



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 329 731**

51 Int. Cl.:

C08B 37/08 (2006.01)

A61K 31/728 (2006.01)

A61K 8/73 (2006.01)

A61K 47/36 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07702514 .6**

96 Fecha de presentación : **02.03.2007**

97 Número de publicación de la solicitud: **1994062**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **26.11.2008**

54

Título: **Derivados de ácido hialurónico de aril/alquil vinil sulfona.**

30

Prioridad: **02.03.2006 DK 2006 00305**
03.03.2006 DK 2006 00312

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
30.11.2009

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
30.11.2009

73

Titular/es: **Novozymes Biopharma DK A/S**
Krogshøjvej 36
2880 Bagsvaerd, DK

72

Inventor/es: **Eenschooten, Corinne y**
Christensen, Morten, Würtz

74

Agente: **Tomás Gil, Tesifonte Enrique**

ES 2 329 731 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Derivados de ácido hialurónico de aril/alquil vinil sulfona.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a la modificación de ácido hialurónico (HA) con aril o alquilvinil sulfonas para producir derivados de HA con aril/alquil vinil sulfonas (AVS-HA), a los derivados AVS-HA como tales, a su producción, y a sus aplicaciones y usos, particularmente en la industria cosmética y biomédica.

10 **Antecedentes de la invención**

Los heteropolisacáridos más abundantes del cuerpo son los glicosaminoglicanos. Los glicosaminoglicanos son polímeros de carbohidratos de cadena recta, que consisten en unidades repetitivas de disacáridos (salvo el queratán sulfato que es ramificado en la región del núcleo de los carbohidratos). Las unidades de disacáridos generalmente comprenden, como una primera unidad de sacárido, uno de dos azúcares modificados - N-acetilgalactosamina (GalNAc) o N-acetilglucosamina (GlcNAc). La segunda unidad es normalmente un ácido urónico, tal como ácido glucurónico (GlcUA) o iduronato.

Los glicosaminoglicanos son moléculas cargadas negativamente, y tienen una conformación extendida que imparte alta viscosidad cuando está en solución. Los glicosaminoglicanos se encuentran principalmente en la superficie de las células o en la matriz extracelular. Los glicosaminoglicanos también tienen baja comprimibilidad en solución y, como resultado, son ideales como fluido de lubricación fisiológico, por ej., para las articulaciones. La rigidez de los glicosaminoglicanos proporciona integridad estructural a las células y proporciona vías de paso entre las células, permitiendo la migración celular. Los glicosaminoglicanos de mayor importancia fisiológica son hialuronano, condroitina sulfato, heparina, glucosaminida sulfato N-acetiltransferasa, dermatan sulfato, y queratan sulfato. La mayoría de los glicosaminoglicanos están unidos de manera covalente a una proteína central de proteoglicano a través de estructuras de oligosacárido específico. El hialuronano forma agregados grandes con determinados proteoglicanos, pero es una excepción ya que las cadenas de carbohidratos libres forman complejos no covalentes con proteoglicanos.

Se han identificados numerosas funciones del hialuronano en el cuerpo (véase, Laurent T. C. y Fraser J. R. E., 1992, FASEB J. 6: 2397-2404; y Toole B.P., 1991, "Proteoglycans and hyaluronan in morphogenesis and differentiation". En: Cell Biology of the Extracellular Matrix, pp. 305-341, Hay E. D., ed., Plenum, New York). El hialuronano está presente en el cartílago hialino, líquido sinovial, y tejido de la piel, tanto en la dermis como en la epidermis. También se cree que el hialuronano desarrolla un papel en numerosas funciones fisiológicas, tales como adhesión, desarrollo, motilidad celular, cáncer, angiogénesis, y cicatrización de heridas. Debido a las propiedades físicas y biológicas únicas del hialuronano, se emplea en cirugía ocular y de articulaciones y está siendo evaluado en otros procedimientos médicos.

Los términos "hialuronano" o "ácido hialurónico" son usados en la bibliografía para referirse a los polisacáridos ácidos con diferentes pesos moleculares constituidos por residuos de ácidos D-glucurónico y N-acetil-d-glucosamina, que ocurren naturalmente en las superficies de las células, en las sustancias básicas extracelulares del tejido conjuntivo de vertebrados, en el líquido sinovial de las articulaciones, en el humor vítreo, en el tejido del cordón umbilical humano y en las crestas de los gallos.

El término "ácido hialurónico" de hecho es normalmente usado para referirse a toda una serie de polisacáridos con residuos alternantes de ácidos D-glucurónico y N-acetil-d-glucosamina con pesos moleculares variables o incluso fracciones degradadas del mismo, y por lo tanto sería más correcto usar el término plural de "ácidos hialurónicos". El término singular, no obstante, será usado a pesar de todo en esta descripción; además se usará frecuentemente la abreviatura "HA" en lugar de este término colectivo.

El HA juega un papel importante en el organismo biológico como soporte mecánico para las células de muchos tejidos, tales como la piel, tendones, músculos y cartílago, es un componente principal de la matriz intercelular. el HA también forma parte importante en los procesos biológicos, tales como la hidratación de tejidos y lubricación.

El HA puede ser extraído de los tejidos naturales arriba mencionados, aunque hoy se prefiere prepararlo por métodos microbiológicos para minimizar el riesgo potencial de transferencia de agentes infecciosos, y para aumentar la uniformidad, calidad y disponibilidad del producto.

el HA y su varias fracciones de tamaño molecular y las sales derivadas respectivas han sido usados como medicamentos, especialmente en el tratamiento de artropatías, como agente auxiliar y/o sustituto de órganos y tejidos naturales, especialmente en oftalmología y cirugía cosmética, y como agentes en preparaciones cosméticas. También se han desarrollado productos de hialuronano para el uso en ortopedia, reumatología, y dermatología.

El HA puede también ser usado como un aditivo para varios materiales poliméricos usados para artículos sanitarios y quirúrgicos, tales como poliuretanos, poliésteres, etc. con el efecto de hacer estos materiales biocompatibles.

Resumen de la invención

La invención se refiere a la preparación de una generación nueva de ácido hialurónico derivado de reactivos monofuncionales de vinil sulfona.

Los reactivos monofuncionales de vinil sulfona tienen la fórmula general $(CH_2=CH-SO_2-R)$ donde R es un grupo arilo o alquilo que es preferible pero no necesariamente hidrofóbico. La reacción que produce la modificación se desarrolla entre el grupo vinilo reactivo del reactivo de sulfona y las fracciones de hidróxilo del ácido hialurónico.

La invención puede utilizarse para preparar una gama amplia de derivados dependiendo de la naturaleza del grupo R dependiente. Los compuestos comercialmente disponibles en el mercado incluyen metil-, etil-, fenil-, p-tolil-, octil- y otras alquil-/aril vinil sulfonas.

A diferencia de la divinil sulfona (DVS), los reactivos de R-vinil sulfona son monofuncionales evitando de ese modo cualquier reticulación del HA.

