



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

DOMANDA NUMERO	102001900934681
Data Deposito	04/06/2001
Data Pubblicazione	04/12/2002

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
C	08	B		

Titolo

NUOVI DERIVATI DI IALURONANO.



Descrizione dell'invenzione industriale avente per titolo:

NUOVI DERIVATI DI IALURONANO

A nome di: Società Cooperativa Centro Ricerche POLYtech arl

Con sede in: Padriciano 99, Trieste (Italia)

CAMPO DELL'INVENZIONE

L'invenzione in oggetto si riferisce a derivati dello ialuronano. Questi nuovi composti presentano caratteristiche chimico-fisiche particolari che li rendono indicati per vari scopi. Ad esempio, essi sono utili come selettori chirali nelle colonne cromatografiche per la separazione di enantiomeri.

STATO DELLA TECNICA

Lo ialuronano, di seguito denominato HA, è un costituente importante di un'ampia classe di biopolimeri naturali noti anche come glicosaminoglicani (GAG). Questi polimeri in proporzioni variabili con i collageni e le glicoproteine, determinano la struttura e la funzione della matrice extracellulare dei tessuti e degli organi negli animali. Il loro peso molecolare medio pesato varia da 1 a 10 milioni nella maggior parte dei tessuti. E' composto da un'unità ripetitiva disaccaridica, acido N-acetil-ialobiuronico che si compone di unità ripetitive costituite da acido D-glucuronico e 2-acetamido-2-deossi-D-glucosio (N-acetilglucosammina) legato da legame $\beta(1\rightarrow3)$ glicosidico. Ogni unità ripetitiva è legata alla successiva mediante un legame glicosidico $\beta(1\rightarrow4)$ che forma un polimero lineare. Il numero di tali unità ripetitive in un dato polimero arriva a varie migliaia e produce una catena di molte migliaia di dalton. Il termine "ialuronano" viene comunemente usato per descrivere una categoria

generale di frazioni molecolari di HA con pesi molecolari variabili o addirittura frazioni idrolizzate dello stesso. HA è presente in organismi superiori, può essere estratto da fonti animali (per esempio creste di gallo, cordone ombelicale, da fonti microbiche (ad esempio alcuni batteri come Streptococco e Pasteurella).



L'HA gioca un ruolo importante in vari processi biologici tra cui la mobilità cellulare e le interazioni cellula-cellula, oltre all'adempimento di ruoli strutturali grazie alle sue capacità lubrificanti e idratanti. In virtù di queste proprietà biologiche, l'attenzione si è sempre focalizzata sulle applicazioni biomediche di questo polimero. Di conseguenza, l'HA è stato variamente utilizzato nella viscosupplementazione e viscochirurgia e in particolare nella terapia di artropatie e di chirurgia oftalmica dove l'HA non modificato viene utilizzato in forma di gel acquoso.

Per lo ialuronano è stato identificato un uso diverso ovvero come supporto per cromatografia di affinità per la separazione di proteine della cartilagine. Queste proteine vengono separate da altri componenti per mezzo di uno specifico legame biologico con detto polimero. Questo utilizzo sfrutta le basi dell'attività biologica di questo polimero, vale a dire la forte interazione ialuronano-proteina. Questo è l'unico uso noto diverso dall'applicazione biomedica di ialuronano non modificato. Tuttavia anche questo uso è collegato alle proprietà biologiche dell'HA dal momento che sfrutta l'interazione specifica tra la proteina e l'HA. Al contrario nulla è noto sull'interazione di questo polimero con altri substrati diversi da quelli specificatamente biologici, come i substrati apolari e lipofilici.

L'attenzione si è ampiamente soffermata sull'ottenimento di derivati



chimici dell'HA allo scopo di mantenere la biocompatibilità della molecola e di ottenere polimeri che siano allo stesso tempo processabili in manufatti o in articoli come tubii, stent, membrane, spugne, fili, articoli chirurgici per impianti. La letteratura descrive due approcci generali per la modifica chimica dell'HA: (a) il crosslinking dell'HA mediante reagenti chimici bifunzionali e (b) la modifica dell'HA con reagenti monofunzionali. Quest'ultimo approccio si avvale della presenza di tre gruppi reattivi presenti (acetammido, carbossilici, ossidrilici) sull'HA. Lo sforzo maggiore è stato comunque diretto alle modifiche chimiche delle funzionalità carbossiliche o ossidriliche. Le reazioni di esterificazione sui gruppi carbossilici dell'HA sono descritti in EP87308863.8 che riporta l'esterificazione totale o parziale dei gruppi carbossilici dell'HA con alogenuri organici monofunzionali per la produzione di materiali con proprietà interessanti e per utilizzi in cosmetica, chirurgia o medicina. Le reazioni di ammidazione dell'HA sono descritte in US4,937,270, che riporta un metodo per la preparazione di gel biocompatibile insolubile in acqua.

Per quanto riguarda i gruppi ossidrilici dell'HA, varie reazioni di esterificazione vengono descritte in letteratura. Il sale sodico di HA in cui 2.6-3.6 gruppi ossidrilici per unità ripetitiva di disaccaride sono stati convertiti in gruppi acetile è descritto in US5,679,657. Questo prodotto, solubile in miscele di 90% acqua etanolo (w/w), è stato testato per le proprietà emollienti. Sono solubili in miscele di 90% acqua etanolo (w/w). L'estere con acido butirrico di sali ialuronano è anche riportato nello stato dell'arte (WO98/23648) come agente antiproliferativo.

Per quanto concerne la totale esterificazione di entrambi i carbossili



dell'HA e i gruppi ossidrilici solo un riferimento bibliografico (Khan et al., Carbohydrate Research (1998) 306, 137-146) descrive la preparazione del derivato totalmente acetilato del benzilestere dell'HA; non ci sono dettagli sulle proprietà e sui potenziali utilizzi.

Lo scopo di tutti gli studi della modifica chimica dell'HA svolta finora, era collegato alla preparazione di nuovi derivati dell'HA, che conservano le proprietà originali (native) di biocompatibilità, ed alla preparazione di nuovi biomateriali o di nuovi sistemi di rilascio di farmaci utili per la produzione di manufatti commerciali. Di qui, tutti i principali sforzi per preparare lo ialuronano modificato chimicamente si sono concentrati solo sull'applicazione biomedica; questo polimero non è ancora stato derivatizzato per applicazioni non-biocompatibili.

DESCRIZIONE DELLE FIGURE

Figura 1: elenco di racemi testati.

DESCRIZIONE DELL' INVENZIONE

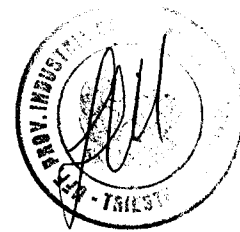
L'invenzione concerne nuovi derivati di ialuronano dove i gruppi ossidrilici sono esterificati o carbammoilati in quantità compresa tra 0.01% a 100% ed i gruppi carbossilici sono o totalmente o parzialmente esterificati con alcoli oppure sono in forma di sale.

I gruppi ossidrilici sono esterificati con acidi alifatici lineari o ramificati, saturi o insaturi, aventi al massimo 24 atomi di carbonio; con acidi cicloalifatici o alifatici cicloalifatici, mono o policiclici, aventi al massimo 34 atomi di carbonio; con acidi arilalifatici dove la catena alifatica ha 1-4 atomi di carbonio e il residuo arilico può essere eventualmente sostituito con C1-C5 alchili lineari o ramificati, alogeni, gruppi nitro, ciano,



ossidrili, amminici, metossi; con acidi arilici dove il residuo arilico può essere eventualmente sostituito con C1-C5 alchili lineari o ramificati, alogeni, gruppi nitro, ciano, ossidrili, amminici, metossi; con acidi eterociclici aromatici o non aromatici, eventualmente condensati con anelli aromatici o non, dove il gruppo eterociclico ha 3-20 atomi di carbonio ed esso può essere eventualmente sostituito con C1-C5 alchili lineari o ramificati, alogeni, gruppi nitro, ciano, ossidrili, amminici, metossi; con acidi inorganici. Esempi di esteri ottenuti per esterificazione degli ossidrili con acidi alifatici sono: acetato, butirato, propionato. Esempi di esteri ottenuti per esterificazione degli ossidrili con acidi cicloalifatici o alifatici cicloalifatici sono: cicloesancarbossilato, cicloesanacetilato, ciclopropanancarbossilato. Esempi di esteri ottenuti per esterificazione degli ossidrili con acidi arilalifatici sono: Fenilacetato, naftilacetato, cinnamato. Esempi di esteri ottenuti per esterificazione degli ossidrili con acidi arilici sono: benzoati, benzoati sostituiti come ad esempio: alobenzoati, alchilbenzoati, nitrobenzoati. Esempi di esteri ottenuti per esterificazione degli ossidrili con acidi inorganici sono: nitrato. Esempi di esteri ottenuti per esterificazione degli ossidrili con acidi eterociclici sono: acido cinconico, acido chinico, prolina, acido nicotinico, acido meconico.

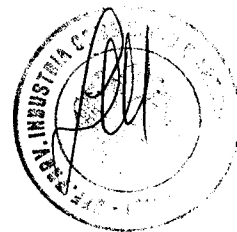
In alternativa all'esterificazione, i gruppi ossidrili possono essere carbammoilati con isocianati alchilici, alchilarilici, arilici eventualmente sostituiti, dove il residuo alchilico lineare o ramificato, saturo o insaturo, è a 2-6 atomi di carbonio ed il residuo arilico è un residuo mono- o polinucleare, eventualmente sostituito con C1-C5 alchili lineari o ramificati, gruppi alo, nitro, ciano, metossi. Esempi di carbammoilati sono:



alofenilcarbammolati, alchilfenilcarbammolati, dialchilfenilcarbammolati, dialofenilcarbammolati, alo-alchilfenilcarbammolati, trialchilfenilcarbammolati, metilcarbammolati, cicloesilcarbammolati, terbutilcarbammolati, 1-feniletilcarbammolati, benzilcarbammolati.

