

(11) *Número de Publicação:* **PT 749446 E**

(51) *Classificação Internacional:* (Ed. 6)
C08B037/00 A

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) <i>Data de depósito:</i> 1995.03.13	(73) <i>Títular(es):</i> FIDIA ADVANCED BIOPOLYMERS S.R.L. VIA DE CARPENTIERI, 3 I-72100 BRINDISI IT
(30) <i>Prioridade:</i> 1994.03.11 IT PD940043	
(43) <i>Data de publicação do pedido:</i> 1996.12.27	(72) <i>Inventor(es):</i> ZEFFERINO RIGHETTO DAVIDE BELLINI IT IT
(45) <i>Data e BPI da concessão:</i> 1999.11.24	(74) <i>Mandatário(s):</i> PAULO VIEIRA BARRETO ARCO DA CONCEIÇÃO, 3 - 1º AND. 1100 LISBOA PT

(54) *Epígrafe:* ÉSTERES ALTAMENTE REACTIVOS DE CARBOXI-POLISSACÁRIDOS E NOVOS CARBOXI-POLISSACÁRIDOS DERIVADOS DESSES COMPOSTOS

(57) *Resumo:*

Resumo: A invenção refere-se a ésteres altamente reactivos de carboxi-polissacáridos e a novos carboxi-polissacáridos derivados desses compostos. A invenção também se refere a processos para a preparação desses compostos e a processos para a utilização desses compostos em produtos farmacêuticos e cosméticos.

DESCRIÇÃO

**ÉSTERES ALTAMENTE REACTIVOS DE CARBOXI-POLISSACÁRIDOS E NOVOS
CARBOXI-POLISSACÁRIDOS DERIVADOS DESSES COMPOSTOS**

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Âmbito da Invenção

A presente invenção está relacionada com ésteres activos de carboxi-polissacáridos e de derivados semi-sintéticos destes carboxi-polissacáridos, nos quais todas ou uma parte das funções carboxi dos polissacáridos está esterificada com álcoois das séries aromática, heterocíclica aromática ou N-hidroxilamina e, no caso dos ésteres activos parciais, as restantes funções carboxi estão salificadas com sais de amónio quaternário ou metais. A presente invenção está também relacionada com um método para a síntese dos referidos ésteres activos, partindo de carboxi-polissacáridos e dos seus derivados semi-sintéticos.

A presente invenção está também relacionada com a utilização destes ésteres activos como intermediários na síntese de carboxi-polissacáridos modificados e de derivados semi-sintéticos modificados de carboxi-polissacáridos, com os polissacáridos modificados e seus derivados semi-sintéticos modificados *per se* e com a utilização destes polissacáridos modificados e seus derivados semi-sintéticos para produzir artigos cirúrgicos e artigos ligados aos cuidados de saúde para uso nas áreas farmacêutica e biomédica.

Descrição da Técnica Relacionada

Há relatos na literatura de métodos para a síntese e aplicação de ésteres activos em aminoácidos que constituem intermediários estáveis para utilização na síntese de péptidos (ver Fields, C.B. and Noble, R.L. (1990) Int. J. Peptide Protein Res. 35:161-214; Atherton, E. and Sheppard, R.C. (1989) in Solid Phase Peptide Synthesis, A Practical Approach, IRL Press, Oxford; M. Bodansky (1984) in Principles of Peptide Synthesis, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg). Os referidos ésteres resultam numa maior reactividade do grupo carboxi em reacções de substituição nucleofílica, pois o grupo fortemente atractor de electrões ligado ao carbono carbonílico pode ser facilmente substituído por um nucleófilo (sulfureto, amina, hidroxilo alcoólico) para produzir tioésteres, amidas e ésteres em condições adequadas de reacção, isto é, solventes, temperatura, catalisadores, etc. Os ésteres de álcoois aromáticos, álcoois aromáticos substituídos, álcoois heterocíclicos aromáticos, álcoois heterocíclicos aromáticos substituídos e N-hidroxilaminas pertencem a esta classe de ésteres activos.

O Pedido de Patente Internacional WO-A-92/20349 refere composições biocompatíveis insolúveis em água. As composições do Pedido WO-A-92/20349 são preparadas por mistura, numa reacção "one-pot", de um polissacárido polianiónico, um agente activador, um agente modificador e um nucleófilo. As reacções do Pedido WO-A-92/20349 são efectuadas num único vaso reaccional e, devido às condições reaccionais usadas, não é possível isolar quaisquer intermediários.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção disponibiliza um novo método para produzir ésteres, amidas e tioésteres de carboxi-polissacáridos, através da formação de intermediários éster activos e da subsequente substituição nucleofílica nas funções carboxilo dos polissacáridos.

Além de serem utilizados como produtos intermediários estáveis e facilmente armazenados, devido a reacções subseqüentes de substituição nucleofílica, os ésteres activos de carboxi-polissacáridos e dos seus derivados semi-sintéticos podem ser usados como intermediários reaccionais para a preparação de kits de diagnóstico, como superfícies para a activação de proteínas.

O método de produção baseia-se, principalmente, em revestimento de plasma aplicado entre a superfície polimérica do suporte, por exemplo, poliestireno, e o polissacárido activado, com a formação de ligações estáveis.

De acordo com o uso de diagnóstico pretendido, a superfície cuja base é um polissacárido activado é tratada com um polipéptido ou uma proteína que se liga ao polissacárido através de uma reacção de substituição nucleofílica. O material tratado pode, assim, ser usado (a) para identificar alvos bioquímicos como anticorpos ou outros polipéptidos compatíveis com as moléculas ligadas ao ácido hialurónico, por espectrofotometria ou métodos imunológicos (ELISA) e (b) para revestir equipamento de laboratório e caixas de Petri para o crescimento e regeneração de células e tecidos.

Por exemplo, as características hidrofílicas típicas do ácido hialurónico, em associação com suportes poliméricos adequados, tornam os ésteres activos, possuindo graus variáveis de substituição, úteis na área biomédica para qualquer utilização que exija o bloqueamento, na

superfície do suporte, de proteínas ou péptidos que têm depois que ser detectados e quantificados por espectrofotometria ou métodos imunoenzimáticos.

As amidas do ácido hialurónico são úteis para dois fins distintos:

a) a libertação lenta e controlada de ácido hialurónico natural em resultado da maior estabilidade da ligação amida relativamente à ligação éster; e

b) a libertação controlada do grupo substituinte cuja actividade biológica depende da sua natureza.

Os carboxi-polissacáridos e os seus derivados semi-sintéticos utilizados na presente invenção são todos conhecidos e estão descritos, por exemplo, nas Patentes U.S. 4,851,521; 5,122,598; 5,300,493; 5,332,809 e 5,336,668; no Pedido de Patente Europeia N.º 93917681.4; nas EP 0 216 453; EP 0 251 905; EP 0 342 557; EP 0 518 710; EP 0 603 264 e EP 0 605 478; e nas WO 93/06136 e WO 94/03499. Entre estes compostos estão glicosaminoglicanos, o ácido alginico, o gelano, a carboximetilcelulose, a carboximetilquitina e a carboximetilamida. De importância particular entre os glicosaminoglicanos é o ácido hialurónico. Dos derivados semi-sintéticos de polissacáridos, os sais destes compostos, especialmente os sais de amónio quaternário, são particularmente importantes. Outros derivados semi-sintéticos importantes, que são úteis na presente invenção, são os esteres parciais de carboxi-polissacáridos com álcoois alifáticos, arilalifáticos, heterocíclicos e cicloalifáticos.

Os métodos de síntese e as aplicações de sais de amónio quaternário, em particular, sais de tetrabutylamónio, e ésteres de carboxi-polissacáridos com álcoois alifáticos, arilalifáticos, heterocíclicos e cicloalifáticos estão descritos nas patentes referidas acima.

A estabilidade e a versatilidade dos ésteres activos de carboxi-polissacáridos da presente invenção tornam estes compostos úteis na síntese de uma variedade de polissacáridos modificados, em particular, de derivados amida destes polissacáridos. Entre estes derivados de polissacáridos, aqueles obtidos por reacção de ésteres activos com aminas primárias, aminoácidos, péptidos e proteínas são particularmente importantes.