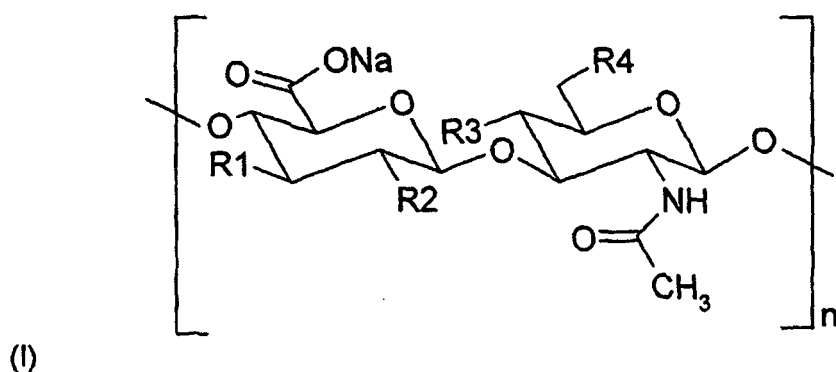
Los derivados resultantes, modificados con grupos hidrofóbicos, pueden encontrar aplicación en la industria de cosméticos como emulsionantes o en sistemas de administración avanzados, tales como nanocápsulas. También pueden ser usados para la hidratación de la piel a través de la formación de una película. Las propiedades de los derivados permiten la producción de biomaterias nuevas manteniendo al mismo tiempo la biocompatibilidad y biodegradabilidad del hialuronano original.

El método se basa en una química bien establecida (DVS ha sido usado desde hace más de 20 años para reticular HA) y tiene varias ventajas por ser un método muy versátil, el HA se usa como su sal sódica, esto puede hacerse como una "síntesis en una sola operación sintética", la reacción se desarrolla a temperatura ambiente, es un proceso simple y corto, y la purificación posterior puede hacerse muy eficazmente sin dejar residuos de reactivos de vinil sulfona.

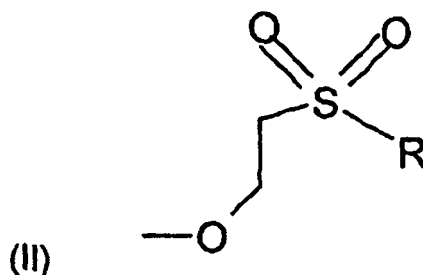
Hay una demanda, particularmente en la industria cosmética y biomédica, de compuestos a base de o derivados de ácido hialurónico que tengan determinadas características alteradas en comparación con el HA no modificado. Las propiedades de interés son la mejor capacidad de estabilizar espuma, y la capacidad para mezclar con materiales no hidrofílicos, tal como se usa normalmente en los productos cosméticos.

La invención proporciona productos amfifílicos derivados de HA con propiedades beneficiosas en aplicaciones cosméticas o biomédicas. Estos productos se unen más firmemente a la piel de modo que éstos no son fácilmente lavados. Los derivados AVS-HA son también adecuados para el uso en formulaciones cosméticas o biomédicas más avanzadas, por ej., en la formación de nano/macro cápsulas o nano/macro esferas para administrar compuestos activos o fármacos. Los derivados AVS-HA de peso molecular inferior (PM) penetran en la piel más eficazmente que los HA no derivados de PM comparable.

Por consiguiente, en un primer aspecto la invención se refiere a un derivado de ácido hialurónico comprendiendo n unidades repetitivas y teniendo la fórmula general estructural (I):



donde, en al menos una unidad de repetición, uno o más de R1, R2, R3, R4 comprende una aril/alquil sulfona unida a un éter que tiene la fórmula general estructural (II), donde R comprende un grupo alquilo o arilo, y por el contrario R1, R2, R3, R4 son grupos hidróxilo, OH:



En otras palabras, un aspecto de la invención se refiere a un derivado de ácido hialurónico, donde uno o más grupos hidróxilo del ácido hialurónico ha sido hecho reaccionar con uno o más compuestos monofuncionales alquil/aril vinyl sulfona, para formar un enlace de éter entre el ácido hialurónico y el uno o más compuestos de alquil/aril sulfona resultante.

En un segundo aspecto, la invención se refiere a un derivado de ácido hialurónico, donde se ha producido una reacción de adición entre uno o más grupos hidróxilo del ácido hialurónico y uno o más compuestos monofuncionales de aril-/alquil-vinil sulfona, para formar un enlace de éter entre el ácido hialurónico y el uno o más compuestos de aril/alquil sulfona resultante.

En un tercer aspecto, la invención se refiere a un proceso para producir un derivado de ácido hialurónico, el proceso incluyendo las etapas de:

- (a) hacer reaccionar un ácido hialurónico con uno o más compuestos de alquil-/aril-vinil sulfona teniendo la fórmula general estructural (III) bajo condiciones alcalinas en una solución acuosa, por la cual se forma el derivado de ácido hialurónico; y
- (b) recuperar el derivado de ácido hialurónico.

En un cuarto aspecto, la invención se refiere a una composición que comprende un derivado de ácido hialurónico tal y como se define en el primer o segundo aspecto, y una sustancia activa, preferiblemente la sustancia activa es un agente farmacológicamente activo.

Un quinto aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de un derivado de ácido hialurónico tal y como se define en el primer o segundo aspecto, junto con un soporte, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable.

Un sexto aspecto se refiere a una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de un derivado de ácido hialurónico tal y como se define en el primer o segundo aspecto como un vehículo, junto con un agente farmacológicamente activo.

Un séptimo aspecto se refiere a un artículo cosmético comprendiendo como sustancia activa una cantidad eficaz de un derivado de ácido hialurónico tal y como se define en el primer o segundo aspecto, o una composición tal y como se define en cualquiera del cuarto, quinto o sexto aspecto.

En un octavo aspecto, la invención se refiere a un artículo sanitario, médico o quirúrgico que comprende un derivado de ácido hialurónico tal y como se define en el primer o segundo aspecto, o una composición tal y como se define en cualquiera del cuarto, quinto, o sexto aspecto, preferiblemente el artículo siendo un pañal, una compresa, una esponja quirúrgica, una esponja para cicatrizar heridas, o una parte comprendida en una tirita u otro material de apósito.

Un aspecto importante se refiere a una cápsula o microcápsula de medicamento que comprende un derivado de ácido hialurónico tal y como se define en el primer o segundo aspecto, o una composición tal y como se define en cualquiera del cuarto, quinto, o sexto aspecto.

Los últimos aspectos de la invención se refieren a métodos para realizar procedimientos en oftalmología, en el tratamiento de osteoartritis o cáncer, pérdida de pelo o calvicie, de tratamiento de una herida, de realizar una administración dérmica o transdérmica de un agente farmacológicamente activo, o administración dérmica de un cosmético, la mejora que comprende el uso de un derivado de ácido hialurónico tal y como se define en el primer o segundo aspecto, o una composición tal y como se define en cualquiera del cuarto, quinto, o sexto aspecto.