In questi derivati dell'invenzione, tutti i gruppi ossidrilici sia quelli primari che quelli secondari possono essere esterificati o carbammolati in modo uguale, oppure i gruppi ossidrilici primari possono essere esterificati o carbammolati in modo diverso dai gruppi ossidrilici secondari.

Nei derivati dell'invenzione i gruppi carbossilici dello ialuronano sono o totalmente o parzialmente esterificati con alcoli oppure sono in forma di sale. Gli alcoli idonei all'esterificazione sono alcoli alifatici, aralifatici, arilici, cicloalifatici, eterociclici. Gli alcoli alifatici sono alcoli lineari o ramificati con numero massimo di atomi di carbonio di 34, possono essere saturi o insaturi, eventualmente sostituiti ad esempio con alogeni, gruppi nitro, ciano, ossidrilici, amminici, metossi. Esempi sono alcool metilico, etilico, propilico. Tra gli alcoli aralifatici sono compresi gli alcoli contenenti un residuo benzenico eventualmente sostituito con catene alchiliche a 1-6 atomi di carbonio, con alogeni, con ossidrili, con ammine. Esempi sono: alcool benzilico, feniletilalcool. Gli alcoli cicloalifatici comprendono anche gli alcoli alifatici-cicloalifatici, possono essere mono o policiclici, hanno al massimo 34 atomi di carbonio. Gli alcoli eterociclici possono contenere eteroatomi scelti tra O, S, N, possono avere carattere aromatico o non aromatico, eventualmente condensati con anelli aromatici o non, ed essere eventualmente sostituiti con C1-C5 alchili lineari o ramificati, alogeni, gruppi nitro, ciano, ossidrilici, amminici, metossi.



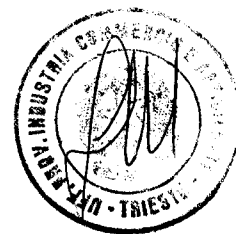
Esempi sono: tocoferolo, quercetina.

Il grado di sostituzione dei gruppi ossidrilici è espresso come percentuale (%) di gruppi ossidrilici esterificati o carbammati. I derivati dell'invenzione hanno grado di sostituzione compreso tra 0.01 e 100%. Due intervalli preferiti di sostituzione dei gruppi ossidrilici: sono 0.01 - 0.2% e 70 - 100%.

I gruppi carbossilici dei derivati dell'invenzione sono o totalmente o parzialmente esterificati con alcoli oppure sono in forma di sale. Il grado di esterificazione dei gruppi carbossilici è espresso come percentuale (%) di gruppi carbossilici modificati con alcool. Il grado di esterificazione è 100% quando tutti i gruppi carbossilici sono esterificati. Quando essi sono parzialmente esterificati allora i gruppi non esterificati sono salificati con cationi di metalli alcalini, alcalino terrosi, cationi contenenti azoto. Tra i cationi contenenti azoto sono compresi quelli contenenti azoto organico, ad esempio sali di tetralchilammonio, dove alchile ha 1-5 atomi di carbonio. Altri esempi sono lutidinio, collidinio, imidazolio. Quando i derivati sono parzialmente esterificati allora il grado di esterificazione preferito è maggiore di 50%.

Tra i derivati di ialuronano dell'invenzione sono preferiti quelli che ricadono nei seguenti gruppi:

- primo gruppo: derivati di ialuronano i cui gruppi ossidrilici sono esterificati o carbammati in quantità compresa tra 0.01% a 0.2% ed i gruppi carbossilici sono totalmente esterificati (100% grado di esterificazione);
- secondo gruppo: derivati di ialuronano i cui gruppi ossidrilici sono



esterificati o carbammoilati in quantità compresa tra 70% a 100% ed i gruppi carbossilici sono totalmente esterificati (100% grado di esterificazione);

- terzo gruppo: derivati di ialuronano i cui gruppi ossidrilici sono esterificati o carbammoilati in quantità compresa tra 70% a 100% ed i gruppi carbossilici sono in forma di sale.

I composti preferiti, che per quanto concerne il grado di sostituzione ed esterificazione possono ricadere in uno dei tre gruppi di cui sopra, hanno i gruppi ossidrilici esterificati con acidi alifatici, lineari o ramificati, saturi o insaturi; con acidi arilalifatici, con acidi arilici; oppure hanno i gruppi ossidrilici carbammoilati con isocianati alchilarilici o arilici eventualmente sostituiti; hanno i gruppi carbossilici o parzialmente o totalmente esterificati con alcoli alifatici, arilalifatici, arilici oppure i carbossili sono in forma di sale con cationi contenenti azoto. I derivati preferiti sono: ialuronano tetrabutylammonico fenilcarbammoilato, benzilestere di ialuronano fenilcarbammoilato, benzilestere di ialuronano benzoato, allilestere fenilcarbammoilato, benzilestere di ialuronano butirrato, benzilestere di ialuronano fenilacetato, benzilestere di ialuronano 3,5-dimetilfenil-carbammoilato, metilestere di ialuronano 3,5-dimetilfenilcarbammoilato.

Un ulteriore oggetto dell'invenzione è il processo di preparazione dei derivati. Il processo comprende i seguenti passaggi di reazione: a) eventuale totale o parziale esterificazione dei gruppi carbossilici presenti sullo ialuronano; b) esterificazione o carbammoilazione dei gruppi ossidrilici presenti sullo ialuronano; dove i passaggi a) e b) sono applicabili in

qualsiasi ordine.

Il passaggio a) viene eseguito mettendo a contatto lo ialuronano in forma acida o di sale con un idoneo alogenuro in presenza di un solvente organico secondo metodi convenzionali della chimica. La reazione avviene preferibilmente in N,N-dimetilformammide, nell'intervallo di temperatura tra 2 e 40°C per un periodo di tempo compreso tra 10 e 60 ore. Il materiale di partenza preferito è lo ialuronano nella forma di sale di ammonio quaternario. Variazioni nelle condizioni di reazione come descritto nell'arte nota consentono l'ottenimento di composti con diverso grado di esterificazione.

Il passaggio b) può comprendere diversi passaggi che consentono l'esterificazione o la carbammoilazione dei gruppi ossidrilici. Il passaggio b) è eseguito in passaggio singolo quando gli ossidrilici che vengono esterificati o carbammoilati sono sia gli ossidrilici primari che quelli secondari. La reazione è condotta per aggiunta del reagente opportuno al prodotto ottenuto dal passaggio a) oppure allo ialuronano in forma acida o di sale in solventi organici. I solventi preferiti sono i solventi aprotici quali dialchilsolfossido, dialchilcarbammidi, in particolare C1-C6-dialchilsolfossidi, come ad esempio dimetilsolfossido, e C1-C6-dialchilammidi di acidi C1-C6 alifatici, come ad esempio N,N-dimetilformammide, dietilformammide, dimetil-acetammide, dietilacetammide. La carbammoilazione viene condotta secondo processi convenzionali di reazione tra un alcool e un isocianato. Quindi gli ossidrilici dello ialuronano, nella sua forma acida o di sale, o esterificata, vengono fatti reagire con il corrispondente isocianato nel solvente appropriato in



A handwritten signature in black ink.



presenza di una base di lewis, quale un'ammina terziaria, o un acido di lewis quale catalizzatore. L'esterificazione viene eseguita facendo reagire lo ialuronano, nella sua forma acida o di sale, o esterificata al carbossile, con un adatto agente esterificante secondo i metodi noti dello stato dell'arte. Questi agenti sono forme attivate dei corrispondenti acidi carbossilici, quali anidridi ed alogenuri. E' preferibile utilizzare basi quali ammine terziarie o acidi di lewis quali catalizzatori. Possono essere inoltre usati diversi solventi organici. In alcuni casi possono essere usati catalizzatori specifici per accelerare la reazione. Con questa reazione gli ossidrili che vengono carbamoilati o esterificati sono sia gli ossidrili primari che secondari.

Il passaggio b) viene invece eseguito in più passaggi quando i gruppi ossidrilici primari vengono esterificati in modo diverso da quelli secondari. Un passaggio prevede la modifica selettiva del gruppo ossidrile primario dei prodotti ottenuti in a) o dello ialuronano in forma acida o sale secondo il processo descritto in WO99/18133, l'altro passaggio prevede l'esterificazione o la carbammoilazione dei gruppi ossidrilici secondari secondo le procedure descritte sopra.

Nei derivati ottenuti con il processo di preparazione i gruppi carbossilici liberi del polimero parzialmente sostituito possono essere eventualmente salificati secondo una delle procedure note.

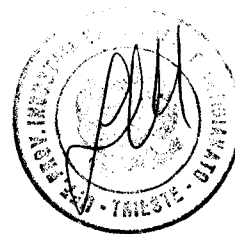
E' possibile utilizzare come materiale di partenza lo ialuronano estratto da diverse fonti che possono essere o di origine animale o da produzione biotecnologica. Il grado di purezza non è una caratteristica essenziale per la preparazione dei derivati. Per alcune specifiche applicazioni è necessario derivatizzare delle frazioni di peso molecolare ben definite di ialuronano.