Concordantemente, é um objectivo da presente invenção disponibilizar um éster activo de um carboxi-polissacárido ou de um derivado semi-sintético de um carboxi-polissacárido, no qual todos ou parte dos grupos carboxi destes compostos estão esterificados com um álcool seleccionado entre o grupo que consiste num álcool aromático, num álcool aromático substituído, num álcool heterocíclico aromático, num álcool heterocíclico aromático substituído, numa N-hidroxilamina e em combinações destes compostos; no qual quando só uma parte dos grupos carboxi do referido carboxi-polissacárido ou do referido derivado semi-sintético do referido carboxi-polissacárido está esterificada, os restantes grupos carboxi estão salificados com um membro seleccionado entre o grupo que consiste num sal de amónio quaternário, num metal alcalino, num metal alcalino-terroso e numa combinação destes compostos.

Outro objectivo da presente invenção é disponibilizar um processo para produzir um éster activo como descrito acima, compreendendo a reacção de um sal de tetralquilamónio de um carboxi-polissacárido ou de um derivado semi-sintético de um carboxi-polissacárido com um derivado reactivo de um álcool que se liga aos grupos carboxilo desses compostos, num solvente aprótico, a uma temperatura entre cerca de 0 e 60°C.

Outro objectivo da presente invenção é o uso destes ésteres activos para a preparação de um carboxi-polissacárido modificado ou de um derivado semi-sintético modificado de um carboxi-polissacárido, no qual o referido carboxi-polissacárido modificado ou o referido derivado semi-sintético modificado de um carboxi-polissacárido é um éster, um tioéster ou uma amida.

Outro objectivo da presente invenção é um carboxi-polissacárido modificado ou um derivado semi-sintético modificado de um carboxi-polissacárido preparado a partir destes ésteres activos.

Ainda outro objectivo da presente invenção é o uso destes ésteres activos, polissacáridos modificados e derivados semi-sintéticos modificados destes polissacáridos nas áreas biomédica e farmacêutica para preparar, por exemplo, artigos cosméticos, artigos ligados aos cuidados de saúde, artigos cirúrgicos e kits de diagnóstico.

O alcance adicional da aplicabilidade da presente invenção tornar-se-á claro a partir da descrição detalhada proporcionada abaixo. Deve entender-se, contudo, que a descrição detalhada e os exemplos específicos que se seguem, embora indiquem formas de realização preferidas da presente invenção, são fornecidos só com o fim de ilustração, uma vez que várias variações e modificações no espírito e âmbito da presente invenção se tornarão claras para os peritos a partir desta descrição detalhada.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A seguinte descrição detalhada da presente invenção é disponibilizada para ajudar os peritos a praticar a mesma. Ainda assim, a descrição detalhada que se segue não deve ser entendida como limitando indevidamente a presente invenção, uma vez que podem ser feitas modificações e variações pelos peritos nas formas de realização aqui descritas, sem um afastamento do espírito ou âmbito da presente descoberta inventiva.

O conteúdo de cada uma das referências discutida nesta descrição é aqui incorporado por meio de referência na sua totalidade.

Álcoois Úteis na Preparação de Ésteres Activos de Carboxi-Polissacáridos

Os ésteres activos de carboxi-polissacáridos e seus derivados semi-sintéticos da presente invenção são aqueles ésteres de álcoois do tipo aromático, aromático substituído, heterocíclico aromático, heterocíclico aromático substituído e N-hidroxilamina.

Estes álcoois incluem, mas não estão limitados ao:

pentafluorofenol,
pentaclorofenol,
triclorofenol,
p-nitrofenol,
2,4-dinitrofenol,
2-hidroxipiridina,
3-hidroxipiridina,
3,4-dihidro-4-oxobenzotriazina-3-ol,
4-hidroxi-2,5-difenil-3 (2H) -tiofenona-1,1-dióxido,
3-fenil-1-(p-nitrofenil)-2-pirazolina-5-ona,

3-metil-1-(p-nitrofenil)-2-pirazolina-5-ona,
N-hidroxisuccínimida e
N-hidroxiftalimida.

Ésteres

Os ésteres mais interessantes que podem ser obtidos incluem o éster p-nitrofenílico, o éster pentafluorofenílico, o éster 4-dihidro-4-oxobenzotriazina-3-ílico e o éster N-succínimidílico.

Os ésteres activos podem ser totais, isto é, todas as funções carboxi do polissacárido são utilizadas na formação do éster activo, ou parciais, isto é, só parte das funções carboxi estão envolvidas na formação do éster activo.

No caso dos ésteres activos parciais, as funções carboxi que não estão envolvidas na formação do éster activo estão sob a forma de um sal, em particular, o sal de tetrabutylamónio. A formação de ésteres activos de derivados semi-sintéticos de carboxi-polissacáridos envolve a reacção nos grupos carboxilo que não estão já covalentemente ligados no composto.

Carboxi-Polissacáridos

Os carboxi-polissacáridos que podem ser utilizados como substratos para a síntese de ésteres activos são aqueles já conhecidos e descritos, incluindo polissacáridos naturais de origem animal ou vegetal e derivados semi-sintéticos destes compostos. Os carboxi-polissacáridos particularmente úteis incluem, mas não estão limitados, aos glicosaminoglicanos, por exemplo, o ácido hialurónico, assim como ao ácido algínico, ao gelano, à carboximetilcelulose, à carboximetilquitina e à carboximetilamida.

Dos derivados semi-sintéticos, os sais de carboxi-polissacáridos, em particular os sais de amónio quaternário como os sais de tetralquilamónio, por exemplo, o sal de tetrabutylamónio, são preferidos.

Como reagentes iniciais carboxi-polissacáridos semi-sintéticos, também é possível utilizar ésteres parciais dos referidos polissacáridos, em particular, ésteres de álcoois das séries alifática, arilalifática, cicloalifática e heterocíclica. Destes, os ésteres parciais de álcoois

alifáticos possuindo entre 2 e 34 átomos de carbono, em particular, o etanol, e ésteres parciais de álcoois da série arilalifática, em particular, o álcool benzílico, são preferidos. Os ésteres parciais do ácido hialurónico conhecidos como HYAFF, descritos nas Patentes U.S. 4,851,521; 4,965,353 e 5,202,431, são exemplos típicos destes ésteres parciais.

Surpreendentemente, os ésteres activos de carboxi-polissacáridos e seus derivados semi-sintéticos têm sido obtidos sem quaisquer reacções secundárias indesejadas como seja a formação de pontes intra- e inter-cadeias, que conduz ao fenómeno conhecido por autoreticulação.

Condições Reaccionais

A reacção de formação dos ésteres activos partindo de carboxi-polissacáridos ou de derivados semi-sintéticos destes compostos, nos quais todas ou parte das funções carboxi está salificada com um sal de tetralquilamónio, ocorre através de uma cinética de primeira ordem.

A activação dos resíduos carbonilo é conseguida por métodos estequiométricos clássicos, e a percentagem de éster activo formado depende da quantidade (em mEq) de álcool ou N-hidroxilamina adicionados ao sal de tetrabutylamónio do carboxi-polissacárido. A temperatura não parece ser um factor determinante significativo no rendimento da esterificação.

A reacção é conduzida por adição do reagente de esterificação a uma solução do carboxi-polissacárido, que está sob a forma de um sal de tetralquilamónio, por exemplo, tetrabutylamónio, ou a uma solução do éster parcial do carboxi-polissacárido, caso em que as restantes funções carboxi estão sob a forma de sais de tetralquilamónio, por exemplo, tetrabutylamónio, num solvente aprótico como o dimetilsulfóxido, a N-metilpirrolidona ou a N,N'-dimetilformamida. A temperatura de reacção pode estar no intervalo entre cerca de 0°C e 60°C, preferencialmente, entre cerca de 25°C e 40°C, dependendo do reagente usado.

Derivados Reactivos

Os derivados reactivos que podem ser usados para a síntese dos ésteres activos são trifluoroacetatos de arilo como o trifluoroacetato de p-nitrofenilo e o trifluoroacetato de

pentafluorofenilo; fosfitos de arilo; sulfitos de arilo como o sulfito de di-pentafluorofenilo; carbonatos como o carbonato de di-(N-succínimido) e o 4,6-difeniltieno-[3,4-d]-1,3-dioxol-2-ona 5,5-dióxido (carbonato TDO ou reagente de Steglich).

Novos Derivados de Carboxi-Polissacáridos Derivados de Ésteres Activos

Os ésteres activos de carboxi-polissacáridos resultantes podem ser utilizados vantajosamente na síntese de novos derivados de carboxi-polissacaridos, uma vez que estes ésteres activos exibem uma reactividade elevada em reacções de substituição nucleofílica nos carbonos carbonílicos de grupos carboxílicos activados.

Nucleófilos

Os nucleófilos que podem ser utilizados nessas reacções incluem, mas não estão limitados a, aminas primárias, aminoácidos, péptidos, proteínas, mercaptanas e álcoois.