Varios aspectos se refieren a usos de un derivado de ácido hialurónico tal y como se define en cualquiera del primer o segundo aspecto, o una composición tal y como se define en cualquiera del cuarto, quinto, o sexto aspecto, para la producción de un medicamento para el tratamiento de osteoartritis, cáncer, la producción de un medicamento para un tratamiento oftalmológico, la producción de un medicamento para el tratamiento de heridas, la producción de un medicamento para angiogénesis, la producción de un medicamento para el tratamiento de pérdida de pelo o calvicie, o la producción de una hidratante.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: espectro de RMN ^1H (HA, 300 kDa).

Figura 2: espectro de RMN ^1H , (PVS-HA de HA 300 kDa) Proporción de PVS:HA 1.5:1.

Figura 3: espectro de RMN ^1H , (PVS-HA de HA 300 kDa) Proporción de PVS:HA 1.5.

Figura 4: espectro de RMN ^1H (PVS-HA de HA 300 kDa) Proporción de PVS:HA 10:1

Figura 5: espectro IR, (PVS-HA de HA 300 kDa) Proporción de PVS:HA 10:1.

Figura 6: espectro de RMN ^1H , (EVS-HA de HA 300 kDa) Proporción de EVS:HA 1.5:1.

Descripción detallada de la invención

Ácido Hialurónico

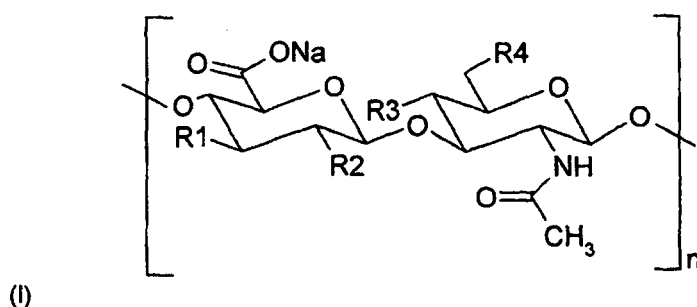
“Ácido hialurónico” es definido aquí como un glicosaminoglicano no sulfatado compuesto por unidades repetitivas de disacárido de N-acetilglucosamina (GlcNAc) y ácido glucurónico (GlcUA) unidas por enlaces beta-1,4 y beta-1,3 glicosídicos alternantes. El ácido hialurónico es también conocido como hialuronano, hialuronato, o HA. Los términos hialuronano y ácido hialurónico son usados de forma intercambiable aquí.

Las crestas de gallo son una fuente comercial significativa de hialuronano. Los microorganismos son una fuente alternativa. La patente U.S. n°. 4,801,539 expone un método de fermentación para preparar ácido hialurónico que implica una cepa de *Streptococcus zooepidemicus* con rendimientos proporcionados de aproximadamente 3,6 g de ácido hialurónico por litro. La Patente Europea no. EP0694616 expone procesos de fermentación usando una cepa mejorada de *Streptococcus zooepidemicus* con rendimientos proporcionados de aproximadamente 3,5 g de ácido hialurónico por litro. Como se describe en WO 03/054163 (Novozymes), que se incorpora aquí en su totalidad, el ácido hialurónico o sales derivadas pueden ser producidas por recombinación, por ej., en un huésped de *Bacillus* gram positivo.

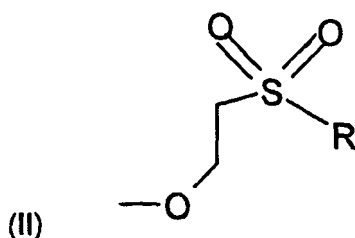
Las hialuronano sintasas de vertebrados, patógenos bacterianos y virus algales han sido descritas (DeAngelis, P. L., 1999, Cell. Mol. Life Sci. 56: 670-682). WO 99/23227 expone un Grupo I de hialuronato sintasa de *Streptococcus equisimilis*. WO 99/51265 y WO 00/27437 describen una hialuronato sintasa de Grupo II de *Pasturella multocida*. Ferretti *et al.* describen el operón de hialuronano sintasa de *Streptococcus pyogenes*, que está compuesto de tres genes, hasA, hasB, y hasC, que codifican hialuronato sintasa, UDP glucosa dehidrogenasa, y UDP-glucosa pirofosforilasa, respectivamente (Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 98, 4658-4663, 2001). WO 99/51265 describe un segmento de ácido nucleico que tiene una región de codificación para una hialuronano sintasa de *Streptococcus equisimilis*.

Como el hialuronano de una célula de *Bacillus* recombinante es expresada directamente al medio de cultivo, se puede usar un proceso simple para aislar el hialuronano del medio de cultivo. Primero, las células de *Bacillus* y detrito celular son físicamente eliminados del medio de cultivo. El medio de cultivo puede ser diluido primero, si se desea, para reducir la viscosidad del medio. Muchos métodos son conocidos por los expertos en la técnica para la eliminación de células del medio de cultivo, tal como centrifugado o microfiltración. Si se desea, el sobrenadante restante puede luego ser filtrado, tal como por ultrafiltración, para concentrar y eliminar contaminantes de moléculas pequeñas del hialuronano. Tras la eliminación de las células y detrito celular se realiza una precipitación simple del hialuronano del medio por mecanismos conocidos. Se puede usar sal, alcohol, o combinaciones de sal y alcohol para precipitar el hialuronano del filtrado. Una vez reducido a un precipitado, el hialuronano puede ser fácilmente aislado de la solución por medios físicos. El hialuronano puede ser secado o concentrado de la solución filtrada usando técnicas de evaporación conocidas en la técnica, tal como secado por pulverización.

El primer aspecto de la invención se refiere a un derivado de ácido hialurónico comprendiendo n unidades repetitivas y teniendo la fórmula general estructural (I):

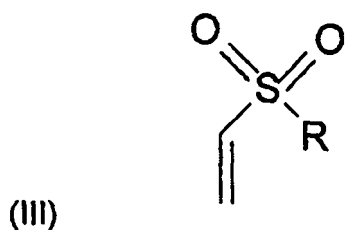


donde, en al menos una unidad repetitiva, uno o más de R1, R2, R3, R4 comprende una aril/alquil sulfona unida a un éter teniendo la fórmula general estructural (II), donde R comprende un grupo alquilo o arilo, y por el contrario R1, R2, R3, R4 son grupos hidróxilo, OH:



En otras palabras, un aspecto de la invención se refiere a un derivado de ácido hialurónico, donde se produce una reacción de adición entre uno o más grupos hidróxilo del ácido hialurónico y uno o más compuestos monofuncionales de aril-/alquil vinil sulfona, para formar un enlace de éter entre el ácido hialurónico y el uno o más compuestos de aril/alquil sulfona resultantes.

Una forma de realización preferida se refiere al derivado de ácido hialurónico de la invención, donde el uno o más compuestos monofuncionales de aril-/alquil-vinil sulfona tienen la fórmula general estructural (III), donde R comprende un grupo alquilo o arilo.