In questi casi lo ialuronano ad alto peso molecolare può essere trattato con processi chimici, enzimatici, chimico-enzimatici, o fisici per ottenere le frazioni di peso molecolare desiderate. In questi casi l' HA da derivatizzare può essere ottenuto direttamente anche dagli scarti di processi di produzione di HA (frazioni di peso molecolare) per applicazione biomedica. Questi sottoprodotti possono essere vantaggiosamente usati come materiale di partenza per la preparazione dei derivati della presente invenzione.

Quando lo ialuronano di partenza è in forma di sale quaternario è preferibile utilizzare il sale di tetraalchilammonio, con gruppi alchilici da 1 a 6 atomi di carbonio. Nella maggior parte dei casi viene utilizzato lo ialuronano di tetrabutylammonio. E' possibile preparare questi sali facendo reagire un sale sodico di HA o la sua forma acida in soluzione acquosa con una resina sulfonica salificata con una base di ammonio quaternario. Il sale viene usato in questo caso perché presenta l'adeguata salinità in solventi organici utilizzati per la derivatizzazione.

La modifica chimica sia dei gruppi carbossilici che ossidrilici dello ialuronano per ottenere i derivati sostituiti dell'invenzione porta alla drastica riduzione dell'idrofilicità di tali derivati e di conseguenza a drastiche riduzioni del loro uso nelle applicazioni biocompatibili. Allo stesso tempo, questa modifica chimica permette l'ottenimento di derivati solubili in un vasto numero di solventi organici dove i derivati dell'HA noti nello stato dell'arte non sono solubili. Infatti, si è trovato che i derivati dell'invenzione presentano particolari proprietà di solubilità in solvente organico. Tale solubilità dipende dalla natura chimica dei sostituenti, dal



grado di sostituzione, dal peso molecolare. A seconda del grado di sostituzione dei gruppi ossidrilici, ai gruppi carbossilici e dal tipo di sostituyente un'ampia gamma di solventi organici può essere utilizzata per solubilizzare i derivati dell'invenzione. Possono essere infatti solubilizzati in solventi quali alcoli, chetoni, esteri, eteri, dialchilsolfossidi, dialchilcarbossalammidi, alcoli e chetoni alifatici o eterociclici a basso punto di ebollizione, idrocarburi clorurati, loro miscele. I composti sono insolubili in acqua, in idrocarburi alifatici, dialchileteri. Le caratteristiche di solubilità, la compatibilità con solventi specifici o miscele di solventi e la stabilità in presenza di solventi specifici o di miscele rappresenta una peculiarità dei composti dell'invenzione che li distingue dai derivati dell'HA noti nello stato dell'arte e che di conseguenza consente nuovi ed originali usi.

I derivati di ialuronano dell'invenzione possono essere vantaggiosamente usati nella preparazione di fasi stazionarie cromatografiche, tra cui anche le fasi stazionarie chirali. Il richiedente ha infatti sorprendentemente scoperto che i derivati dell'invenzione riconoscono specifici enantiomeri e permettono la loro separazione dalle miscele racemiche mediante il metodo cromatografico.

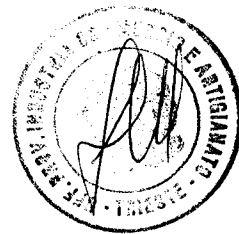
Al fine della preparazione di fasi stazionarie cromatografiche, questi derivati di ialuronano vengono utilizzati come tali. Oppure essi possono essere utilizzati dopo essere stati macinati o modellati in beads e dopo essere stati eventualmente selezionati sulla base delle dimensioni delle particelle. Essi possono in alternativa essere impaccati in colonna dopo essere stati depositati su un supporto solido. Quale supporto solido



sono adatti tutti i supporti adatti alle separazioni cromatografiche. Possono essere di materiale organico o, preferibilmente, inorganico. Esempi di supporto inorganico adatto sono il gel di silice, l'allumina, il caolino, l'ossido di titanio, l'ossido di magnesio, i silicati, e i polimeri sintetici. In una configurazione preferita, si usa la silice funzionalizzata, ad esempio la silice γ -aminopropil-silica. Esempi di gel di silice sono: Daisogel SP-1000-7, Nucleosil 1000-7.

Per questo uso i derivati idonei hanno viscosità intrinseca 0.1-22 dl/g. Per i derivati di ialuronano esterificati al carbossile è preferito l'intervallo di viscosità 0.2-4 dl/g. I derivati con viscosità intrinseca inferiore non si sono dimostrati utili per la preparazione di fasi stazionarie chirali perché non separano efficacemente le miscele racemiche e perché inoltre non possiedono adeguate caratteristiche di riproducibilità. Inoltre, alcuni derivati con viscosità molto bassa rigonfiano notevolmente dopo alcuni cicli di separazioni.

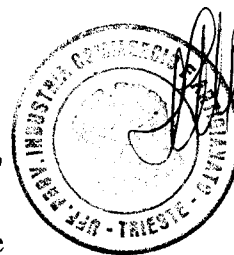
Un gruppo di derivati molto interessante per uso nella preparazione di fasi stazionarie cromatografiche è composto dai derivati con grado di sostituzione dei gruppi ossidrilici bassi o molto bassi (0.01%-0.2%) e dove i gruppi carbossilici sono totalmente (100%) esterificati. Un vantaggio di detti derivati con grado di sostituzione dell'ossidrile basso o molto basso risiede nelle proprietà di solubilità in solventi altamente polari. Questi composti, quando depositati ad un supporto solido, mostrano la loro efficacia inaspettata nella separazione di enantiomeri contenenti funzionalità polari come i gruppi aminici, ossidrilici o carbossilici. Il vantaggio sorprendente di questi derivati consiste nella possibilità di



preparare fasi stazionarie che hanno la capacità di lavorare in condizione di fase inversa, come ad esempio, utilizzare miscele di acqua-solvente organico in ogni proporzione o in miscele di soluzioni tampone e solvente organico a definiti valori di pH. Un ulteriore vantaggio consiste nella loro versatilità d'uso. Infatti possono essere utilizzati non solo in condizioni di fase inversa ma anche in fase diretta con un singolo solvente organico o con miscele di solventi organici; questo significa che l'operatore può passare da una modalità operativa all'altra a seconda dell'esigenza senza nessuna diminuzione dell'efficacia della separazione cromatografica.

Costituiscono quindi un ulteriore oggetto della presente invenzione le fasi stazionarie cromatografiche che comprendono i derivati di ialuronano dell'invenzione. Queste fasi stazionarie sono preparate secondo il processo che segue. I derivati dell'invenzione vengono solubilizzati in adeguato solvente e la soluzione ottenuta viene aggiunta ad un supporto cromatografico. Alla miscela si aggiunge un adeguato non-solvente allo scopo di depositare il derivato sul supporto solido. Il materiale viene quindi isolato, lavato e seccato. Il supporto modificato così ottenuto viene utilizzato come fase stazionaria chirale. Da qui in avanti, è chiaro che la solubilità in solvente adeguato insieme con le proprietà chirottiche ed enantioselettive dei derivati di ialuronano sono prerequisiti fondamentali per la produzione di fasi stazionarie chirali. Altre metodiche note all'esperto del settore possono essere applicate sui derivati dell'invenzione per ottenere fasi stazionarie chirali.

Questi fasi stazionarie possono essere usati nella cromatografia a strato sottile, nella cromatografia liquida, ad esempio HPLC, la cromatografia



batch, la cromatografia mediante processo di "simulating moving bed" (SBM), la cromatografia con fluidi supercritici (SFC). Questa invenzione comprende inoltre un metodo di separazione di miscele enantiomeriche per mezzo di queste fasi stazionarie chirali.

Questa invenzione comprende inoltre l'uso di queste fasi stazionarie per la separazione di varie miscele racemiche di interesse commerciale ed industriale, permettono sia la separazione di tipo analitico che preparativo di enantiomeri di composti strutturalmente diversi che possono anche contenere gruppi polari o che possono essere interamente polari. Inoltre, da una miscela racemica di isomeri ottici è possibile, mediante l'utilizzo di queste fasi stazionarie, la preparazione di isomeri ottici puri oppure di miscele di isomeri aventi un contenuto enantiomerico maggiore di quello della miscela di partenza. Le fasi inoltre consentono la determinazione della composizione enantiomerica di miscele ottenute per esempio da sintesi asimmetrica.

Esempi specifici di separazione di enantiomeri per mezzo delle fasi stazionarie dell'invenzione sono riportati nella parte sperimentale. La figura 1 riporta le strutture dei racemi testati.

Altri utilizzi dei composti dell'invenzione vengono individuati in base alle loro specifiche caratteristiche di solubilità e alla loro relativa compatibilità con i solventi organici ed inoltre alle proprietà termiche. E' stato sorprendentemente trovato che alcuni derivati dell'invenzione presentano la transizione vetrosa, che li distingue dai derivati di HA noti nello stato dell'arte. Di conseguenza, i composti di questa invenzione possono essere ulteriormente utilizzati nella preparazione di articoli, come ad esempio



spugne, film, pellicole, fibre per usi in imballaggio, in materiali compositi, in materiali per alta tecnologia, quali additivi per materiali plastici, adesivi, vernici, agenti compatibilizzanti. Altre applicazioni interessanti riguardano il settore cosmetico. Un esempio adeguato viene fornito dalla preparazione della lacca per capelli.

Gli esempi seguenti illustrano l'invenzione, senza funzione di limitazione.

PARTE SPERIMENTALE

Esempio 1 Preparazione del benzilestere di ialuronano.