As aminas primárias úteis incluem as aminas alifáticas, as aminas arilalifáticas e os derivados substituídos das referidas aminas como aminas alifáticas contendo cadeias alquila substituídas com átomos de halogénios, em particular, perfluoroaminas.

Entre as aminas primárias úteis estão a etilamina, a n-propilamina, a isopropilamina, a N-butilamina, a N-heptilamina, a benzilamina, o N-etil-aminobenzeno, a benzedrina, a benzocaína e a N-pentilamina.

Os aminoácidos que podem ser usados incluem todos os aminoácidos conhecidos, e o mesmo é verdadeiro para os péptidos e proteínas.

Entre os aminoácidos que podem ser particularmente mencionados estão a fenilalanina, a glicina, a serina, a leucina, o triptofano, o ácido aspártico, a arginina e o éster benzílico da serina.

Entre os polipéptidos estão o Phe-Val-Glu-Tyr-Leu, o Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Tyr, o Gly-Arg-Gly-Asp-Val-Tyr e o Gly-Arg-Gly-Glu-Ser-Tyr.

Entre as proteínas estão a albumina e a calcitonina.

Entre as mercaptanas estão o tioetano, o tiofurano, o tiofenol, o tioanisol, o tioglicerol e a 5-tioglucoose.

Os álcoois úteis incluem aqueles referidos nas Patentes U.S. 4,851,521; 4,965,353 e 5,202,431. Estas patentes também referem outras aminas primárias, aminoácidos, péptidos, proteínas e mercaptanas úteis na presente invenção.

As propriedades extremamente úteis dos ésteres activos de carboxi-polissacáridos e seus derivados semi-sintéticos incluem a sua reactividade e selectividade elevadas em relação a aminas, comparativamente com aquelas manifestadas face a álcoois e mercaptanas, em reacções de substituição nucleofílica. Isto conduz a uma diminuição significativa de reacções secundárias indesejáveis na síntese de novos polissacáridos modificados, que ocorrem, por exemplo, quando agentes de condensação como a diciclohexilcarbodiimida, o N-hidroxi-benzotriazol, etc., são utilizados ou devido à presença de grupos funcionais como os grupos amino ou hidroxilo, por exemplo.

Os novos polissacáridos modificados produzidos a partir dos ésteres activos da presente invenção podem ser usados na preparação de artigos cirúrgicos e artigos ligados aos cuidados de saúde, para uso interno ou externo, como microcápsulas, microesferas, fios, filmes, gazes, esponjas, etc., como descrito nas Patentes U.S. 4,851,521, 4,965,353 e 5,202,431. Estes podem ser vantajosamente utilizados nas áreas biomédica e farmacêutica como, por exemplo, nas áreas de tratamento de feridas, recuperação e reparação de tecidos, prevenção da aderência de tecidos e em sistemas de libertação controlada para substâncias biologicamente activas como aminoácidos, péptidos e proteínas.

Embora os Exemplos apresentados abaixo descrevam a formação de vários derivados do ácido hialurónico, os mesmos métodos podem ser utilizados com os outros carboxi-polissacáridos da presente invenção como o ácido algínico, o gelano, a carboximetilcelulose, a carboximetilquitina, a carboximetilamida, etc.

Exemplo 1

Preparação de um éster pentafluorofenílico parcial do sal de tetrabutylamónio do ácido hialurónico – 5% dos grupos carboxi estão envolvidos na formação do éster activo – 95% dos grupos carboxi estão sob a forma de sal de tetrabutylamónio

Solubilizam-se 6,2 grama do sal de tetrabutylamónio do ácido hialurónico com um peso molecular de 180 000 Daltons, correspondendo a 10 mEq de uma unidade monomérica, em 310 ml de N-metilpirrolidona, a 25°C. Agita-se esta solução enquanto se adicionam 0,040 ml de piridina (0,5 mEq), seguidos de 0,088 ml de trifluoroacetato de pentafluorofenilo (0,5 mEq). Agita-se a mistura reaccional a 25°C, durante 1 hora, após o que se precipita o produto por adição de 2 litros de acetato de etilo. Filtra-se o precipitado, lava-se duas vezes com 500 ml de acetato de etilo e, em seguida, seca-se sob vácuo durante 24 horas, a 30°C.

Obtêm-se, assim, 6,15 grama de produto com o título desejado. A análise quantitativa da percentagem de esterificação foi efectuada por cromatografia gasosa, para determinar o teor em pentafluorofenol após hidrólise alcalina do éster.

Exemplo 2

Preparação de um éster pentafluorofenílico parcial do sal de tetrabutylamónio do ácido hialurónico – 10% dos grupos carboxi estão envolvidos na formação do éster activo – 90% dos grupos carboxi estão sob a forma de sal de tetrabutylamónio

Solubilizam-se 6,2 grama do sal de tetrabutylamónio do ácido hialurónico com um peso molecular de 160 000 Daltons, correspondendo a 10 mEq de uma unidade monomérica, em 310 ml de N-metilpirrolidona, a 25°C. Agita-se esta solução enquanto se adicionam 0,080 ml de piridina (1 mEq), seguidos de 0,176 ml de trifluoroacetato de pentafluorofenilo (1 mEq). Agita-se a mistura reaccional a 25°C, durante 1 hora, após o que se precipita o produto por adição de 2 litros de acetato de etilo. Filtra-se o precipitado, lava-se duas vezes com 500 ml de acetato de etilo e, em seguida, seca-se sob vácuo durante 24 horas, a 30°C.

Obtêm-se, assim, 6,12 grama de produto com o título desejado. A análise quantitativa da percentagem de esterificação foi efectuada por cromatografia gasosa, para determinar o teor em pentafluorofenol após hidrólise alcalina do éster.

Exemplo 3

Preparação de um éster pentafluorofenílico parcial do sal de tetrabutilamónio do ácido hialurónico – 25% dos grupos carboxi estão envolvidos na formação do éster activo – 75% dos grupos carboxi estão sob a forma de sal de tetrabutilamónio

Solubilizam-se 6,2 grama do sal de tetrabutilamónio do ácido hialurónico com um peso molecular de 120 000 Daltons, correspondendo a 10 mEq de uma unidade monomérica, em 310 ml de N-metilpirrolidona, a 25°C. Agita-se esta solução enquanto se adicionam 0,200 ml de piridina (2,5 mEq) e, em seguida, 0,440 ml de trifluoroacetato de pentafluorofenilo (2,5 mEq). Agita-se a mistura reaccional a 25°C, durante 1 hora, após o que se precipita o produto por adição de 2 litros de acetato de etilo. Filtra-se o precipitado, lava-se duas vezes com 500 ml de acetato de etilo e, em seguida, seca-se sob vácuo durante 24 horas, a 30°C.

Obtêm-se, assim, 6,01 grama de produto com o título desejado. A análise quantitativa da percentagem de esterificação foi efectuada por cromatografia gasosa, para determinar o teor em pentafluorofenol após hidrólise alcalina do éster.

Exemplo 4

Preparação de um éster pentafluorofenílico parcial do sal de tetrabutilamónio do ácido hialurónico – 50% dos grupos carboxi estão envolvidos na formação do éster activo – 50% dos grupos carboxi estão sob a forma de sal de tetrabutilamónio

Solubilizam-se 6,2 grama do sal de tetrabutilamónio do ácido hialurónico com um peso molecular de 80 000 Daltons, correspondendo a 10 mEq de uma unidade monomérica, em 310 ml de N-metilpirrolidona, a 25°C. Agita-se esta solução enquanto se adicionam 0,400 ml de piridina (5 mEq) e, depois, 0,880 ml de trifluoroacetato de pentafluorofenilo (5 mEq). Agita-se a mistura reaccional a 25°C, durante 1 hora, após o que se precipita o produto por adição de 2 litros de acetato de etilo. Filtra-se o precipitado, lava-se duas vezes com 500 ml de acetato de etilo e, em seguida, seca-se sob vácuo durante 24 horas, a 30°C.

Obtêm-se, assim, 5,82 grama de produto com o título desejado. A análise quantitativa da percentagem de esterificação foi efectuada por cromatografia gasosa, para determinar o teor em pentafluorofenol após hidrólise alcalina do éster.