Aún otra forma de realización preferida se refiere al derivado de ácido hialurónico de la invención, donde dos o más de R1, R2, R3, R4 comprenden una o más aril/alquil sulfona unida a un éter teniendo la fórmula general estructural (II); o donde tres o más de R1, R2, R3, R4 comprenden uno o más aril/alquil sulfonas unidas a un éter teniendo la fórmula general estructural (II); o de hecho donde todos R1, R2, R3, R4 comprenden una o más aril/alquil sulfonas unidas a un éter teniendo la fórmula general estructural (II).

La reacción principal o sitio de adición en el proceso de la invención es el hidróxilo primario de la unidad repetitiva del ácido hialurónico, también mostrado como R4 en la fórmula estructural (I).

Por consiguiente, una forma de realización preferida se refiere al derivado de HA de la invención, donde al menos R4 comprende una aril/alquil sulfona unida a un éter teniendo la fórmula general estructural (II).

Se pueden concebir muchos grupos alquilo o arilo diferentes adecuados en los componentes monofuncionales de alquil-/aril-vinil sulfona para el uso en la presente invención.

ES 2 329 731 T3

Una forma de realización preferida se refiere al derivado de HA de la invención, donde R comprende un grupo alquilo, preferiblemente el grupo alquilo es hidrofóbico, preferiblemente el grupo alquilo comprende un grupo alquilo C₁-C₂₀, preferiblemente metilo, etilo, propilo, 2-octenilo, 2-nonenilo, 2-dodecenilo, 2-hexadecenilo o 2-octadecenilo.

- 5 Otra forma de realización preferida se refiere al derivado de HA de la invención, donde R comprende un grupo arilo, preferiblemente el grupo arilo es hidrofóbico, y más preferiblemente el grupo arilo es fenilo o p-toluido.

Peso Molecular

- 10 El nivel de ácido hialurónico puede ser determinado según el método de carbazol modificado (Bitter y Muir, 1962, Anal Biochem. 4: 330-334). Además, el peso molecular promedio del ácido hialurónico puede ser determinado usando métodos estándares en la técnica, tales como aquellos descrito por Ueno *et al.*, 1988, Chem. Pharm. Bull. 36, 4971-4975; Wyatt, 1993, Anal. Chim. Acta 272: 1-40; y Wyatt Technologies, 1999, "light Scattering University DAWN Course Manual" y "DAWN EOS Manual" Wyatt Technology Corporation, Santa Barbara, California.

- 15 En una forma de realización preferida, los derivados de ácido hialurónico obtenidos por los métodos de la presente invención tienen un peso molecular de aproximadamente 1,000 a aproximadamente 10,000,000 Da. En una forma de realización más preferida, los derivados de ácido hialurónico obtenidos por los métodos de la presente invención tienen un peso molecular de aproximadamente 5,000 a aproximadamente 5,000,000 Da. En una forma de realización aún más preferida, los derivados de ácido hialurónico obtenidos por los métodos de la presente invención tienen un peso molecular de aproximadamente 10,000 a aproximadamente 3,000,000 Da.

- 20 Otra forma de realización preferida se refiere al producto del primer aspecto, donde el ácido hialurónico o sal derivada tiene un peso molecular en el rango de entre 300,000 y 3,000,000; preferiblemente en el rango de entre 400,000 y 2,500,000; más preferiblemente en el rango de entre 500,000 y 2,000,000; y de la forma más preferible en el rango de entre 600,000 y 1,800,000 Da.

- 30 Cuando se usa ácido hialurónico o su sal producido por recombinación en los métodos de la invención para producir los productos o composiciones de la invención, puede ser ventajoso para algunas aplicaciones reducir primero el peso molecular promedio del ácido hialurónico o derivado o sal derivada. Por ejemplo, varios fabricantes han informado de las denominadas fracciones con bajo peso molecular del ácido hialurónico, que pueden penetrar la barrera de la piel para restablecer el contenido natural de ácido hialurónico en la piel, en consecuencia fracciones de este tipo son particularmente adecuadas para composiciones cosméticas vendidas como agentes antienvjecimiento de la piel y antiarrugas. Para aplicaciones alimenticias, se ha demostrado que el ácido hialurónico de bajo PM penetra la barrera gastrointestinal, aumentando de ese modo su biodisponibilidad. Finalmente, el ácido hialurónico de bajo PM exhibe un efecto antiinflamatorio y tiene aplicaciones potenciales en el tratamiento de enfermedades inflamatorias. Puede conseguirse una reducción del peso molecular promedio de un ácido hialurónico o derivado o sal derivada mediante métodos estándares en la técnica, tales como, tratamiento térmico simple, degradación enzimática, sonicación con ultrasonidos, o hidrólisis ácida. Véase, por ej., la patente estadounidense 6,020,484, que describe una técnica de tratamiento por ultrasonidos del HA incluyendo NaOCl como aditivo, y T. Miizaki *et al.* (2001) Degradación y Estabilidad de los Polímeros, 74: 77-85.

- 45 Por consiguiente, una forma de realización preferida se refiere al derivado de HA de la invención, donde el ácido hialurónico o derivado o sal derivada tiene un peso molecular promedio bajo en el rango de entre 10,000 y 3,000,000 Da; preferiblemente en el rango de entre 10,000 y 50,000 Da; o preferiblemente en el rango de entre 50,000 y 500,000 Da; incluso más preferiblemente en el rango de entre 80,000 y 300,000 Da.

Grado de sustitución (DS)

- 50 El DS fue determinado por espectroscopia de RMN ¹H (10 mg/ml, D₂O, 80°C, 128 scans, 400MHz) según el Ejemplo 6 abajo, donde los picos del Grupo OSA fueron asignados usando una RMN 2D(gCOSY). El DS fue luego calculado comparando la intensidad de los protones de vinilo de OSA (5.4 y 5.6 ppm) con aquello de los protones de acetilo (2.0 ppm).

- 55 En una forma de realización preferida el derivado de HA del primer aspecto tiene un Grado de Sustitución (DS) en el rango de 0.1-100%, preferiblemente 1-90%, más preferiblemente 2-80%, aún más preferiblemente 4-70%, incluso más preferiblemente 8-60%, o 10-50%, 14-40%, 16-30%, o de la forma más preferible en el rango de 18-25%.

60

Producción

- 65 En los métodos de la presente invención puede usarse HA producido por recombinación. Este tipo de HA puede ser producido por un proceso, donde las células huéspedes de producción de HA son cultivadas en un medio nutritivo adecuado para la producción del ácido hialurónico usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la célula puede ser cultivada por cultivo en matraz vibrante, fermentación a pequeña escala o a gran escala (incluyendo fermentaciones continuas, por lote, discontinuas o de estado sólido) en laboratorio o fermentadores industriales realizadas en

un medio adecuado y bajo condiciones que permitan que las enzimas implicadas en la síntesis de ácido hialurónico sean expresadas y aislar el ácido hialurónico. El cultivo se desarrolla en un medio nutritivo adecuado comprendiendo fuentes de nitrógeno y carbono y sales inorgánicas, usando procedimientos conocidos en la técnica. Los medios adecuados están disponibles en los proveedores comerciales o pueden ser preparados según composiciones publicadas (por ej., en catálogos de la American Type Culture Collection). El ácido hialurónico segregado puede ser recuperado directamente del medio.