3.5 g di ialuronano tetrabutylammonico preparato per scambio cationico da ialuronano di sodio avente peso molecolare viscosimetrico 55000 (determinazione fatta secondo Biochimica et Biophysica Acta, 1960, 42,476-485) vengono sciolti in 350 ml di N,N-dimetilformammide in un pallone a tre colli da 500 ml, alla temperatura di 30°C, sotto flusso di azoto e sotto agitazione meccanica. Si aggiungono 8.9 mg di tetrabutylammonio ioduro, 0.8 ml di trietilammina e 3.35 ml di benzilbromuro e si lascia reagire per 18 ore. Si concentra il prodotto a pressione ridotta, si precipita in 50 ml di acetato di etile, il precipitato viene ridisciolti e riprecipitato più volte e quindi essiccato e recuperato. La resa è del 90%. Il grado di esterificazione, determinato mediante $^1\text{H-NMR}$ in DMSO a 40°C confrontando le aree relative ai protoni metilenici del benzile (5.0-5.4 ppm) con le aree dei protoni del metile del residuo N-acetilammidico (1.6- 1.2 ppm) è 100%. E' stata verificata la solubilità del derivato nei solventi: N,N-dimetilformammide, dimetilsolfossido, acetato di etile, dietilere. Il derivato è solubile in N,N- dimetilformammide, dimetilsolfossido.

Esempio 2 Preparazione del benzilestere di ialuronano



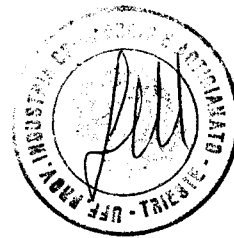
Si segue la procedura utilizzata nell'esempio 1 con la differenza che ialuronano di sodio di partenza ha peso molecolare viscosimetrico 120000 (determinazione fatta secondo Biochimica et Biophysica Acta, 1960, 42,476-485). Il prodotto ha grado di esterificazione 100% e viene determinato come all'esempio 1.

Esempio 3 Preparazione del benzilestere di ialuronano

1 g di ialuronano tetrabutylammonico preparato per scambio cationico da ialuronano di sodio avente peso molecolare viscosimetrico 50000 (determinazione fatta secondo Biochimica et Biophysica Acta, 1960, 42,476-485), vengono sciolti in 100 ml di N,N-dimetilformammide in un pallone a tre colli da 500 ml, alla temperatura di 30°C, sotto flusso di azoto e sotto agitazione meccanica. Si aggiungono 30 mg di tetrabutylammonio ioduro, 0.22 ml di trietilammina e 0.96 ml di benzilbromuro e si lascia reagire per 18 ore. Si concentra il prodotto a pressione ridotta, lo si precipita in 50 ml di acetato di etile, il precipitato viene ridisciolti e riprecipitato più volte e quindi essiccato. Sono stati ottenuti 720 mg di prodotto. Il derivato ha grado di esterificazione 100% e viene determinato come all'esempio 1. E' stata verificata la solubilità del derivato nei solventi: N,N-dimetilformammide, dimetilsolfossido, acetato di etile, dietilere. Il derivato è solubile in N,N-dimetilformammide, dimetilsolfossido.

Esempio 4 Preparazione del benzilestere di ialuronano

Si segue la procedura utilizzata nell'esempio 3 con la differenza che ialuronano di sodio di partenza ha peso molecolare viscosimetrico 18000 (determinazione fatta secondo Biochimica et Biophysica Acta, 1960,



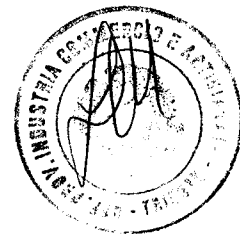
42,476-485). Il prodotto ha grado di esterificazione 100% e viene determinato come all'esempio 1.

Esempio 5 Preparazione del benzilestere di ialuronano fenilcarbammolato

1.06 g di benzilestere di ialuronano dell'esempio 2 vengono dispersi in 60 mL di N,N-dimetilformammide in un pallone a tre colli da 100 mL, alla temperatura di 25°C, sotto flusso di azoto, con refrigerante a ricadere e sotto agitazione magnetica. Dopo 1 ora si aggiungono 2.5 mL di fenilisocianato e 15 µL di dibutilstagno dilaurato e si lascia reagire per 25 ore. Si aggiungono quindi altri 2.0 mL di fenilisocianato e 10 µL di dibutilstagno dilaurato e si lascia reagire per ulteriori 14 ore. Si porta la temperatura a 60°C e si lascia reagire per ulteriori 4 ore. La soluzione viene quindi concentrata a pressione ridotta a circa 1/5 del suo volume e precipitata in 200 mL di dietiletere. Il solido viene filtrato, lavato e seccato. Sono stati ottenuti 660 mg di prodotto. Il grado di sostituzione dei gruppi ossidrilici, determinato mediante ¹H NMR dal confronto tra le aree relative ai protoni aromatici dei gruppi fenilcarbammati (6.2 -7.6 ppm), con le aree dei protoni del polisaccaride e del metilene benzilico (3.0 – 5.2 ppm) è 100%. La viscosità intrinseca del prodotto è 2.06 dL/g in acetone a 20°C. E' stata verificata la solubilità del derivato nei solventi: N,N-dimetilformammide, acetone, dietiletere, esano. Il prodotto è solubile in N,N-dimetilformammide e in acetone.

Esempio 6 Preparazione di ialuronano tetrabutylammonico fenilcarbammolato

1 g di ialuronano tetrabutylammonico preparato per scambio cationico da ialuronano di sodio avente peso molecolare viscosimetrico 120000



(determinazione fatta secondo Biochimica et Biophysica Acta, 1960, 42,476-485), viene sciolto in 50 ml di N,N-dimetilformammide in un pallone a tre colli da 500 ml, alla temperatura di 50°C, sotto flusso di azoto, con refrigerante a ricadere e sotto agitazione meccanica. Si aggiungono mediante siringa 480 µl di 1,8-diazabicyclo[4.5.0]undec-7-ene(1.5-5) (DBU) e dopo 10 min si aggiungono mediante imbuto gocciolatore 520 µl di fenilisocianato diluiti in 3 ml di N,N-dimetilformammide ad un flusso di 1 ml ogni 10 min. Si ripete l'aggiunta per altre due volte ad intervalli di 0.5 ore e si lascia reagire per 0.75 ore dopo l'ultima aggiunta. Si concentra la soluzione a pressione ridotta a circa 1/3 del volume e si precipita in 100 ml di etere. Si scioglie il prodotto in 50 ml di acetone e lo si precipita in 300 ml di etere per due volte. Il precipitato viene filtrato e poi seccato. Si ottengono 1.2 g di prodotto. Il grado di sostituzione dei gruppi ossidrilici, determinato mediante ¹H-NMR in DMSO a 40°C confrontando le aree relative ai protoni aromatici dei gruppi fenilcarbammati (7.4-6.8 ppm) e le aree dei protoni del metile del residuo N-acetilammidico (1.8-1.6 ppm) è 50%.

Esempio 7 Preparazione di ialuronano tetrabutylammonico fenilcarbammato

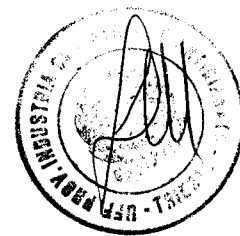
4 g di ialuronano tetrabutylammonico preparato per scambio cationico da ialuronano di sodio avente peso molecolare viscosimetrico 120000 (determinazione fatta secondo Biochimica et Biophysica Acta, 1960, 42,476-485), viene sciolto in 200 ml di N,N-dimetilformammide in un pallone a tre colli da 500 ml, alla temperatura di 50°C, sotto flusso di azoto, con refrigerante a ricadere e sotto agitazione meccanica. Si aggiungono



mediante siringa 4.8 ml di DBU e dopo 10 min si gocciolano mediante imbuto gocciolatore 3.5 ml di fenilisocianato diluiti in 5 ml di N,N-dimetilformammide ad un flusso di 1 ml ogni 10 min. Si ripete l'aggiunta dopo 1.5 ore e si lascia reagire per 1.5 ore. Si concentra la soluzione a pressione ridotta a circa 1/3 del volume e si precipita in 200 ml di etere. Si scioglie il prodotto in 200 ml di acetone e lo si precipita in 1 L di etere per due volte. Il precipitato viene filtrato e poi seccato. Si ottengono 5 g di prodotto. Il prodotto ha grado di sostituzione 100% e viene determinato come all'esempio 6. La viscosità intrinseca del prodotto è 11.5 dl/g in acetone a 20°C.

Esempio 8 Preparazione di ialuronano tetrabutylammonico fenil-carbammoilato

2 g di ialuronano tetrabutylammonico preparato per scambio cationico da ialuronano di sodio avente peso molecolare viscosimetrico 50000 (determinazione fatta secondo Biochimica et Biophysica Acta, 1960, 42,476-485), vengono sciolti in 200 ml di N,N-dimetilformammide in un pallone a tre colli da 500 ml, alla temperatura di 50°C, sotto flusso di azoto, con refrigerante a ricadere e sotto agitazione meccanica. Si aggiungono mediante siringa 2.4 ml di DBU e dopo 10 min si gocciolano mediante imbuto gocciolatore 1.64 ml di fenilisocianato diluiti in 5 ml di N,N-dimetilformammide ad un flusso di 1 ml ogni 10 min. Si ripete l'aggiunta per altre due volte ad intervalli di 1.75 ore e si lascia reagire per ulteriori 19 ore dopo l'ultima aggiunta. Si concentra la soluzione a pressione ridotta a circa 1/3 del volume e si precipita in 100 ml di etere. Si scioglie il prodotto in 50 ml di acetone e lo si precipita in 300 ml di etere per due volte. Il



precipitato viene filtrato e poi seccato. Si ottengono 2.94 g di prodotto. Il prodotto ha grado di sostituzione dei gruppi ossidrilici 100% e viene determinato come all'esempio 6.