Exemplo 5

Preparação de um éster pentafluorofenílico parcial do sal de tetrabutilamónio do ácido hialurónico – 75% dos grupos carboxi estão envolvidos na formação do éster activo – 25% dos grupos carboxi estão sob a forma de sal de tetrabutilamónio

Solubilizam-se 6,2 grama do sal de tetrabutilamónio do ácido hialurónico com um peso molecular de 400 000 Daltons, correspondendo a 10 mEq de uma unidade monomérica, em 310 ml de N-metilpirrolidona, a 25°C. Agita-se esta solução enquanto se adicionam 0,600 ml de piridina (7,5 mEq) e, depois, 1,32 ml de trifluoroacetato de pentafluorofenilo (7,5 mEq). Agita-se a mistura reaccional a 25°C, durante 1 hora, após o que se precipita o produto por adição de 2 litros de acetato de etilo. Filtra-se o precipitado, lava-se duas vezes com 500 ml de acetato de etilo e, em seguida, seca-se sob vácuo durante 24 horas, a 30°C.

Obtêm-se, assim, 5,62 grama de produto com o título desejado. A análise quantitativa da percentagem de esterificação foi efectuada por cromatografia gasosa, para determinar o teor em pentafluorofenol após hidrólise alcalina do éster.

Exemplo 6

Preparação do éster pentafluorofenílico total do ácido hialurónico – 100% dos grupos carboxi estão envolvidos na formação do éster activo

Solubilizam-se 6,2 grama do sal de tetrabutilamónio do ácido hialurónico com um peso molecular de 180 000 Daltons, correspondendo a 10 mEq de uma unidade monomérica, em 310 ml de N-metilpirrolidona, a 25°C. Agita-se esta solução enquanto se adicionam 0,800 ml de piridina (10 mEq) e, depois, 1,760 ml de trifluoroacetato de pentafluorofenilo (10 mEq). Agita-se a mistura reaccional a 25°C, durante 1 hora, após o que se precipita o produto por adição de 2 litros de acetato de etilo. Filtra-se o precipitado, lava-se duas vezes com 500 ml de acetato de etilo e, em seguida, seca-se sob vácuo durante 24 horas, a 30°C.

Obtêm-se, assim, 5,44 grama de produto com o título desejado. A análise quantitativa da percentagem de esterificação foi efectuada por cromatografia gasosa, para determinar o teor em pentafluorofenol após hidrólise alcalina do éster.

Exemplo 7

Preparação de um éster 4-nitrofenílico parcial do sal de tetrabutílamónio do ácido hialurónico
– 25% dos grupos carboxi estão envolvidos na formação do éster activo – 75% dos grupos
carboxi estão sob a forma de sal de tetrabutílamónio

Solubilizam-se 6,2 grama do sal de tetrabutílamónio do ácido hialurónico com um peso molecular de 120 000 Daltons, correspondendo a 10 mEq de uma unidade monomérica, em 310 ml de dimetilsulfóxido, a 25°C. Agita-se esta solução enquanto se adicionam 0,200 ml de piridina (2,5 mEq) e, depois, 0,59 ml de trifluoroacetato de 4-nitrofenilo solubilizados em 1 ml de dimetilsulfóxido (2,5 mEq). Agita-se a mistura reaccional a 25°C, durante 1 hora, após o que se precipita o produto por adição de 2 litros de acetato de etilo. Filtra-se o precipitado, lava-se duas vezes com 500 ml de acetato de etilo e, em seguida, seca-se sob vácuo durante 24 horas, a 30°C.

Obtêm-se, assim, 5,8 grama de produto com o título desejado. A análise quantitativa da percentagem de esterificação foi efectuada por cromatografia líquida, para determinar o teor em 4-nitrofenol após hidrólise alcalina do éster.

Exemplo 8

Preparação de um éster parcial do sal de tetrabutílamónio do ácido hialurónico com 4-hidroxi-
2,5-difenil-3 (2H) –tiofenona-1,1-dióxido – 50% dos grupos carboxi estão envolvidos na
formação do éster activo – 50% dos grupos carboxi estão sob a forma de sal de
tetrabutílamónio

Solubilizam-se 6,2 grama do sal de tetrabutílamónio do ácido hialurónico com um peso molecular de 800 000 Daltons, correspondendo a 10 mEq de uma unidade monomérica, em 310 ml de N-metilsulfóxido, a 25°C. Agita-se esta solução enquanto se adicionam 1,63 grama de 4,6-difeniltieno- [3,4-d] -1,3-dioxol-2-ona 5,5-dióxido (reagente de Steglich) solubilizados em 5 ml de dimetilsulfóxido (5 mEq). Agita-se a mistura reaccional a 25°C, durante 30 minutos, após o que se precipita o produto por adição de 2 litros de acetato de etilo. Filtra-se o precipitado, lava-se duas vezes com 500 ml de acetato de etilo e, em seguida, seca-se sob vácuo durante 24 horas, a 30°C.

Obtêm-se, assim, 6,39 grama de produto com o título desejado. A análise quantitativa da percentagem de esterificação foi efectuada por cromatografia líquida, para determinar o teor em 4-hidroxi-2,5-difenil-3 (2H) –tiofenona-1,1-dióxido após hidrólise alcalina do éster.

Exemplo 9

Preparação de um éster pentafluorofenílico parcial do sal de tetrabutylamónio do ácido algínico – 20% dos grupos carboxi estão envolvidos na formação do éster activo – 80% dos grupos carboxi estão sob a forma de sal de tetrabutylamónio

Solubilizam-se 4,17 grama do sal de tetrabutylamónio do ácido algínico com um peso molecular de 100 000 Daltons, correspondendo a 10 mEq de uma unidade monomérica, em 210 ml de N-metilpirrolidona, a 25°C. Agita-se esta solução enquanto se adicionam 0,160 ml de piridina (2 mEq) e, depois, 0,352 ml de trifluoroacetato de pentafluorofenilo (2 mEq). Agita-se a mistura reaccional a 25°C, durante 1 hora, após o que se precipita o produto por adição de 2 litros de acetato de etilo. Filtra-se o precipitado, lava-se duas vezes com 500 ml de acetato de etilo e, em seguida, seca-se sob vácuo durante 24 horas, a 30°C.

Obtêm-se, assim, 4,04 grama de produto com o título desejado. A análise quantitativa da percentagem de esterificação foi efectuada por cromatografia gasosa, para determinar o teor em pentafluorofenol após hidrólise alcalina do éster.

Exemplo 10

Preparação de um éster pentafluorofenílico parcial do sal de tetrabutylamónio de HYAFF 7p50 (50% de éster etílico do ácido hialurónico) – 25% dos grupos carboxi estão envolvidos na formação do éster activo – 50% dos grupos carboxi estão esterificados com etanol – 25% dos grupos carboxi estão sob a forma de sal de tetrabutylamónio

Solubilizam-se 5,2 grama do sal de tetrabutylamónio de HYAFF 7p50 com um peso molecular de 170 000 Daltons, correspondendo a 10 mEq de uma unidade monomérica, em 260 ml de N-metilpirrolidona, a 25°C. Agita-se esta solução enquanto se adicionam 0,200 ml de piridina (2,5 mEq) e, em seguida, 0,440 ml de trifluoroacetato de pentafluorofenilo (2,5 mEq). Agita-se a mistura reaccional a 25°C, durante 1 hora, após o que se precipita o produto por adição de

2 litros de acetato de etilo. Filtra-se o precipitado, lava-se duas vezes com 500 ml de acetato de etilo e, em seguida, seca-se sob vácuo durante 24 horas, a 30°C.

Obtêm-se, assim, 5 grama de produto com o título desejado. A análise quantitativa da percentagem de esterificação foi efectuada por cromatografia gasosa, para determinar o teor em pentafluorofenol após hidrólise alcalina do éster.

Exemplo 11

Preparação de um éster pentafluorofenílico do sal de tetrabutylamónio de HYAFF 11p75 (75% de éster benzílico do ácido hialurónico) – 25% dos grupos carboxi estão envolvidos na formação do éster activo – 75% dos grupos carboxi estão esterificados com álcool benzílico

Solubilizam-se 5,07 grama do sal de tetrabutylamónio de HYAFF 11p75 com um peso molecular de 120 000 Daltons, correspondendo a 10 mEq de uma unidade monomérica, em 260 ml de N-metilpirrolidona, a 25°C. Agita-se esta solução enquanto se adicionam 0,200 ml de piridina (2,5 mEq) e, em seguida, 0,440 ml de trifluoroacetato de pentafluorofenilo (2,5 mEq). Agita-se a mistura reaccional a 25°C, durante 1 hora, após o que se precipita o produto por adição de 2 litros de acetato de etilo. Filtra-se o precipitado, lava-se duas vezes com 500 ml de acetato de etilo e, em seguida, seca-se sob vácuo durante 24 horas, a 30°C.