El ácido hialurónico resultante puede ser aislado por métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, el ácido hialurónico puede ser aislado del medio nutritivo por procedimientos convencionales incluyendo, pero sin limitarse a centrifugado, filtración, extracción, secado por pulverización, evaporación, o precipitación. El ácido hialurónico aislado puede luego ser adicionalmente purificado por una variedad de procedimientos conocidos en la técnica incluyendo, pero sin limitarse a cromatografía (por ej., de intercambio iónico, de afinidad, hidrofóbica, cromatografía de exclusión por tamaño), procedimientos electroforéticos (por ej., isoelectroenfoque preparatorio), solubilidad diferencial (por ej., precipitación de sulfato amónico), o extracción (véase, por ej., purificación de proteínas, J.-C. Janson y Lars Ryden, editores, VCH Publishers, Nueva York, 1989).

Células huéspedes

Una forma de realización preferida se refiere a cuando el ácido hialurónico o sal derivada es producido por recombinación, preferiblemente por una bacteria gram positiva o célula huésped, más preferiblemente por una bacteria del género *Bacillus*.

La célula huésped puede ser cualquier célula de *Bacillus* adecuada para la producción recombinante de ácido hialurónico. La célula huésped de *Bacillus* puede ser una célula de *Bacillus* tipo salvaje o un mutante de la misma. Células de *Bacillus* útiles en la práctica de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, células de *Bacillus agaraderhensis*, *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus brevis*, *Bacillus circulans*, *Bacillus clausii*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus firmus*, *Bacillus lautus*, *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis*, y *Bacillus thuringiensis*. Las células de *Bacillus subtilis* mutante particularmente adaptadas para la expresión recombinante están descritas en WO 98/22598. Las células de *Bacillus* sin encapsulación son particularmente útiles en la presente invención.

En una forma de realización preferida, la célula huésped de *Bacillus* es una célula de *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus clausii*, *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus stearothermophilus* o *Bacillus subtilis*. En una forma de realización más preferida, la célula de *Bacillus* es una célula de *Bacillus amyloliquefaciens*. En otra forma de realización más preferida, la célula de *Bacillus* es una célula de *Bacillus clausii*. En otra forma de realización más preferida, la célula de *Bacillus* es una célula de *Bacillus lentus*. En otra forma de realización más preferida, la célula de *Bacillus* es una célula de *Bacillus licheniformis*. En otra forma de realización más preferida, la célula de *Bacillus* es una célula de *Bacillus subtilis*. En una forma de realización aún más preferida, la célula huésped de *Bacillus* es *Bacillus subtilis* A164Δ5 (véase patente U.S. n°. 5,891,701) o *Bacillus subtilis* 168Δ4.

La transformación de la célula huésped de *Bacillus* con un constructo de ácido nucleico de la presente invención puede, por ejemplo, ser efectuada por transformación del protoplasto (véase, por ej., Chang y Cohen, 1979, Genética molecular general 168: 111-115), usando células competentes (véase, por ej., Young y Spizizen, 1961, revista de Bacteriología 81: 823-829, o Dubnau y Davidoff-Abelson, 1971, Revista de Biología Molecular 56: 209-221), por electroporación (véase, por ej., Shigekawa y Dower, 1988, Biotécnicas 6: 742-751), o por conjugación (véase, por ej., Koenler y Thorne, 1987, Revista de Bacteriología 169: 5271-5278).

Proceso de derivación

En un tercer aspecto, la invención se refiere a un proceso para producir un derivado de ácido hialurónico, el proceso incluyendo las etapas de:

- (a) hacer reaccionar un ácido hialurónico con uno o más compuestos de alquil-/aril-vinil sulfona teniendo la fórmula general estructural (III) bajo condiciones alcalinas en una solución acuosa, por la cual el derivado de ácido hialurónico es formado; y
- (b) recuperar el derivado de ácido hialurónico.

Una forma de realización preferida se refiere al proceso del tercer aspecto, donde el grupo alquilo/arilo, R en (III), comprende un grupo alquilo, preferiblemente un grupo alquilo hidrofóbico, más preferiblemente el grupo alquilo comprende un grupo alquilo C₁-C₂₀, y de la forma más preferible el grupo alquilo comprende un metilo, etilo, propilo, 2-octenilo, 2-nonenilo, 2-dodecenilo, 2-hexadecenilo o 2-octadecenilo; o donde el grupo alquilo/arilo comprende un grupo arilo, preferiblemente un grupo arilo hidrofóbico, y más preferiblemente el grupo arilo comprende fenilo o p-toluido.

ES 2 329 731 T3

También se prefiere que diferentes compuestos monofuncionales de vinil sulfona puedan ser empleados al mismo tiempo, conduciendo a la adición de varios compuestos de alquil o aril sulfona diferentes a la molécula de HA.

Por consiguiente, una forma de realización preferida se refiere al proceso del tercer aspecto, donde el primero o más compuestos de alquil-/aril-vinil sulfona comprenden dos o más grupos alquilo y/o arilo diferentes. Preferiblemente, los dos o más grupos alquilo/arilo diferentes comprenden un grupo alquilo, preferiblemente un grupo alquilo hidrofóbico, más preferiblemente el grupo alquilo comprende un grupo alquilo C_1 - C_{20} , y de la forma más preferible el grupo alquilo comprende un metilo, etilo, propilo, 2-octenilo, 2 nonenilo, 2-dodecenilo, 2-hexadecenilo o 2-octadecenilo; o los dos o más grupos alquilo/arilo diferentes comprenden un grupo arilo, preferiblemente un grupo arilo hidrofóbico, y más preferiblemente el grupo arilo comprende fenilo o p-toluido.

Otros ingredientes

En una forma de realización preferida, las composiciones que comprenden un derivado de HA de la invención puede también comprender otros ingredientes, preferiblemente una o más sustancias activas, preferiblemente una o más sustancias farmacológicamente activas, y también preferiblemente un excipiente hidrosoluble, tal como lactosa.

Ejemplos no limitativos de una sustancia activa o sustancia farmacológicamente activa que puede ser usada en la presente invención incluyen fármacos a base de proteína y/o péptidos, tales como, hormona de crecimiento humano, hormona de crecimiento bovina, hormona de crecimiento porcina, hormona de crecimiento de liberación de hormonas/péptidos, factor de estimulación de colonias de granulocitos, factor de estimulación de colonias-macrófagos de granulocitos, factor de estimulación de colonias de macrófagos, eritropoyetina, proteína morfogénica de huesos, interferón o su derivado, insulina o su derivado, atriopeptina III, anticuerpo monoclonal, factor de necrosis tumoral, factor macrófago activante, interleuquina, factor de degeneración tumoral, factor de crecimiento de tipo insulina, factor de crecimiento epidérmico, activador del t-plasminógeno, factor IIV, factor IIIV y uroquinasa.