Esempio 9 Preparazione del benzilestere di ialuronano fenilcarbammoilato
0.750 g di ialuronano benzilestere preparato all'esempio 1 vengono dispersi in 75 ml di N,N-dimetilformammide in un pallone a tre colli da 250 ml, alla temperatura di 50°C, sotto flusso di azoto, con refrigerante a ricadere e sotto agitazione meccanica. Si aggiungono mediante siringa 50 µl di dibutilstagno dilaurato e 3.0 ml di fenilisocianato e si lascia reagire per 22 ore. Si concentra il prodotto a pressione ridotta fino a circa 1/5 del volume, lo si precipita in 200 ml di etere, lo si scioglie in 30 ml di acetone e lo si precipita in 200 ml di etere. Successivamente lo si scioglie in 30 ml di diclorometano e lo si precipita in 200 ml di metanolo. Il precipitato viene filtrato e poi seccato. Si ottengono 870 mg di prodotto. Il grado di sostituzione dei gruppi ossidrilici, determinato mediante ¹H-NMR in DMSO a 40°C confrontando le aree relative ai protoni aromatici dei gruppi fenilcarbammati (6.2-7.6 ppm) con le aree dei protoni del polisaccaride e del metilene benzilico (3.0 –5.2 ppm) è 100%. La viscosità intrinseca del prodotto 0.59 dl/g in acetone a 20°C. E' stata verificata la solubilità del derivato nei solventi: N,N-dimetilformammide, dimetilsolfossido, diclorometano, acetone, metanolo, dietiletere. Il derivato è solubile in N,N-dimetilformammide, dimetilsolfossido, diclorometano, acetone.

Esempio 10 Preparazione del benzilestere di ialuronano butirrato

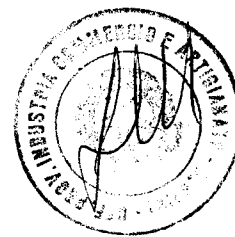
0.75 g di ialuronano benzilestere dell'esempio 1 vengono dispersi in 75 ml di N,N-dimetilformammide in un pallone a tre colli da 250 ml, alla



temperatura di 50°C, sotto flusso di azoto, con refrigerante a ricadere e sotto agitazione meccanica. Si aggiungono 0.74 g di dimetilammino piridina, 1.67 ml di anidride butirrica mediante siringa e si lascia reagire per 22 ore. Si concentra la soluzione a pressione ridotta fino a circa 1/5 del volume e si precipita in 150 ml di etere. Si scioglie in 30 ml di acetone e si precipita in 150 ml di etere due volte. Il precipitato viene filtrato e poi seccato. Si ottengono 960 mg di prodotto. Il grado di sostituzione dei gruppi ossidrilici, determinato mediante $^1\text{H-NMR}$ in DMSO a 40°C confrontando le aree relative ai protoni aromatici del benzile (7-7.6 ppm) e le aree dei protoni del metile del residuo butirrico (0.8-1 ppm) è 100%. La viscosità intrinseca del prodotto è 0.65 dl/g in acetone a 20°C. E' stata verificata la solubilità del derivato nei solventi: N,N-dimetilformammide, dimetilsolfossido, diclorometano, acetone, cloroformio, tetraidrofurano. Il derivato è solubile in N,N-dimetilformammide, dimetilsolfossido, diclorometano, acetone, cloroformio, tetraidrofurano. Film e pellicole sono stati ottenuti per lenta evaporazione di soluzioni (20 mg/0.5 ml) del derivato in diclorometano e di soluzioni del derivato in cloroformio.

Esempio 11 Preparazione del benzilestere di ialuronano acetilato

0.5 g di ialuronano benzilestere dell'esempio 3 vengono dispersi in 40 ml di N,N-dimetilformammide in un pallone a tre colli da 100 ml, alla temperatura di 50°C, sotto flusso di azoto, con refrigerante a ricadere e sotto agitazione meccanica. Dopo due ore si porta a temperatura ambiente. Si aggiungono 50 mg di dimetilammino piridina sciolti in 2 ml di N,N-dimetilformammide, 1.33 ml di anidride acetica mediante siringa e si lascia reagire per 48 ore. Si concentra la soluzione a pressione ridotta fino a circa



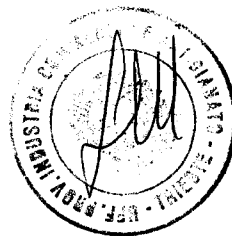
1/5 del volume e si precipita in 150 ml di etere. Si scioglie in 20 ml di acetone e si precipita in 150 ml di etere, il tutto per due volte. Il precipitato viene filtrato e poi seccato. Sono stati ottenuti 520 mg di prodotto. Il grado di sostituzione dei gruppi ossidrilici, determinato mediante $^1\text{H-NMR}$ in DMSO a 40°C confrontando le aree relative ai protoni aromatici del residuo benzilico (7.6- 7 ppm) con l'area dei protoni dei metili dei residui acetilato ed N-acetilammidico (2.2-1.8 ppm) è 100%. La viscosità intrinseca del prodotto è 0.83 dl/g in acetone a 20°C .

Esempio 12 Preparazione del benzilestere di ialuronano acetilato

Si segue la procedura dell'esempio 11 con la differenza che il benzilestere dell'esempio 2 viene disperso in N,N-dimetilformammide alla temperatura di 25°C . Il grado di sostituzione dei gruppi ossidrilici, determinato mediante $^1\text{H-NMR}$ come all'esempio 11 è 100%. La viscosità intrinseca del prodotto è 1.70 dl/g in acetone a 20°C . Il derivato solubilizzato in acetone (100 mg/5 ml) a seguito di lenta evaporazione del solvente consente la preparazione di film o pellicole.

Esempio 13 Preparazione del benzilestere di ialuronano fenilcarbammoilato

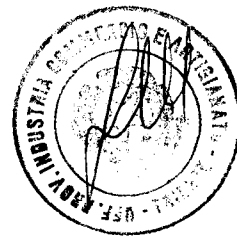
0.5 g di ialuronano benzilestere dell'esempio 4 vengono dispersi in 100 ml di N,N-dimetilformammide in un pallone a tre colli da 500 ml, alla temperatura di 80°C , sotto flusso di azoto, con refrigerante a ricadere e sotto agitazione meccanica. Dopo due ore si porta a 50°C , Si aggiungono 15 μL di dibutilstagno dilaurato sciolti in 2 ml di N,N-dimetilformammide, 1.75 ml di fenilisocianato mediante siringa e si lascia reagire per 22 ore. Si concentra la soluzione a pressione ridotta fino a circa 1/5 del volume e si precipita in 200 ml di etere. Si scioglie in 20 ml di acetone e si precipita in



200 ml di etere, il solido viene filtrato a pressione ridotta, sciolto in 20 ml di diclorometano e precipitato in 200 ml di metanolo. Si scioglie ulteriormente in 20 ml di acetone e si precipita in 200 ml di etere. Il precipitato viene filtrato e poi seccato. Si ottengono 530 mg di prodotto. Il grado di sostituzione dei gruppi ossidrilici, determinato mediante $^1\text{H-NMR}$ confrontando le aree relative ai protoni aromatici del residuo benzilico (7.6-7 ppm) con l'area dei protoni dei metili dei residui N-acetamidico (2.2-1.8 ppm) è 100%. La viscosità intrinseca del prodotto è 0.30 dl/g in acetone a 20°C. E' stata verificata la solubilità del derivato nei solventi: N,N-dimetilformammide, dimetilsolfossido, diclorometano, acetone, metanolo, dietiletere. Il derivato è solubile in N,N-dimetilformammide, dimetilsolfossido, diclorometano, acetone.

Esempio 14 Preparazione del benzilestere di ialuronano fenilacetato

1.0662 g di benzilestere di ialuronano dell'esempio 2 vengono dispersi in 100 ml di N,N-dimetilformammide e 20 ml di piridina in un pallone a 3 colli sotto agitazione meccanica. Alla soluzione così ottenuta posta su bagno di ghiaccio. Si aggiungono goccia a goccia 5 ml di fenilacetilcloruro. Si riporta a temperatura ambiente e si lascia in agitazione per 15 ore. Si ripone la soluzione in bagno di ghiaccio, si aggiungono goccia a goccia ulteriori 5 ml di fenilacetilcloruro. La miscela di reazione viene quindi riportata a temperatura ambiente e mantenuta sotto costante agitazione per 3 ore. Si aggiungono quindi 350 ml etere sotto agitazione, il precipitato viene recuperato per filtrazione, quindi solubilizzato in acetone, precipitato con metanolo. Si ripete la riprecipitazione per ulteriori due volte. Il prodotto viene solubilizzato in 50 ml di cloruro di metilene, precipitato in 150 ml di



metanolo, solubilizzato in 200 ml di acetone, precipitato in 400 ml di acqua, quindi lavato ed infine seccato. Sono stati ottenuti 0.7 g di prodotto. Il grado di sostituzione dei gruppi ossidrilici, determinato mediante $^1\text{H-NMR}$ in CDCl_3 è 100%. La viscosità intrinseca del prodotto in acetone a 20°C è 2.28 dl/g.