Obtêm-se, assim, 4,8 grama de produto com o título desejado. A análise quantitativa da percentagem de esterificação foi efectuada por cromatografia gasosa, para determinar o teor em pentafluorofenol após hidrólise alcalina do éster.

Exemplo 12

Preparação da N-etilamida parcial do sal de sódio do ácido hialurónico – 10% das funções carboxi estão transformadas em N-etilamidas– 90% das funções carboxi estão salificadas com sódio

Solubilizam-se 6,13 grama do éster activo obtido de acordo com o Exemplo 2, correspondendo a 10 mEq de uma unidade monomérica, em 305 ml de N-metilpirrolidona, a 25°C. Agita-se esta solução enquanto se adicionam 66 µl de etilamina (1 mEq). Agita-se a mistura reaccional durante 2 horas, após o que se adicionam 100 ml de uma solução a 2% de cloreto de sódio em água desionizada. A adição de 800 ml de acetona a esta mistura reaccional provoca a formação de um precipitado que é filtrado e lavado três vezes com 100 ml de acetona/água 5:1, três vezes com 100 ml de acetona e, finalmente, é seco sob vácuo durante 24 horas, a 30°C.

Obtêm-se, assim, 4,0 grama do produto desejado. A análise quantitativa dos grupos amida foi efectuada para se determinar o teor em etilamina após hidrólise alcalina.

Exemplo 13

Preparação da N-benzilamida parcial do sal de sódio do ácido hialurónico – 50% das funções carboxi estão transformadas em N-benzilamidas – 50% das funções carboxi estão salificadas com sódio

Solubilizam-se 5,83 grama do éster activo obtido de acordo com o Exemplo 4, correspondendo a 10 mEq de uma unidade monomérica, em 290 ml de N-metilpirrolidona, a 25°C. Agita-se esta solução enquanto se adicionam 5,46 ml de benzilamina (5 mEq). Agita-se a mistura reaccional durante 2 horas, após o que se adicionam 100 ml de uma solução a 2% de cloreto de sódio em água desionizada. A adição de 800 ml de acetona a esta mistura reaccional provoca a formação de um precipitado, que é filtrado e lavado três vezes com 100 ml de acetona/água 5:1, três vezes com 100 ml de acetona e, finalmente, é seco sob vácuo durante 24 horas, a 30°C.

Obtêm-se, assim, 4,3 grama de produto desejado. A análise quantitativa dos grupos amida foi efectuada para se determinar o teor em benzilamina após hidrólise alcalina.

Exemplo 14

Síntese de um derivado amida do ácido hialurónico com arginina – 100% das funções carboxi estão transformadas em amidas do ácido hialurónico com arginina

Solubilizam-se 5,45 grama do éster activo obtido de acordo com o Exemplo 6, correspondendo a 10 mEq de uma unidade monomérica, em 270 ml de N-metilpirrolidona, a 25°C. Agita-se esta solução enquanto se adicionam 1,74 g de D-arginina (10 mEq) solubilizados em 10 ml de N-metilpirrolidona. Agita-se esta solução durante 2 horas, após o que se adicionam 800 ml de acetona. Isto provoca a formação de um precipitado que é filtrado, lavado três vezes com 100 ml de acetona e, em seguida, seco sob vácuo durante 24 horas, a 30°C.

Obtêm-se, assim, 5,35 grama do produto desejado. A análise quantitativa dos grupos amida é efectuada para se determinar o teor em arginina após hidrólise ácida em ácido clorídrico 6 N (análise de aminoácidos).

Exemplo 15

Preparação de um derivado do HYAFF 7p50 (50% de éster etílico do ácido hialurónico) contendo um péptido com a sequência H-Arg-Gly-Asp-OH – 50% das funções carboxi estão esterificadas com etanol – 25% das funções carboxi estão transformadas em amidas do ácido hialurónico com o péptido – 25% das funções carboxi estão salificadas com sódio

O tripéptido conhecido por RGD (arginina-glicina-ácido aspártico) é a sequência mínima identificável pela célula em muitas proteínas do plasma adesivo e da matriz extracelular. Por exemplo, a sequência tripeptídica RGD foi encontrada na vitronectina, na fibronectina, no factor de von Willebrand, no fibrinogénio e nos colagénios, e foi demonstrado que este tripéptido desempenha um papel crucial na mediação da ligação celular e da subsequente proliferação celular.

Os péptidos contendo RGD são, assim, de interesse para o desenvolvimento de novos biomateriais que possam melhorar a ligação e o crescimento celulares endoteliais a longo-prazo.

Solubilizam-se 4,95 grama do éster activo obtido de acordo com o Exemplo 10, correspondendo a 10 mEq de uma unidade monomérica, em 250 ml de N-metilpirrolidona, a 25°C. Agita-se esta solução enquanto se adicionam 1,08 g de um péptido possuindo a sequência H-Arg-Gly-Asp-OH (2,5 mEq) solubilizados em 10 ml de N-metilpirrolidona. Agita-se esta solução durante 2 horas, após o que se adicionam 100 ml de uma solução a 2% de cloreto de sódio em água desionizada. A adição de 800 ml de acetona a esta mistura reaccional provoca a formação de um precipitado que é filtrado, lavado três vezes com 100 ml de acetona/água 5:1, três vezes com 100 ml de acetona e, em seguida, é seco sob vácuo durante 24 horas, a 30°C.

Obtêm-se, assim, 4,8 grama do produto desejado. A determinação quantitativa dos grupos amida é efectuada analisando o teor em aminoácidos.

Exemplo 16

Preparação de um derivado do HYAFF 11p75 (75% de éster benzílico do ácido hialurónico) contendo um péptido com a sequência H-Gly-Pro-Arg-OH – 75% das funções carboxi estão esterificadas com álcool benzílico – 25% das funções carboxi estão transformadas em amidas do ácido hialurónico com o péptido

Solubilizam-se 4,8 grama do éster activo obtido de acordo com o Exemplo 11, correspondendo a 10 mEq de uma unidade monomérica, em 240 ml de N-metilpirrolidona, a 25°C. Agita-se esta solução enquanto se adicionam 0,82 g do péptido possuindo a sequência H-Gly-Pro-Arg-OH (2,5 mEq) solubilizados em 5 ml de N-metilpirrolidona. Agita-se esta solução durante 2 horas, após o que se adicionam 100 ml de uma solução a 2% de cloreto de sódio em água desionizada. A adição de 800 ml de acetona a esta mistura reaccional provoca a formação de um precipitado que é filtrado, lavado três vezes com 100 ml de acetona/água 5:1, três vezes com 100 ml de acetona e, em seguida, é seco sob vácuo durante 24 horas, a 30°C.

Obtêm-se, assim, 5,2 grama do produto desejado. A determinação quantitativa dos grupos amida é efectuada analisando o teor em aminoácidos.

Exemplo 17

Preparação de um material esponjoso feito com o HYAFF 7p50 (50% de éster etílico do ácido hialurónico) contendo um péptido possuindo a sequência H-Arg-Gly-Asp-OH

Solubilizam-se 4 grama do derivado do HYAFF 7p50 contendo um péptido possuindo a sequência H-Arg-Gly-Asp-OH (descrito no Exemplo 15) em 120 ml de dimetilsulfóxido. Filtra-se a solução e verte-se num prato de metal de 3 x 4 cm. O prato é colocado num ambiente controlado a 25°C, saturado com vapor de água, o qual actua como um coagulante. Obtém-se, assim, uma placa gelatinosa que é cortada em pedaços medindo 1 x 1 cm.

Estes pedaços são imersos em 2 litros de uma solução aquosa a 5% de NaCl. Este material é seco por congelação, produzindo um material esponjoso que é, em seguida, lavado três vezes com 1 litro de água destilada para eliminar o cloreto de sódio nele incorporado.

Obtêm-se, assim, pedaços de material esponjoso medindo 0,9 x 0,9 cm e 4 mm de espessura.

Exemplo 18

Preparação de microesferas produzidas a partir de HYAFF 11p75 (75% de éster benzílico do ácido hialurónico) contendo um péptido possuindo a sequência H-Gly-Pro-Arg-OH, descrito no Exemplo 16

Solubiliza-se o derivado de HYAFF 11p75 contendo o péptido possuindo a sequência H-Gly-Pro-Arg-OH, descrito no Exemplo 16, em 50 ml de dimetilsulfóxido, numa concentração de 7% (p/v). Separadamente, preparam-se 800 ml de uma mistura de óleo mineral altamente viscoso contendo ARLACEL, um agente tensioactivo não iónico, numa concentração de 1% (p/v). Agita-se a última mistura enquanto se adiciona a solução contendo o derivado do HYAFF 11p75-péptido. Forma-se uma emulsão à qual se adicionam 2,5 litros de acetato de etilo. O acetato de etilo mistura-se com a fase de emulsão, mas o derivado peptídico é insolúvel nele. A suspensão assim obtida é filtrada, e as microesferas resultantes são lavadas com 6 litros de N-hexano. O tamanho médio de partícula das microesferas é 15 µm.