Un excipiente hidrosoluble puede ser incluido para estabilizar el (los) ingrediente(s) activo(s), tal excipiente puede incluir una proteína, por ej., albúmina o gelatina; un aminoácido, tal como glicina, alanina, ácido glutámico, arginina, lisina y una sal derivada; carbohidratos tales como glucosa, lactosa, xilosa, galactosa, fructosa, maltosa, sacarosa, dextrano, manitol, sorbitol, trehalosa y sulfato de condroitina; una sal inorgánica tal como fosfato; un tensioactivo tal como TWEEN® (ICI), polietilenoglicol, y una mezcla del mismo. El excipiente o estabilizador puede ser usado en una cantidad que varía de 0.001 a 99% en peso del producto.

Diferentes aspectos de la invención se refieren a varias composiciones y fármacos comprendiendo, entre otros ingredientes, una cantidad eficaz del producto tal y como se define en el primer aspecto, y una sustancia activa, preferiblemente la sustancia activa siendo un agente farmacológicamente activo; un soporte, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable, preferiblemente un excipiente hidrosoluble, y de la forma más preferible lactosa.

Además, aspectos de la invención se refieren a artículos que comprenden un derivado de HA tal y como se define en el primer aspecto o una composición tal y como se define en los aspectos y formas de realización sobre, por ej., un artículo cosmético, un artículo sanitario, un artículo médico o quirúrgico. En un último aspecto, la invención se refiere a una cápsula o microcápsula de medicamento que comprende un producto tal y como se define en el primer aspecto o una composición tal y como se define en otros aspectos y formas de realización de la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1

HA derivado con fenil vinil sulfona (PVS) (PVS-HA) con una relación de PVS:HA de 1.5:1

TABLA 1

Reactivos	PM (Da)	Eq. (-OH)	n (mmol)	m o V (mg o ml)
HA	300000	1	0.25	100 mg
NaOH	40	1	0.25	1.25 mL
PVS	168	1.5	0.375	63.10 mg

Se disolvió HA en agua milliQ (10 ml) durante toda la noche a temperatura ambiente. Se añadió NaOH a la solución acuosa de HA bajo agitación. Se disolvió PVS en acetona (10 ml) y la solución resultante fue añadida gota a gota después de 4-5 minutos usando un embudo de separación. La mezcla fue agitada durante toda la noche

ES 2 329 731 T3

a temperatura ambiente. La mezcla cruda fue luego purificada en una bolsa de diálisis (Spectra/Por®, corte 14 kDa) sumergida en agua milliQ (7.5 L). Se cambió el agua milliQ 3 veces, después de 3 horas, luego después de una noche y finalmente después de 3 horas. La diálisis fue vigilada midiendo la conductividad del agua milliQ y se detuvo cuando la conductividad fue menor de 5 μ ES/cm. El producto purificado fue finalmente diluido en agua milliQ (50 ml) y liofilizado.

La reacción dio un material blanco esponjoso de 94.5 mg, parcialmente soluble en agua milliQ. La composición del producto purificado fue analizada por TLC. Los valores de tiempo de retención mostraron que no quedó ningún residuo de PVS en el producto purificado. La estructura del producto purificado fue constatada por RMN ^1H y reveló un grado de sustitución (DS) del 11% por unidad de disacárido de repetición (figura 2). También se usó FT-IR para confirmar la formación de HA derivado de fenil vinyl sulfona.

Se realizó un estudio bajo la influencia de la cantidad de PVS implicada en la reacción. Este estudio mostró que cantidades más altas de PVS daban mayores grados de sustitución. Estos fueron normalmente entre 11% y 55% para relaciones de PVS:HA que variaban de 5:1 a 10:1 (Ejemplo 2).

Ejemplo 2

HA derivado con fenil vinyl sulfona (PVS) (PVS-HA) con una relación de PVS:HA de 5:1 y 10:1

TABLA 2

Reactivos	PM (Da)	Eq. (-OH)	n (mmol)	m o V (mg o ml)
HA	300 000	1	0.25	100 mg
NaOH	40	1	0.25	1.25 mL
PVS	168	5	1.25	210 mg
HA	300 000	1	0.25	100 mg
NaOH	40	1	0.25	1.25 mL
PVS	168	10	2.50	421 mg

Los derivados arriba fueron preparados según el método descrito en el Ejemplo 1. La relación NaOH:HA fue 1:1. El grado de sustitución de los derivados es mostrado en la tabla 3.

TABLA 3

Grado de sustitución de derivados PVS-HA con las relaciones PVS:HA 5:1 y 10:1

PVS:HA	DS
5:1	19%
10:1	55%

La figura 3 y la figura 4 representan los espectros de RMN de los derivados. La figura 5 representa un espectro de IR que confirma la inserción de PVS en cadenas de HA. La atribución de las bandas es presentada en la tabla 4.

ES 2 329 731 T3

TABLA 4

Número de ondas y naturaleza de las bandas adicionales observado en el espectro de PVA-HA en comparación con el espectro de HA (relación de PVS:HA 10:1)

Número de ondas (cm ⁻¹)	Modo de unión y absorción	Observaciones
1600	C=C extensión del anillo (1 ^a absorción)	La 1 ^a absorción es más probablemente merged en la banda observada para la extensión C=O (1620 cm ⁻¹)
1450	C=C extensión del anillo (2 ^a absorción)	Banda débil
1308	S=O extensión asimétrica	Banda fuerte
1150	S=O extensión asimétrica	Esta banda ya está presente en el espectro del HA (C-O-C extensión glicósido). Su intensidad ha crecido manifiestamente en el espectro del derivado)
730	C-H plegado fuera de plano	Este patrón de dos picos es típico de anillos monosustituídos
690		

Ejemplo 3

HA derivado con etil vinil sulfona (EVS) (EVS-HA) con una relación de EVS:HA de 1.5:1

TABLA 5

Reactivos	PM (Da)	Eq. (-OH ₂)	n (mmol)	m o V (mg o mL)
HA	300 000	1	0.25	100 mg
NaOH	40	1	0.25	1.25 mL
EVS	120	1.5	0.375	40 µg

El derivado EVS-HA fue preparado según el método descrito en el Ejemplo 1. La reacción dio un material blanco esponjoso, soluble en agua milliQ (12.5 g/l). La estructura del producto purificado fue constatada por RMN ¹H y reveló un grado de sustitución del 13.5% por unidad de disacárido repetitiva (figura 6). Éste fue calculado comparando la señal de protones de metilo en el sustituyente y aquella de protones de metilo en HA.

Documentos citados en la descripción

Esta lista de documentos citados por el solicitante ha sido recopilada exclusivamente para la información del lector y no forma parte del documento de patente europea. La misma ha sido confeccionada con la mayor diligencia; la OEP sin embargo no asume responsabilidad alguna por eventuales errores u omisiones.