Esempio 15 Preparazione di benzilestere di ialuronano 3,5-dimetilfenilcarbammolato

1 g di ialuronano benzilestere ottenuto all'esempio 3 viene disperso in 200 ml di N,N-dimetilformammide in un pallone a tre colli da 500 ml, alla temperatura di 50°C , sotto flusso di azoto, con refrigerante a ricadere e sotto agitazione meccanica. Dopo un ora Si aggiungono 15 μL di dibutilstagno dilaurato sciolti in 2 ml di N,N-dimetilformammide, 4.5 ml di fenilisocianato mediante siringa e si lascia reagire per 22 ore. Si concentra la soluzione a pressione ridotta e si precipita in 200 ml di etere. Si scioglie in 20 ml di acetone e precipitato in 200 ml di metanolo. Il precipitato viene filtrato, seccato. Si ottengono 0.9 g di prodotto. Il grado di sostituzione dei gruppi ossidrilici, determinato mediante $^1\text{H-NMR}$ confrontando le aree relative ai protoni aromatici dei gruppi fenilcarbammati (6.2-7.6 ppm) con le aree dei protoni del polisaccaride e del metilene benzilico (3.0 –5.2 ppm) è 100%. E' stata verificata la solubilità del derivato nei solventi: N,N-dimetilformammide, dimetilsolfossido, diclorometano, acetone, dietiletere. Il derivato è solubile in N,N-dimetilformammide, dimetilsolfossido. Il prodotto ottenuto ha viscosità intrinseca di 0.6 dl/g in acetone:DMF (9:1) a 20°C .

Esempio 16 Preparazione del benzilestere di ialuronano acetilato



1 g di ialuronano benzilestere dell'esempio 2 viene disperso in 100 mL di N-metil pirrolidone in un pallone a tre colli da 250 mL, alla temperatura di 80°C, sotto flusso di azoto, con refrigerante a ricadere e sotto agitazione magnetica.. A solubilizzazione completa si raffredda a temperatura ambiente, si aggiungono 4 mL di anidride acetica e 100 mg di dimetilamminopiridina e si lascia reagire per 48 ore a temperatura ambiente. La soluzione viene quindi concentrata a pressione ridotta a 1/3 del suo volume e precipitata in acqua acida. Il prodotto viene recuperato mediante filtrazione e sciolto in acetone, quindi riprecipitato in acqua acida, filtrato e seccato in stufa a vuoto a 50°C. Si sono ottenuti 980 mg di prodotto. Il prodotto ha grado di sostituzione dei gruppi ossidrilici 100% e viene determinato come all'esempio 11. La viscosità intrinseca del prodotto in acetone a 20°C è 0.64 dl/g.

Esempio 17 Preparazione del metilestere di ialuronano

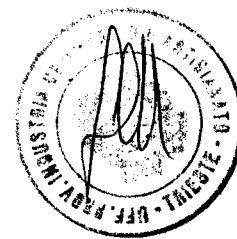
500 mg di ialuronano tetrabutylammonico preparato per scambio cationico da ialuronano di sodio avente peso molecolare viscosimetrico 52000 (determinazione fatta secondo Biochimica et Biophysica Acta, 1960, 42,476-485), vengono sciolti in 100 mL di N,N-dimetilformammide anidra alla temperatura di 50°C sotto agitazione magnetica in un pallone da 250 mL provvisto di refrigerante a ricadere. La soluzione viene quindi raffreddata a temperatura ambiente e trasferita in un reattore da 1 L. Si abbassa la temperatura a 4°C e si aggiunge 1.5 mL di metil ioduro e si lascia reagire per 48 ore sotto agitazione meccanica. La soluzione viene quindi concentrata a pressione ridotta a circa 1/3 del suo volume e precipitata in 200 mL di dietiletere. Il prodotto viene lavato 2 volte in



acetone, filtrato e seccato. Sono stati ottenuti 310 mg di prodotto. Il derivato viene caratterizzato ^1H NMR e ^{13}C NMR. Si osserva uno spostamento significativo rispetto al polimero di partenza soprattutto del segnale del carbossile sull'acido glucuronico (tra 167 e 171 ppm) e ai due segnali interglicosidici (tra 81 e 83 ppm), il metile produce un nuovo segnale a 53 ppm. E' stata verificata la solubilità del derivato nei solventi: dimetilsolfossido, dietilere, acetone. Il derivato è solubile in dimetilsolfossido.

Esempio 18 Preparazione dell'estere metilico di ialuronano fenil-carbammoilato

250 mg di ialuronano metilestere dell'esempio 17 vengono dispersi in 100 mL di N,N-dimetilformammide in un pallone a tre colli da 250 mL, ad una temperatura di 80°C, sotto flusso di azoto, con refrigerante a ricadere e sotto agitazione magnetica. Dopo 2 ore si abbassa la temperatura a 50°C e si aggiungono 1 mL di fenilisocianato e 15 μL di dibutilstagno dilaurato e si lascia reagire per 22 ore. La soluzione viene quindi concentrata a pressione ridotta a circa 1/5 del suo volume e precipitata in 200 mL di dietilere. Il solido viene filtrato, lavato e seccato. Sono stati ottenuti 220 mg di prodotto. Il grado di sostituzione che viene calcolato mediante ^1H NMR dal confronto tra le aree relative ai protoni aromatici dei gruppi fenilcarbammati (6.8 - 7.8 ppm), quelle del gruppo N-acetilammidico (1.6 - 2.0 ppm) e i picchi relativi al polisaccaride e al gruppo metilico (2.8 - 5.0 ppm) è 35%. E' stata verificata la solubilità del derivato nei solventi: N,N-dimetilformammide e dimetilsolfossido, dietilere, acetone. Il prodotto è solubile in N,N-dimetilformammide e dimetilsolfossido.



Esempio 19 Preparazione di benzilestere di ialuronano benzoato

In un pallone a tre colli da 50 mL provvisto di refrigerante a ricadere, vengono posti 964 mg di anidride benzoica alla temperatura di 50°C e sotto flusso di azoto. Si aggiungono quindi 100 mg di benzilestere di ialuronano dell'esempio 4 in 15 mL di N,N-dimetilformammide e 32 µL di 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene(1,5-5) (DBU) e si lascia reagire per 22 ore. La soluzione viene poi concentrata a pressione ridotta a circa 1/3 del suo volume e precipitata in etere. Il solido viene filtrato e disperso in 100 mL di acetone che viene poi eliminato a pressione ridotta. Il prodotto viene lavato ulteriormente con cloroformio, filtrato e seccato. Sono stati ottenuti 52 mg di prodotto. Il grado di sostituzione del derivato che viene calcolato mediante ¹H NMR dal confronto tra le aree relative ai protoni aromatici (7.0 - 7.6 ppm), quella del metilene benzilico (5.0 - 5.2 ppm) e il picco del gruppo N-acetilammidico (1.6 e 2.0 ppm) si calcola che la sostituzione dei gruppi ossidrilici è del 100%. E' stata verificata la solubilità del derivato nei solventi: N,N-dimetilformammide e dimetilsolfossido, dietiletere, acetone, cloroformio. Il prodotto è solubile in N,N-dimetilformammide e dimetilsolfossido.

Esempio 20 Preparazione del benzilestere di ialuronano

Si segue la procedura utilizzata nell'esempio 3 con la differenza che ialuronano di sodio di partenza ha peso molecolare viscosimetrico 9000 (determinazione fatta secondo Biochimica et Biophysica Acta, 1960, 42,476-485). Il prodotto ha grado di esterificazione 100% e viene determinato come all'esempio 1.

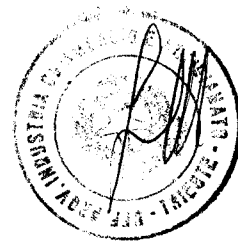
Esempio 21 Preparazione dell'allilestere di ialuronano fenilcarbammolato



150 mg di ialuronano tetrabutylammonico preparato per scambio cationico da ialuronano di sodio avente peso molecolare viscosimetrico 52000 (determinazione fatta secondo Biochimica et Biophysica Acta, 1960, 42,476-485), vengono sciolti in 15 mL di N,N-dimetilformammide anidra in un pallone a tre colli da 50 mL alla temperatura di 30°C, sotto flusso di azoto e sotto agitazione magnetica. A solubilizzazione completa del polimero si aggiungono 200 µL di allilbromuro, 40 µL di trietilammina ed una quantità catalitica di tetrabutylammonio ioduro e si lascia reagire per 26 ore. Si riscalda a 50°C, si aggiungono 170 µL di fenilisocianato e 10 µL di dibutilstagno dilaurato e si lascia reagire per 21 ore. La soluzione viene quindi concentrata a pressione ridotta a circa 1/3 del suo volume e precipitata in dietilere. Il solido viene filtrato, lavato 2 volte in acetone e seccato. Sono stati ottenuti 50 mg di prodotto. Il derivato è stato caratterizzato mediante NMR (¹H, 2D COSY, ¹H DOSY, ¹³C). Dal confronto tra le aree dei segnali relativi al gruppo allilico coniugato allo ialuronico (CH-O a 3.90 ppm, -CH= a 5.90 ppm, =CH₂ tra 5.22 e 5.35 ppm) quelle dei protoni aromatici dei gruppi fenilcarbammati (tra 6.8 e 7.6 ppm) ed il picco del gruppo N-acetilammidico (tra 1.6 e 2.0 ppm) è stato definito che il grado di esterificazione del carbossile è 50% ed il grado di sostituzione degli ossidrili è 100%. E' stata verificata la solubilità del derivato nei solventi: N,N-dimetilformammide e dimetilsolfossido, dietilere, acetone. Il prodotto è solubile in N,N-dimetilformammide e dimetilsolfossido.