Exemplo 19

Preparação da N-propilamida parcial do sal de sódio do ácido hialurónico – 50% das funções carboxi estão transformadas em N-propilamida– 50% das funções carboxi estão salificadas com sódio

Solubilizam-se 5,83 grama do éster activo obtido como no Exemplo 4, correspondendo a 10 mEq de uma unidade monomérica, em 290 ml de N-metilpirrolidona, a 25°C. A esta solução adicionam-se, enquanto se agita, 0,41 ml de N-propilamina (5 mEq). Agita-se a mistura durante 2 horas e, em seguida, adicionam-se 100 ml de uma solução a 2% de cloreto de sódio em água desionizada. A adição a esta mistura reaccional de 800 ml de acetona provoca a formação de um precipitado que é filtrado, lavado três vezes com 100 ml de acetona e, em seguida, seco sob vácuo durante 24 horas, a 30°C.

Obtêm-se, assim, 4,2 grama do produto desejado. A determinação quantitativa dos grupos amida é efectuada analisando o teor em N-propilamina após hidrólise alcalina.

Exemplo 20

Preparação de um derivado amida do ácido hialurónico com glicina – 50% das funções carboxi estão transformadas em glicinamidas – 50% das funções carboxi estão salificadas com sódio

Solubilizam-se 5,83 grama do éster activo obtido como no Exemplo 4, correspondendo a 10 mEq de uma unidade monomérica, em 290 ml de N-metilpirrolidona, a 25°C. A esta solução adicionam-se, com agitação, 0,375 grama de glicina. Agita-se a mistura durante 2 horas e, em seguida, adicionam-se 100 ml de uma solução a 2% de cloreto de sódio em água desionizada. A adição a esta mistura reaccional de 800 ml de acetona provoca a formação de um precipitado que é filtrado, lavado três vezes com 100 ml de acetona e, em seguida, seco sob vácuo durante 24 horas, a 30°C.

Obtêm-se, assim, 4,3 grama do produto desejado. A determinação quantitativa dos grupos amida é efectuada analisando o teor em glicina após hidrólise ácida em ácido clorídrico 6 N (análise de aminoácidos).

Exemplo 21

Preparação de um derivado amida do ácido hialurónico com lisina – 100% das funções carboxi estão transformadas em amidas do ácido hialurónico com lisina

Solubilizam-se 5,45 grama do éster activo obtido como no Exemplo 6, correspondendo a 10 mEq de uma unidade monomérica, em 270 ml de N-metilpirrolidona, a 25°C. A esta solução adicionam-se, com agitação, 1,46 grama de lisina. Agita-se a mistura durante 2 horas e, em seguida, adicionam-se 100 ml de uma solução a 2% de cloreto de sódio em água desionizada. A adição a esta mistura reaccional de 800 ml de acetona provoca a formação de um precipitado que é filtrado, lavado três vezes com 100 ml de acetona e, em seguida, seco sob vácuo durante 24 horas, a 30°C.

Obtêm-se, assim, 5,0 grama do produto desejado. A determinação quantitativa dos grupos amida é efectuada analisando o teor em lisina após hidrólise ácida em ácido clorídrico 6 N (análise de aminoácidos).

Exemplo 22

Preparação de um derivado amida do ácido hialurónico com o éster benzílico de serina – 10% das funções carboxi estão transformadas em amidas do ácido hialurónico com o éster benzílico da serina– 90% das funções carboxi estão salificadas com sódio

Solubilizam-se 6,13 grama do éster activo obtido como no Exemplo 2, correspondendo a 10 mEq de uma unidade monomérica, em 305 ml de N-metilpirrolidona, a 25°C. A esta solução adicionam-se, com agitação, 0,194 grama do éster benzílico de serina. Agita-se a mistura durante 2 horas e, em seguida, adicionam-se 100 ml de uma solução a 2% de cloreto de sódio em água desionizada. A adição a esta mistura reaccional de 800 ml de acetona provoca a formação de um precipitado que é filtrado, lavado três vezes com 100 ml de acetona e, em seguida, seco sob vácuo durante 24 horas, a 30°C.

Obtêm-se, assim, 4,5 grama do produto desejado. A determinação quantitativa dos grupos amida é efectuada analisando o teor em serina após hidrólise ácida em ácido clorídrico 6 N (análise de aminoácidos).

Exemplo 23

Síntese de um derivado peptídico do ácido hialurónico contendo um péptido possuindo a sequência Phe-Val-Glu-Tyr-Leu – 50% das funções carboxi estão transformadas em amidas do ácido hialurónico com o péptido– 50% das funções carboxi estão salificadas com sódio

Solubilizam-se 5,83 grama do éster activo obtido como no Exemplo 2, correspondendo a 10 mEq de uma unidade monomérica, em 290 ml de N-metilpirrolidona, a 25°C. A esta solução adicionam-se, com agitação, 3,46 grama de um péptido possuindo a sequência Phe-Val-Glu-Tyr-Leu (5 mEq) solubilizados em 20 ml de N-metilpirrolidona. Agita-se a mistura durante 2 horas e, em seguida, adicionam-se 100 ml de uma solução a 2% de cloreto de sódio em água desionizada. A adição a esta mistura reaccional de 800 ml de acetona provoca a formação de um precipitado que é filtrado, lavado três vezes com 100 ml de acetona e, em seguida, seco sob vácuo durante 24 horas, a 30°C.

Obtêm-se, assim, 5,4 grama do produto desejado. A determinação quantitativa dos grupos amida é efectuada analisando o teor em aminoácidos após hidrólise ácida em ácido clorídrico 6 N (análise de aminoácidos).

Exemplo 24

Síntese de um derivado peptídico do HYAFF 11p75 contendo um péptido possuindo a sequência Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Tyr – 25% das funções carboxi estão transformadas em amidas do ácido hialurónico com o péptido– 75% das funções carboxi estão esterificadas com álcool benzílico

Solubilizam-se 4,8 grama do éster activo obtido como no Exemplo 11, correspondendo a 10 mEq de uma unidade monomérica, em 240 ml de N-metilpirrolidona, a 25°C. A esta solução adicionam-se, com agitação, 1,85 grama de um péptido possuindo a sequência Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Tyr (2,5 mEq) solubilizados em 10 ml de N-metilpirrolidona. Agita-se a mistura durante 2 horas e, em seguida, adicionam-se 100 ml de uma solução a 2% de cloreto de sódio em água desionizada. A adição a esta mistura reaccional de 800 ml de acetona provoca a formação de um precipitado que é filtrado, lavado três vezes com 100 ml de acetona e, em seguida, seco sob vácuo durante 24 horas, a 30°C.

Obtêm-se, assim, 5,0 grama do produto desejado. A determinação quantitativa dos grupos amida é efectuada analisando o teor em aminoácidos após hidrólise ácida em ácido clorídrico 6 N (análise de aminoácidos).

Exemplo 25

Síntese de um derivado peptídico do HYAFF 7p50 contendo um péptido possuindo a sequência Gly-Arg-Gly-Asp-Val-Tyr – 50% das funções carboxi estão transformadas em amidas do ácido hialurónico com o péptido – 50% das funções carboxi estão esterificadas com álcool etílico

Solubilizam-se 4,95 grama do éster activo obtido como no Exemplo 10, correspondendo a 10 mEq de uma unidade monomérica, em 250 ml de N-metilpirrolidona, a 25°C. A esta solução adicionam-se, com agitação, 3,765 grama de um péptido possuindo a sequência Gly-Arg-Gly-Asp-Val-Tyr (5 mEq) solubilizados em 20 ml de N-metilpirrolidona. Agita-se a mistura durante 2 horas e, em seguida, adicionam-se 100 ml de uma solução a 2% de cloreto de sódio em água desionizada. A adição a esta mistura reaccional de 800 ml de acetona provoca a formação de um precipitado que é filtrado, lavado três vezes com 100 ml de acetona e, em seguida, seco sob vácuo durante 24 horas, a 30°C.

Obtêm-se, assim, 5,1 grama do produto desejado. A determinação quantitativa dos grupos amida é efectuada analisando o teor em aminoácidos após hidrólise ácida em ácido clorídrico 6 N (análise de aminoácidos).