Documentos de patente citados en la descripción

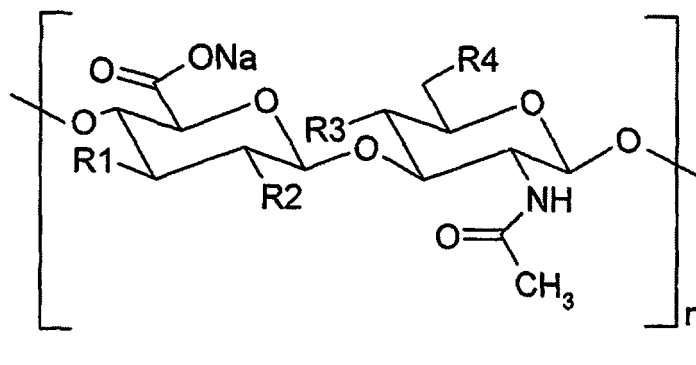
- US 4801539 A [0033]
- WO 0027437 A [0034]
- EP 0694616 A [0033]
- US 6020484 A [0048]
- WO 03054163 A [0033]
- WO 9822598 A [0055]
- WO 9923227 A [0034]
- US 5891701 A [0056]
- WO 9951265 A [0034] [0034]

Literatura no perteneciente a patentes citada en la descripción

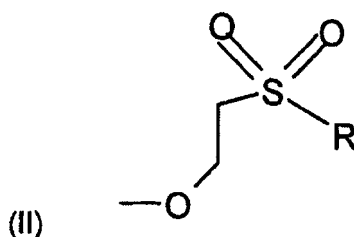
- **Laurent T. C.; Fraser J. R. E.** *FASES J.*, 1992, vol. 6, 2397-2404 [0004]
- Proteoglycans and hyaluronan in morphogenesis and differentiation. **Toole B.P.** *Cell Biology of the Extracellular Matrix*. *Plenum*, 1991, 305-341 [0004]
- **DeAngelis, P. L.** *Cell. Mol. Life Sci.*, 1999, vol. 56, 670-682 [0034]
- *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 2001, vol. 98, 4658-4663 [0034]
- **Bitter; Muir.** *Anal Biochem.*, 1962, vol. 4, 330-334 [0045]
- **Ueno et al.** *Chem. Pharm. Bull.*, 1988, vol. 36, 4971-4975 [0045]
- **Wyatt.** *Anal. Chim. Acta*, 1993, vol. 272, 1-40 [0045]
- **Wyatt Technologies**, 1999 [0045]
- **T. Miyazaki et al.** *Polymer Degradation and Stability*, 2001, vol. 74, 77-85 [0048]
- Protein Purification. VCH Publishers, 1989 [0053]
- **Chang; Cohen.** *Molecular General Genetics*, 1979, vol. 168, 111-115 [0057]
- **Young; Spizizen.** *Journal of Bacteriology*, 1961, vol. 81, 823-829 [0057]
- **Dubnau; Davidoff-Abelson.** *Journal of Molecular Biology*, 1971, vol. 56, 209-221 [0057]
- **Shigekawa; Dower.** *Biotechniques*, 1988, vol. 6, 742-751 [0057]
- **Koenler; Thorne.** *Journal of Bacteriology*, 1987, vol. 169, 5271-5278 [0057]

REIVINDICACIONES

1. Derivado de ácido hialurónico comprendiendo n unidades repetitivas y teniendo la fórmula general estructural (I):



donde, en al menos una unidad repetitiva, uno o más de R1, R2, R3, R4 comprende una aril/alquil sulfona unida a un éter teniendo la fórmula general estructural (II), donde R comprende un grupo alquilo o arilo, y por el contrario R1, R2, R3, R4 son grupos hidróxilo, OH:



2. Derivado de ácido hialurónico según la reivindicación 1, donde dos o más de R1, R2, R3, R4 comprenden una o más aril/alquil sulfona unida a un éter teniendo la fórmula general estructural (II).

3. Derivado de ácido hialurónico según la reivindicación 1 ó 2, donde tres o más de R1, R2, R3, R4 comprenden una o más aril/alquil sulfonas unidas a un éter teniendo la fórmula general estructural (II).

4. Derivado de ácido hialurónico de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde todos R1, R2, R3, R4 comprenden una o más aril/alquil sulfonas unidas a un éter teniendo la fórmula general estructural (II).

5. Derivado de ácido hialurónico de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde al menos R4 comprende una aril/alquil sulfona unida a un éter teniendo la fórmula general estructural (II).

6. Derivado de ácido hialurónico de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde R comprende un grupo alquilo, preferiblemente el grupo alquilo es hidrofóbico.

7. Derivado de ácido hialurónico según la reivindicación 6, donde el grupo alquilo comprende un grupo alquilo C₁-C₂₀, preferiblemente metilo, etilo, propilo, 2-octenilo, 2-nonenilo, 2-dodecenilo, 2-hexadecenilo o 2-octadecenilo.

8. Derivado de ácido hialurónico de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde R comprende un grupo arilo, preferiblemente el grupo arilo es hidrofóbico, y más preferiblemente el grupo arilo es fenilo o p-toluido.

9. Derivado de ácido hialurónico de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, donde el Grado de Sustitución (DS) está en el rango de 0.1-100%, preferiblemente 1-90%, más preferiblemente 2-80%, aún más preferiblemente 4-70%, incluso más preferiblemente 8-60%, ó 10-50%, 14-40%, 16-30%, o de la forma más preferible en el rango de 18-25%, determinado tal y como se define aquí.

10. Derivado de ácido hialurónico, donde se produce una reacción de adición entre uno o más grupos hidróxilo del ácido hialurónico y uno o más compuestos monofuncionales de aril-/alquil-vinil sulfona para formar un enlace de éter entre el ácido hialurónico y el uno o más compuestos de aril/alquil sulfona resultante.

ES 2 329 731 T3

11. Derivado de ácido hialurónico según la reivindicación 10, donde el uno o más compuestos monofuncionales de aril/alquil-vinil sulfona tiene la fórmula general estructural (III), donde R comprende un grupo alquilo o arilo.

12. Derivado de ácido hialurónico de cualquiera de las reivindicaciones 10-11, donde el grupo alquilo/arilo comprende un grupo alquilo, preferiblemente un grupo alquilo hidrofóbico, más preferiblemente el grupo alquilo comprende un grupo alquilo C₁-C₂₀, y de la forma más preferible el grupo alquilo comprende un metilo, etilo, propilo, 2-octenilo, 2-nonenilo, 2-dodecenilo, 2-hexadecenilo o 2 octadecenilo.

13. Derivado de ácido hialurónico según la reivindicación 11, donde el grupo alquilo/arilo comprende un grupo arilo, preferiblemente un grupo arilo hidrofóbico.

14. Derivado de ácido hialurónico según la reivindicación 13, donde el grupo arilo comprende fenilo o p-toluido.

15. Derivado de ácido hialurónico de cualquiera de las reivindicaciones 10-14, donde el Grado de Sustitución (DS) está en el rango de 0.1-100%, preferiblemente 1-90%, más preferiblemente 2-80%, aún más preferiblemente 4-70%, incluso más preferiblemente 8-60%, ó 10-50%, 14-40%, 16-30%, o de la forma más preferible en el rango de 18-25%, determinado tal y como se define aquí.