Esempio 22 Preparazione del benzilestere di ialuronano fenilcarbammolato

200 mg di benzilestere di ialuronano dell'esempio 3 vengono dispersi in 50



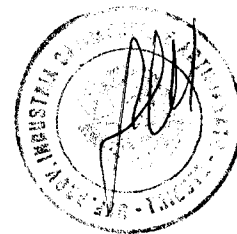
ml di N,N-dimetilformammide in un pallone a tre colli da 100 ml, ad una temperatura di 80°C, sotto flusso di azoto, con refrigerante a ricadere e sotto agitazione magnetica. Dopo 1 ora si raffredda a 50°C e si aggiungono 50 µl di fenilisocianato e 15 µl di dibutilstagno dilaurato e si lascia reagire per 22 ore. La soluzione viene quindi concentrata a pressione ridotta a circa 1/5 del suo volume e precipitata in 200 ml di dietilere. Il solido viene filtrato, lavato e seccato. Sono stati ottenuti 130 mg di prodotto. Il grado di sostituzione dei gruppi ossidrilici, determinato mediante ^1H NMR dal confronto tra le aree relative ai protoni aromatici (6.8 - 7.6 ppm), quella del metilene benzilico (5.0 - 5.2 ppm) e il picco del gruppo N-acetilammidico (1.6 - 2.0 ppm) è 2%. E' stata verificata la solubilità del derivato nei solventi: N,N-dimetilformammide e dimetilsolfossido, dietilere, acetone. Il prodotto è solubile in N,N-dimetilformammide e dimetilsolfossido.

Esempio 23 Preparazione del benzilestere di ialuronano fenilcarbammolato

Si segue la procedura dell'esempio 22 con la differenza che si utilizzano 5 µl di fenilisocianato. Il grado di sostituzione dei gruppi ossidrilici, determinato come all'esempio 22, è 0.2%. E' stata verificata la solubilità del derivato nei solventi: N,N-dimetilformammide, dimetilsolfossido, dietilere, acetone. Il derivato è solubile in: N,N-dimetilformammide, dimetilsolfossido.

Esempio 24 Preparazione del benzilestere di ialuronano fenilcarbammolato

Si segue la procedura utilizzata all'esempio 9 con la differenza che si utilizza lo ialuronano benzilestere preparato all'esempio 20. Il grado di sostituzione dei gruppi ossidrilici, determinato come all'esempio 9 è 100%.

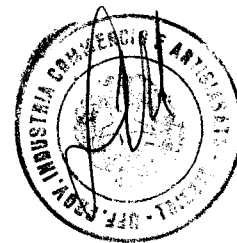


Esempio 25 Determinazione della temperatura di transizione vetrosa.

E' stato utilizzato un calorimetro differenziale a scansione (DSC) Perkin-Elmer mod. Pyris 1 previamente calibrato mediante standard. 5-10 mg di prodotto dell'invenzione opportunamente posto in cella di alluminio mantenuto a 55°C per 30 min direttamente nel calorimetro prima di ogni misura. Per i prodotti dell'esempio 10 e dell'esempio 11 sono stati effettuati i seguenti cicli termici: primo riscaldamento da 55°C a 200°C alla velocità di scansione di 10°C/min, successivo raffreddamento a 200°C/min e secondo riscaldamento da 55°C a 200°C a 10°C/min. Entrambi i prodotti presentano una transizione vetrosa alla temperatura (inflection point) di 130-132°C per il prodotto dell'esempio 10 e alla temperatura di 163-166°C per il prodotto dell'esempio 11. Per il prodotto dell'esempio 15 sono stati effettuati i seguenti cicli termici: primo riscaldamento da 55°C a 185°C alla velocità di scansione di 10°C/min, raffreddamento a 10°C/min, secondo riscaldamento da 55°C a 185°C a 10°C/min, raffreddamento a 200°C/min, terzo riscaldamento da 55°C a 185°C a 10°C/min. Il prodotto presenta una transizione vetrosa alla temperatura (inflection point) di 177-179°C.

Esempio 26 Procedura generale per la preparazione delle fasi stazionarie chirali HY con i derivati dell'invenzione.

Il derivato dell'invenzione viene solubilizzato nel solvente opportuno mediante agitazione fino a completa dissoluzione. La soluzione viene quindi filtrata ed aggiunta ad una sospensione di silica gel previamente amminopropilsilanizzata. Il sistema viene tenuto in agitazione per 2 ore ed eventualmente sottoposto a trattamento di ultrasuoni per 30 minuti. Si aggiunge un non-solvente al fine di depositare il campione sulla silica. Si



recupera il precipitato e si asciuga. Dopo aver rimosso le particelle indesiderate ed il solvente, il residuo viene seccato ottenendo la fase stazionaria chirale.

Esempio 27 Procedura generale applicata per la separazione di miscele racemiche usando colonne HPLC contenenti le fasi stazionarie chirali dell'invenzione

Si utilizzano una pompa Knauer WellChrom Maxi-Star K-1000 (Knauer GmbH, Berlin, Germany) con un iniettore Knauer HPLC 6-port-valve ed un loop di 20 μ l. La misura viene fatta a 254 nm con un detector Knauer WellChrom K-2500. L'integrazione dei picchi dei cromatogrammi viene eseguita con il pacchetto BDS software (Barspec Ltd., Rehovot, Israel). L'impaccamento delle colonne HPLC, acquistate da Max Stevenson (Berlin, Germany, dimensione 150 x 4.6 mm) viene eseguito con la tecnica "slurry" usando una pompa pneumatica per HPLC Knauer. I solventi usati per HPLC con purezza analitica della J. T. Baker, vengono ridistillati prima dell'uso. Il volume morto della colonna è stato misurato con 1,3,5-tri-tert-butilbenzene. Le strutture dei racemi testati sono mostrate nella figura 1.

Esempio 28 Separazione di miscele racemiche con HY-7, HY-8, HY-11

Le colonne cromatografiche per HPLC vengono riempite con le fasi stazionarie HY-7, HY-8 e HY-11 ottenute rispettivamente dai derivati degli esempi 5, 9, 13. La fase mobile utilizzata per la separazione dei racemi è: n-esano:2-propanolo (9:1) al flusso di 1.0 ml/min. I cromatogrammi ottenuti consentono di determinare il fattore di separazione (separation factor) (α) e il fattore di risoluzione (resolution factor) (R_s) mostrati in Tabella 1.



Tabella 1

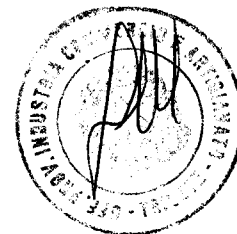
Racemo	HY-7		HY-8		HY-11	
	α	Rs	α	Rs	α	Rs
2	1	0	1.53	2.87	1.15	0.62
9	1.53	0.26	2.40	7.43	1	0
10	1	0	1.09	0.37	1	0
11	1	0	1.17	0.77	1	0
12	1	0	2.21	8.25	1	0
16	1.44	0.67	1.98	1.36	1.29	0.89

Dalla tabella si evince la capacità di enantioriconoscimento dei derivati testati e la migliore capacità del derivato HY-8.

Gli stessi racemi sono stati testati utilizzando una colonna cromatografica per HPLC riempita con la HY-14 ottenuta a partire dal derivato dell'esempio 25 e nelle identiche condizioni sperimentali. In questo caso nessun racemo è separato e la pressione in colonna, bassa all'inizio tende a crescere lentamente ma continuamente nel corso delle prove indicando chiaramente che nelle condizioni impiegate il derivato rigonfia.

Esempio 29 Separazione di miscele racemiche con HY-10

Il racemo 12 è stato analizzato mediante HPLC con una colonna 150 mm x 4.6 mm I.D. contenente la fase stazionaria chirale costituita dal derivato di ialuronano preparato all'esempio 11 alle seguenti condizioni: fase mobile esano/isopropanolo 9:1; flusso 1 ml/min. La separazione cromatografica dei due enantiomeri è caratterizzata dai seguenti parametri $k'1 = 4.80$, $\alpha = 1.32$,



$R_s = 1.36$ che testimoniano la risoluzione “baseline” del racemo. Dopo tale separazione, la colonna è stata di seguito utilizzata nelle seguenti condizioni: fase mobile esano/diclorometano/metanolo 68:30:2, flusso 1 ml/min per 5 ore; fase mobile esano/etilacetato 70:30, flusso 1 ml/min per 5 ore; fase mobile diclorometano/etilacetato 1:1, flusso 1 ml/min per 2 ore. Dopo tale trattamento il racemo 12 è stato nuovamente analizzato alle condizioni iniziali ottenendo la risoluzione “baseline”. E’ pertanto chiaro che il selettore chirale non è stato rimosso in seguito ai cambi ed al tipo di fase mobile impiegato.

Esempio 30 Confronto di separazione di miscele racemiche con colonne commerciali

Il racemo metil-3-idrossi-5-oxo-1-ciclopentene-1-eptanoato è stato analizzato mediante HPLC con una colonna 250 mm X 4.6 mm I.D. contenente la fase stazionaria chirale costituita dal derivato di ialuronano preparato all’esempio 16 alle seguenti condizioni: fase mobile esano/isopropanolo 9:1; flusso 1 ml/min. Lo stesso racemo è stato analizzato mediante HPLC con due diverse colonne commerciali denominate Chiralcel OD e Chiralcel OJ, entrambe 250 mm X 4.6 mm I.D, alle stesse condizioni. I risultati sono riportati in tabella 2.

Tabella 2

Fase stazionaria	α	R_s
HY-12	1.21	1.2
Chiralcel OD	1.07	0.7
Chiralcel OJ	1.16	1.1

Dalla tabella si evince che la fase stazionaria contenente il derivato

dell'invenzione consente una migliore separazione del racemo.