Exemplo 26

Preparação de um tioéster tiofurano parcial do sal de sódio do ácido hialurónico – 10% dos grupos carboxi estão envolvidos na formação do tioéster– 90% dos grupos carboxi estão salificados com sódio

Solubilizam-se 6,13 grama do éster activo obtido como no Exemplo 2, correspondendo a 10 mEq de uma unidade monomérica, em 305 ml de N-metilpirrolidona, a 25°C. A esta solução adicionam-se, com agitação, 79,4 ml de tiofurano. Agita-se a mistura durante 2 horas e, em seguida, adicionam-se 100 ml de uma solução a 2% de cloreto de sódio em água desionizada. A adição a esta mistura reaccional de 800 ml de acetona provoca a formação de

um precipitado que é filtrado, lavado três vezes com 100 ml de acetona e, em seguida, seco sob vácuo durante 24 horas, a 30°C.

Obtêm-se, assim, 6,3 grama do produto desejado. A determinação quantitativa dos grupos amida é efectuada analisando o teor em tiofurano após hidrólise básica.

Exemplo 27

Espônjas

Dissolve-se um grama da heptilamida do AH com um peso molecular de 200 kDa, na qual os grupos carboxi são utilizados na reacção de substituição, em 10 ml de dimetilsulfóxido. Homogeneiza-se a solução para formar uma mistura contendo 30 grama de NaCl, 1,3 grama de bicarbonato de sódio e 1 grama de ácido cítrico.

Uma vez a mistura final completamente homogeneizada, ela é passada entre dois cilindros colocados a uma distância apropriada um do outro e girando em direcções opostas. Obtém-se uma camada de material passando a mistura entre eles, num suporte de silicone. A camada é então cortada nas dimensões desejadas e o suporte de silicone removido. Lava-se muito bem a camada com água e seca-se. Ela pode, em seguida, ser esterilizada com raios gama.

Exemplo 28

Filmes

Prepara-se uma solução solubilizando a N-benzilamida do AH em dimetilsulfóxido, numa concentração de 180 mg/ml.

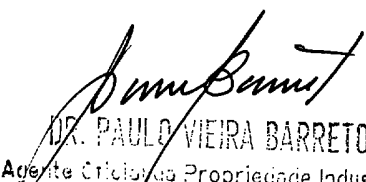
Através de um estratificador, espalha-se uma fina camada da solução numa lâmina de vidro; a espessura tem que ser 10 vezes superior à espessura final do filme. A lâmina de vidro é imersa em etanol, que absorve o dimetilsulfóxido, mas não solubiliza a N-benzilamida do AH, que se torna sólida. O filme é removido da lâmina de vidro, lavado repetidamente com etanol, em seguida, com água e, de novo, com etanol.

A lâmina resultante é seca numa prensa durante 48 horas, a 30°C.

Estando a invenção assim descrita, é óbvio que a mesma pode ser modificada de várias formas. Essas modificações não devem ser consideradas como afastamentos do espírito e âmbito da presente invenção e quaisquer modificações que pareçam óbvias para um perito devem ser consideradas como estando no âmbito das reivindicações que se seguem.

Lisboa, 18 FEV. 2000

Por FIDIA ADVANCED BIOPOLYMERS S.R.L.


DR. PAULO VIEIRA BARRETO
Agente Crisológico Propriedade Industrial
Arco da Conceição, 3 - 1º - 1100 LISBOA

REIVINDICAÇÕES

1. Éster activo de um carboxi-polissacárido ou de um derivado semi-sintético de um carboxi-polissacárido, no qual todos ou parte dos grupos carboxi desses compostos estão esterificados com um álcool seleccionado entre o grupo que consiste num álcool aromático, num álcool aromático substituído, num álcool heterocíclico aromático, num álcool heterocíclico aromático substituído, numa N-hidroxilamina e numa combinação destes compostos; no qual quando só parte dos grupos carboxi do referido carboxi-polissacárido ou do referido derivado semi-sintético do referido carboxi-polissacárido estão esterificados, os restantes grupos carboxi estão salificados com um membro seleccionado entre o grupo que consiste num sal de amónio quaternário, num metal alcalino, num metal alcalino-terroso e numa combinação destas espécies.
2. Éster activo de acordo com a reivindicação 1, no qual o referido álcool é um álcool aromático.
3. Éster activo de acordo com a reivindicação 2, no qual o referido álcool aromático é um álcool aromático substituído.
4. Éster activo de acordo com a reivindicação 3, no qual o referido álcool aromático substituído é seleccionado entre o grupo que consiste num álcool aromático fluoro-substituído, num álcool aromático cloro-substituído e num álcool aromático nitro-substituído.
5. Éster activo de acordo com a reivindicação 4, no qual o referido álcool aromático substituído é seleccionado entre o grupo que consiste no pentafluorofenol, pentaclorofenol, 4-nitrofenol e numa combinação destes compostos.
6. Éster activo de acordo com a reivindicação 1, no qual o referido álcool é um álcool heterocíclico aromático.
7. Éster activo de acordo com a reivindicação 6, no qual o referido álcool heterocíclico aromático é seleccionado entre o grupo que consiste num álcool benzotriazolina, num álcool tiofeno, num álcool hidroxipiridina, num álcool pirazolina e numa combinação destes compostos.

8. Éster activo de acordo com a reivindicação 6, no qual o referido álcool heterocíclico aromático é seleccionado entre o grupo que consiste na 2-hidroxipiridina, 3-hidroxipiridina, 3,4-dihidro-4-oxobenzotriazina-3-ol, 4-hidroxi-2,5-difenil-3(2H)tiofenona-1,1-dióxido, 3-fenil-1-(p-nitrofenil)-2-pirazolina-5-ona, 3-metil-1-(p-nitrofenil)-2-pirazolina-5-ona e numa combinação destes compostos.

9. Éster activo de acordo com a reivindicação 1, no qual o referido álcool é uma N-hidroxilamina.

10. Éster activo de acordo com a reivindicação 9, no qual a referida N-hidroxilamina é seleccionada entre o grupo que consiste na N-hidroxisuccínimida, N-hidroxiftalimida e numa combinação destes compostos.

11. Éster activo de acordo com a reivindicação 1, no qual o referido sal de amónio quaternário é um sal de tetralquilamónio.

12. Éster activo de acordo com a reivindicação 11, no qual o referido sal de tetralquilamónio é um sal de tetrabutylamónio.

13. Éster activo de acordo com a reivindicação 1, no qual o referido carboxi-polissacárido ou seu derivado semi-sintético é seleccionado entre o grupo que consiste num glicosaminoglicano, no ácido algínico, no gelano, na carboximetilcelulose, na carboximetilquitina e num éster parcial destes compostos.

14. Éster activo de acordo com a reivindicação 1, no qual o referido glicosaminoglicano é o ácido hialurónico.

15. Éster activo de acordo com a reivindicação 1, no qual o referido éster activo é sintetizado a partir de um sal de tetrabutylamónio seleccionado entre o grupo que consiste no sal de tetrabutylamónio de um glicosaminoglicano, no sal de tetrabutylamónio do ácido algínico, no sal de tetrabutylamónio do gelano, no sal de tetrabutylamónio da carboximetilcelulose e no sal de tetrabutylamónio da carboximetilquitina.

16. Éster activo de acordo com a reivindicação 1, no qual o referido derivado semi-sintético do referido carboxi-polissacárido é um éster parcial do referido carboxi-polissacárido.

17. Éster activo de acordo com a reivindicação 16, no qual o referido éster parcial é um éster de um álcool seleccionado entre o grupo que consiste num álcool alifático, num álcool arilalifático, num álcool cicloalifático, num álcool heterocíclico e numa combinação destes compostos.

18. Éster activo de acordo com a reivindicação 17, no qual o referido álcool alifático contém entre 2 e 34 átomos de carbono.

19. Éster activo de acordo com a reivindicação 17, no qual o referido éster parcial é um éster do álcool etílico.

20. Éster activo de acordo com a reivindicação 17, no qual o referido éster parcial é um éster de um álcool arilalifático.

21. Éster activo de acordo com a reivindicação 20, no qual o referido álcool arilalifático é o álcool benzílico.

