-6°C sotto atmosfera d'azoto.

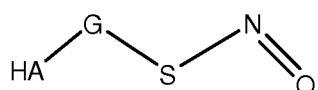
**Esempio 14: Preparazione del derivato HA-Cys-S-nitrossido p50**

**LMW via nitrito alchilico**

Si solubilizzano 4,00 g del prodotto ottenuto come da esempio 11 nella minima quantità di DMF. Si tratta con isopentil nitrito a -20°C per 2 h. Si isola il prodotto per precipitazione con 3 volumi di etanolo 96%, si lava con lo stesso solvente, e si secca a 40°C sotto vuoto. Si ottengono 3,61 g di prodotto da conservare in frigo a 2-6°C sotto atmosfera d'azoto. ——————

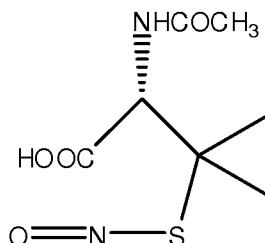
## RIVENDICAZIONI

1. Derivati di acido ialuronico funzionalizzati con gruppi S-nitroso-tiolici di formula generale:

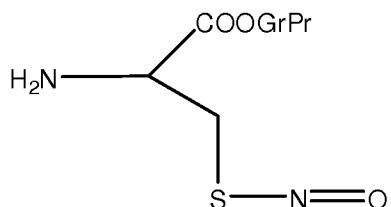


in cui HA indica l'acido ialuronico e G un adatto spaziatore.

2. Derivati secondo la rivendicazione 1 in cui lo spaziatore G è un residuo N-acetilpenicillammido di formula:



3. Derivati secondo la rivendicazione 1 in cui lo spaziatore G è un residuo di cisteina di formula:



dove GrPr rappresenta un gruppo protettivo.

4. Derivati secondo una qualunque delle rivendicazioni 1 e 2 in cui la funzionalizzazione con gruppi S-nitroso-N-acetilpenicillammido può interessare gruppi amminici derivanti dalla deacetilazione dei residui di N-acetil-glucosamina dell'acido ialuronico oppure gruppi amminici introdotti esterificando i gruppi carbossilici delle unità di acido glucuronico con residui amminoalchilici.

5. Derivati secondo una qualunque delle rivendicazioni 1 e 3 in cui la funzionalizzazione con cisteina, eventualmente protetta come estere carbossilico, interessa i gruppi carbossilici presenti nei residui di acido glucuronico dell'acido ialuronico.

6. Derivati secondo una qualunque delle rivendicazioni da 1 a 5 in cui la funzionalizzazione con gruppi S-nitroso-N-acetilpenicillammido o S-nitroso-cisteinici interessa gruppi amminici derivanti dalla deacetilazione dei residui di N-acetil-glucosamina dell'acido ialuronico.

7. Derivati secondo una qualunque delle rivendicazioni da 1 a 5 in cui la funzionalizzazione con gruppi S-nitroso-N-acetilpenicillamido o S-nitroso-cisteinici interessa gruppi amminici introdotti esterificando i gruppi carbossilici delle unità di acido glucuronico con residui di formula X-A-NH<sub>2</sub> in cui X è un atomo di alogeno, preferibilmente Bromo, e A è un residuo spaziatore alifatico o arilalifatico avente da 2 a 16 atomi di Carbonio, preferibilmente un gruppo -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>- dove n è un intero da 2 a 16, preferibilmente da 2 a 7.

8. Derivati secondo una qualunque delle rivendicazioni da 1 a 7 in cui l'acido ialuronico è di origine estrattiva, fermentativa o biotecnologia e ha un peso molecolare compreso tra 400 e  $3 \times 10^6$  Da, in particolare tra  $1 \times 10^5$  Da e  $1 \times 10^6$  Da, ancor più in particolare tra 200.000 e 750.000 Da.

9. Derivati delle rivendicazioni 1-8 per applicazioni dermatologiche e cosmetiche in particolare per la correzione di lesioni e difetti cutanei, la biorivitalizzazione dei tessuti, la cicatrizzazione dei tessuti dopo somministrazione intradermica, sottocutanea, topica, per applicazioni cardiovascolari, per il rilascio controllato di farmaci, dopo somministrazione

sistemica e/o loco-regionale.

10. Composizioni cosmetiche, farmaceutiche o dispositivi medicali comprendenti i derivati delle rivendicazioni 1-8.

Milano, 5 luglio 2007