Esempio 31 Separazione di miscele racemiche con HY-5 impiegando come fase mobile un solvente puro

La colonna cromatografica per HPLC viene riempita con la CSP e diverse miscele racemiche vengono separate. La fase mobile utilizzata è: n-esano, flusso 1.0 ml/min. I cromatogrammi ottenuti consentono di determinare il fattore di separazione (separation factor) (α) e il fattore di risoluzione (resolution factor) (R_s) mostrati in Tabella 3

Tabella 3.

Racemo	HY-5	
	α	R_s
1	2.11	0.27
2	1.06	0.12
3	1.16	0.10
5	1.56	0.31

Dalla tabella si evince la capacità di enantioriconoscimento utilizzando come fase mobile un solvente puro.

Esempio 32 Separazione di miscele racemiche (clenbuterolo, prometazina) con HY-13 in fase inversa

La colonna cromatografica per HPLC viene riempita con la fase stazionaria ottenuta dal derivato dell'esempio 23 e due miscele racemiche vengono separate. La fase mobile utilizzata è: metanolo: acqua (1:1) flusso 1 ml/min. I due enantiomeri di ogni miscela vengono risolti e i cromatogrammi presentano due picchi separati simmetrici con fattore di separazione (separation factor) (α) e fattore di risoluzione (resolution

factor) (R_s) mostrati in Tabella 4.

Tabella 4

Racemo	HY-13	
	α	R_s
Clenbuterolo	1.47	3.22
Prometazina	1.35	1.87

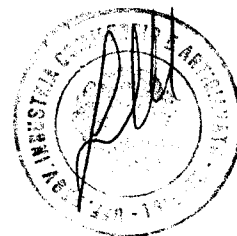
Dalla tabella si evince la capacità di enantioriconoscimento utilizzando condizioni cromatografiche in fase inversa.





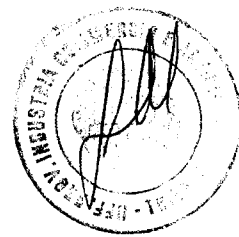
RIVENDICAZIONI

1. Derivati di ialuronano dove i gruppi ossidrilici sono esterificati o carbammoilati in quantità compresa tra 0.01% a 100% ed i gruppi carbossilici sono o totalmente o parzialmente esterificati con alcoli oppure sono in forma di sale, con l'eccezione di benzilestere di ialuronano acetilato, sale di ialuronano acetilato, sale di ialuronano butirrato.
2. Derivati secondo la rivendicazione 1, dove i gruppi ossidrilici sono esterificati con acidi inorganici; con acidi alifatici lineari o ramificati, saturi o insaturi; con acidi cicloalifatici o alifatici cicloalifatici, mono- o policiclici; con acidi arilalifatici; con acidi arilici; con acidi eterociclici; dove detti acidi possono essere eventualmente sostituiti con C1-C5 alchili lineari o ramificati, alogeni, gruppi ossidrilici, amminici, nitro, metossi, ciano.
3. Derivati secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-2, dove i gruppi ossidrilici sono carbammoilati con isocianati alchilici; isocianati alchilarilici; isocianati arilici; dove detti isocianati sono eventualmente sostituiti, dove il residuo alchilico lineare o ramificato, saturo o insaturo è a 2-6 atomi di carbonio ed il residuo arilico è un residuo mono- o polinucleare, eventualmente sostituito con C1-C5 alchili lineari o ramificati, gruppi alo, nitro, ciano, metossi.
4. Derivati secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-3, dove i gruppi carbossilici sono esterificati con alcoli alifatici, aralifatici, arilici, cicloalifatici, eterociclici.
5. Derivati secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-4, dove i gruppi



ossidrilici sono esterificati o carbammoilati in quantità compresa tra 0.01% e 0.2% oppure in quantità compresa tra 70% e 100%.

6. Derivati secondo la rivendicazione 5, dove i gruppi ossidrilici sono esterificati o carbammoilati in quantità compresa tra 0.01% a 0.2% ed i gruppi carbossilici sono totalmente esterificati (100% grado di esterificazione).
7. Derivati secondo la rivendicazione 5, dove i gruppi ossidrilici sono esterificati o carbammoilati in quantità compresa tra 70% a 100% ed i gruppi carbossilici totalmente esterificati (100% grado di esterificazione).
8. Derivati secondo la rivendicazione 5, dove i gruppi ossidrilici sono esterificati o carbammoilati in quantità compresa tra 70% a 100% ed i gruppi carbossilici sono in forma di sale.
9. Processo per la preparazione dei derivati di ialuronano descritta in una qualsiasi delle rivendicazioni 1-8, che comprende i seguenti passaggi di reazione:
 - a) eventuale totale o parziale esterificazione dei gruppi carbossilici presenti sullo ialuronano;
 - b) esterificazione o carbammoilazione dei gruppi ossidrilici presenti sullo ialuronano;dove i passaggi a) e b) sono applicabili in qualsiasi ordine.
10. Uso dei derivati di ialuronano, dove i gruppi ossidrilici sono esterificati o carbammoilati in quantità compresa tra 0.01% a 100% , i gruppi carbossilici sono o totalmente o parzialmente esterificati con alcoli oppure sono in forma di sale, e la viscosità intrinseca è compresa tra 0.1



e 22dl/g, nella preparazione di fasi stazionarie cromatografiche.

11. Uso dei derivati secondo la rivendicazione 10, nella preparazione di fasi stazionarie chirali.
12. Uso dei derivati di ialuronano, dove i gruppi ossidrilici sono esterificati o carbammoilati in quantità compresa tra 0.01% a 100% ed i gruppi carbossilici sono o totalmente o parzialmente esterificati con alcoli oppure sono in forma di sale, nella preparazione di film, fibre, membrane, spugne, fili.
13. Uso dei derivati di ialuronano, dove i gruppi ossidrilici sono esterificati o carbammoilati in quantità compresa tra 0.01% a 100% ed i gruppi carbossilici sono o totalmente o parzialmente esterificati con alcoli oppure sono in forma di sale, nella preparazione di materiali plastici, materiali compositi, materiali per imballaggio, adesivi, vernici.
14. Fasi stazionarie chirali che comprendono derivati di ialuronano, dove i gruppi ossidrilici di detti derivati sono esterificati o carbammoilati in quantità compresa tra 0.01% a 100% ; i gruppi carbossilici di detti derivati sono o totalmente o parzialmente esterificati con alcoli oppure in forma di sale; e la viscosità intrinseca di detti derivati è compresa tra 0.1 e 22 dl/g.
15. Fasi stazionarie chirali secondo la rivendicazione 14, dove i gruppi ossidrilici dei derivati di ialuronano sono esterificati con acidi inorganici; con acidi alifatici lineari o ramificati, saturi o insaturi; con acidi cicloalifatici o alifatici cicloalifatici anche policiclici; con acidi arilalifatici; con acidi arilici; con acidi eterociclici; dove detti acidi possono essere eventualmente sostituiti con C1-C5 alchili lineari o

ramificati, alogeni, gruppi ossidrilici, amminici, nitro, metossi, ciano.



16. Fasi stazionarie chirali secondo una qualsiasi delle rivendicazione 14-15, dove i gruppi ossidrilici dei derivati di ialuronano sono carbammoilati con isocianati achilici; isocianati alchilarilici; isocianati arilici; dove detti isocianati sono eventualmente sostituiti con C1-C5 alchili lineari o ramificati, gruppi alo, nitro, ciano, metossi, dove il residuo alchilico lineare o ramificato, saturo o insaturo è a 2-6 atomi di carbonio ed il residuo arilico è un residuo mono- o polinucleare, eventualmente sostituito.
17. Fasi stazionarie chirali secondo una qualsiasi delle rivendicazione 14-16, dove i gruppi carbossilici dei derivati di ialuronano sono esterificati con alcoli alifatici, aralifatici, arilici, cicloalifatici, eterociclici.
18. Fasi stazionarie chirali secondo una qualsiasi delle rivendicazione 14-17, dove i gruppi ossidrilici dei derivati di ialuronano sono esterificati o carbammoilati in quantità compresa tra 0.01% e 0.2% oppure in quantità compresa tra 70% e 100%.
19. Fasi stazionarie chirali secondo la rivendicazione 18, dove i gruppi ossidrilici sono esterificati o carbammoilati in quantità compresa tra 0.01% a 0.2% ed i gruppi carbossilici sono totalmente esterificati (100% grado di esterificazione).
20. Fasi stazionarie chirali secondo la rivendicazione 18, dove i gruppi ossidrilici sono esterificati o carbammoilati in quantità compresa tra 70% a 100% ed i gruppi carbossilici totalmente esterificati (100% grado di esterificazione) o sono in forma di sale.
21. Uso delle fasi stazionarie descritte in una qualsiasi delle rivendicazioni



14-21, nella preparazione di isomeri ottici puri oppure di miscele di isomeri isomeri aventi un contenuto enantiomerico maggiore di quello della miscela racemica di partenza.

22. Uso delle fasi stazionarie descritte in una qualsiasi delle rivendicazioni 14-21, nella separazione preparativa o analitica di enantiomeri o miscele di racemi.

23. Uso delle fasi stazionarie secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 21-22, in cromatografia liquida, HPLC, SMB, SCFC.

Trieste, 04 giugno 2001

Società Cooperativa Centro Ricerche POLYtech arl

Dr. Alessandro Rastrelli

FIGURA 1

TS 2001 A 000013