22. Éster activo de acordo com a reivindicação 1, seleccionado entre o grupo que consiste num éster pentafluorofenílico do ácido hialurónico com 5% dos seus grupos carboxi envolvidos na formação do éster activo e no qual os restantes 95% grupos carboxi estão salificados com tetrabutylamónio; um éster pentafluorofenílico do ácido hialurónico com 10% dos seus grupos carboxi envolvidos na formação do éster activo e no qual os restantes 90% grupos carboxi estão salificados com tetrabutylamónio; um éster pentafluorofenílico do ácido hialurónico com 25% dos seus grupos carboxi envolvidos na formação do éster activo e no qual os restantes 75% grupos carboxi estão salificados com tetrabutylamónio; um éster pentafluorofenílico do ácido hialurónico com 50% dos seus grupos carboxi envolvidos na formação do éster activo e no qual os restantes 50% grupos carboxi estão salificados com tetrabutylamónio; um éster pentafluorofenílico do ácido hialurónico com 75% dos seus grupos carboxi envolvidos na formação do éster activo e no qual os restantes 25% grupos carboxi estão salificados com tetrabutylamónio; um éster pentafluorofenílico do ácido hialurónico com

100% dos seus grupos carboxi envolvidos na formação do éster activo; um éster 4-nitrofenílico do ácido hialurónico com 25% dos seus grupos carboxi envolvidos na formação do éster activo e no qual os restantes 75% grupos carboxi estão salificados com tetrabutilamónio; um éster 2,5-difenil-tiofeno-4-il-3(2H)-ona 1,1-dióxido do ácido hialurónico com 50% dos seus grupos carboxi envolvidos na formação do éster activo e no qual os restantes 50% grupos carboxi estão salificados com tetrabutilamónio; um éster pentafluorofenílico do ácido alginico com 20% dos seus grupos carboxi envolvidos na formação do éster activo e no qual os restantes 80% grupos carboxi estão salificados com tetrabutilamónio; um éster pentafluorofenílico do éster etílico do ácido hialurónico p50 com 25% dos seus grupos carboxi envolvidos na formação do éster activo e no qual 50% dos grupos carboxi estão esterificados com etanol e os restantes 25% grupos carboxi estão salificados com tetrabutilamónio; e um éster pentafluorofenílico do éster benzílico do ácido hialurónico p75 no qual 25% dos grupos carboxi estão envolvidos na formação do éster activo e os restantes 75% grupos carboxi estão esterificados com álcool benzílico.

23. Processo para produzir um éster activo de acordo com a reivindicação 1, que compreende a reacção de um sal de tetralquilamónio do referido carboxi-polissacárido ou do referido derivado semi-sintético do referido carboxi-polissacárido com um derivado reactivo de um álcool, que se liga aos grupos carboxilo desses compostos, num solvente aprótico, a uma temperatura entre 0 e 60°C.

24. Processo de acordo com a reivindicação 23, no qual o referido derivado reactivo de um álcool é seleccionado entre o grupo que consiste num trifluoroacetato, num carbonato, num oxalato, num sulfito e num fosfito do referido álcool.

25. Processo de acordo com a reivindicação 23, no qual o derivado reactivo de um álcool é um membro seleccionado entre o grupo que consiste no trifluoroacetato de 4-nitrofenilo, no trifluoroacetato de pentafluorofenilo, no sulfito de di-pentafluorofenilo, no carbonato de di-(N-succinimidilo) e no 4,6-difeniltieno[3,4-d]-1,3-dioxol-2-ona 5,5-dióxido.

26. Processo de acordo com a reivindicação 23, no qual o referido solvente aprótico é seleccionado entre o grupo que consiste no dimetilsulfóxido, na N-metilpirrolidona e na N,N-dimetilformamida.

27. Processo de acordo com a reivindicação 23, no qual o referido sal de tetralquilamónio é um sal de tetrabutylamónio.

28. Utilização do referido éster activo, de acordo com a reivindicação 1, para a preparação de um carboxi-polissacárido modificado ou de um derivado semi-sintético modificado de um carboxi-polissacárido.

29. Utilização do referido éster activo de acordo com a reivindicação 28, no qual o referido carboxi-polissacárido modificado ou o referido derivado semi-sintético modificado de um carboxi-polissacárido é um éster, um tioéster ou uma amida.

30. Utilização do referido éster activo de acordo com a reivindicação 29, no qual a referida amida é formada por reacção do referido éster activo do referido carboxi-polissacárido ou do referido derivado semi-sintético do referido carboxi-polissacárido com um membro seleccionado entre o grupo que consiste numa amina, num aminoácido, num péptido e numa proteína.

31. Uso do referido éster activo de acordo com a reivindicação 30, no qual a referida amina é seleccionada entre o grupo que consiste numa amina primária, numa amina alifática, numa amina arilalifática, numa amina alifática substituída e numa amina arilalifática substituída.

32. Uso do referido éster activo de acordo com a reivindicação 30, no qual o referido aminoácido, péptido ou proteína é biologicamente activo.

33. Utilização de um éster activo, de acordo com a reivindicação 1, para a preparação de um derivado amida do ácido hialurónico seleccionado entre o grupo que consiste em:

uma N-etilamida do ácido hialurónico com 10% dos seus grupos carboxi envolvidos na formação da amida e os restantes 90% dos seus grupos carboxi salificados com sódio;

uma N-benzilamida do ácido hialurónico com 50% dos seus grupos carboxi envolvidos na formação da amida e os restantes 50% dos seus grupos carboxi salificados com sódio.

um derivado amida do ácido hialurónico com arginina no qual 100% dos grupos carboxi estão envolvidos na formação da amida;

um derivado peptídico do éster etílico (50%) do ácido hialurónico com um inibidor peptídico da fracção da fibronectina possuindo a sequência H-Arg-Gly-Asp-OH, com 50% das suas funções carboxi esterificadas com etanol, 25% das suas funções carboxi envolvidas na formação da amida com o péptido e os restantes 25% das suas funções carboxi salificadas com sódio;

e

um derivado peptídico do éster benzílico do ácido hialurónico p75 com um inibidor peptídico da fibrinólise possuindo a sequência H-Gly-Pro-Arg-OH, com 75% das suas funções carboxi esterificadas com álcool benzílico e 25% das suas funções carboxi envolvidas na formação da amida com o péptido, compreendendo a reacção de um éster activo de um carboxi-polissacárido ou de um éster activo de um derivado semi-sintético de um carboxi-polissacárido com uma amina, um aminoácido, um péptido ou uma proteína, num solvente aprótico, a uma temperatura entre 0 e 60°C.

34. Utilização de um éster activo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-22, para a preparação de artigos úteis nas áreas biomédica e farmacêutica.

35. Utilização, de acordo com a reivindicação 34, para a preparação de artigos cosméticos, artigos ligados aos cuidados de saúde, artigos cirúrgicos e kits de diagnóstico.

36. Utilização, de acordo com a reivindicação 35, para preparar microcápsulas, microesferas, fios, filmes, gazes e esponjas.

37. Utilização, de acordo com qualquer uma das reivindicações 34-36, para a preparação de artigos úteis na reparação de tecidos.

38. Utilização, de acordo com qualquer uma das reivindicações 34-37, num sistema de libertação controlada para uma substância biológica ou farmacologicamente activa, no qual a referida substância é seleccionada entre o grupo que consiste num aminoácido, num péptido e numa proteína.

39. Utilização de um éster activo, de acordo com as reivindicações 34 a 38, incluindo a referida preparação a preparação de um derivado amida como definido na reivindicação 33.

Lisboa, 18 FEV. 2000

Por FIDIA ADVANCED BIOPOLYMERS S.R.L.


DR. PAULO VIEIRA BARRETO
Agente Oficial da Propriedade Industrial
Arco da Conceição, 3 - 1º - 1100 LISBOA

RESUMO

ÉSTERES ALTAMENTE REACTIVOS DE CARBOXI-POLISSACÁRIDOS E NOVOS CARBOXI-POLISSACÁRIDOS DERIVADOS DESSES COMPOSTOS

Disponibilizam-se ésteres activos de carboxi-polissacáridos e de derivados semi-sintéticos de carboxi-polissacáridos, nos quais todos ou parte dos seus grupos carboxi estão esterificados com um álcool aromático, um álcool aromático substituído, um álcool heterocíclico aromático, um álcool heterocíclico aromático substituído, uma N-hidroxilamina ou uma combinação destes compostos. É também disponibilizado um processo para produzir tais ésteres activos. Estes ésteres activos podem ser usados para a preparação de carboxi-polissacáridos modificados ou de derivados semi-sintéticos modificados desses carboxi-polissacáridos, na forma de ésteres, tioésteres ou amidas. Tais ésteres activos, polissacáridos modificados e derivados semi-sintéticos modificados de carboxi-polissacáridos podem ser usados nas áreas biomédica e farmacêutica para preparar, por exemplo, artigos cosméticos, artigos ligados aos cuidados de saúde, artigos cirúrgicos e kits de diagnóstico.