16. Proceso para producir un derivado de ácido hialurónico, el proceso incluyendo las etapas de:

(a) hacer reaccionar un ácido hialurónico con uno o más compuestos de alquil-/aril-vinil sulfona teniendo la fórmula general estructural (III) bajo condiciones alcalinas en una solución acuosa, por la cual se forma el derivado de ácido hialurónico; y

(b) recuperar el derivado de ácido hialurónico.

17. Proceso según la reivindicación 16, donde el grupo alquilo/arilo, R en (III), comprende un grupo alquilo, preferiblemente un grupo alquilo hidrofóbico, más preferiblemente el grupo alquilo comprende un grupo alquilo C₁-C₂₀, y de la forma más preferible el grupo alquilo comprende un metilo, etilo, propilo, 2-octenilo, 2-nonenilo, 2-dodecenilo, 2-hexadecenilo o 2-octadecenilo.

18. Proceso según la reivindicación 16, donde el grupo alquilo/arilo comprende un grupo arilo, preferiblemente un grupo arilo hidrofóbico, y más preferiblemente el grupo arilo comprende fenilo o p-toluido.

19. Proceso de cualquiera de las reivindicaciones 16-18, donde el uno o más compuestos de alquil-/aril-vinil sulfona comprenden dos o más grupos alquilo y/o arilo diferentes.

20. Proceso según la reivindicación 19, donde los dos o más grupos alquilo/arilo diferentes comprenden un grupo alquilo, preferiblemente un grupo alquilo hidrofóbico, más preferiblemente el grupo alquilo comprende un grupo alquilo C₁-C₂₀, y de la forma más preferible el grupo alquilo comprende un metilo, etilo, propilo, 2-octenilo, 2-nonenilo, 2-dodecenilo, 2-hexadecenilo, o 2-octadecenilo.

21. Proceso según la reivindicación 19, donde los dos o más grupos alquilo/arilo diferentes comprenden un grupo arilo, preferiblemente un grupo arilo hidrofóbico, y más preferiblemente el grupo arilo comprende fenilo o p-toluido.

22. Proceso de cualquiera de las reivindicaciones 16-21, donde el derivado de ácido hialurónico tiene un Grado de Sustitución (DS) en el rango de 0.1-100%, preferiblemente 1-90%, más preferiblemente 2-80%, aún más preferiblemente 4-70%, incluso más preferiblemente 8-60%, o 10-50%, 14-40%, 16-30%, o de la forma más preferible en el rango de 18-25%, determinado tal y como se define aquí.

23. Composición que comprende un derivado de ácido hialurónico tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-15 y una sustancia activa, preferiblemente la sustancia activa es un agente farmacológicamente activo.

24. Artículo cosmético que comprende un derivado de ácido hialurónico tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-15 o una composición tal y como se define en la reivindicación 23.

25. Artículo, sanitario, médico o quirúrgico que comprende un derivado de ácido hialurónico tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-15 o una composición tal y como se define en la reivindicación 23; preferiblemente el artículo es un pañal, una compresa, una esponja quirúrgica, una esponja para cicatrizar heridas, o una parte comprendida en una tirita u otro material de apósito.

26. Uso de un derivado de ácido hialurónico tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-15 o una composición tal y como se define en la reivindicación 23; para la producción de un medicamento para el tratamiento de osteoartritis, cáncer, una herida, pérdida de pelo o calvicie, para un tratamiento oftalmológico o para angiogénesis.

27. Uso de un derivado de ácido hialurónico tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-15 o una composición tal y como se define en la reivindicación 23; para la producción de una hidratante.

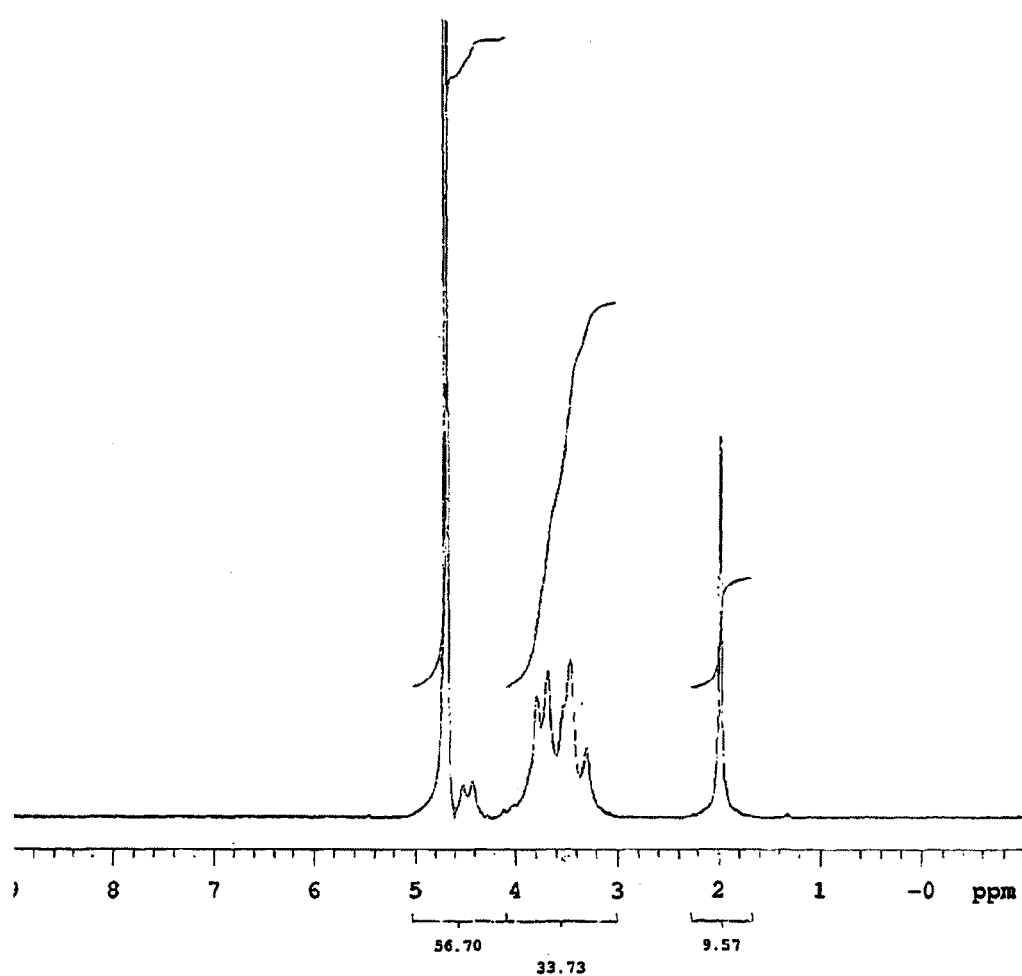


Figura 1: Espectro de RMN ^1H (HA, 300 kDA)

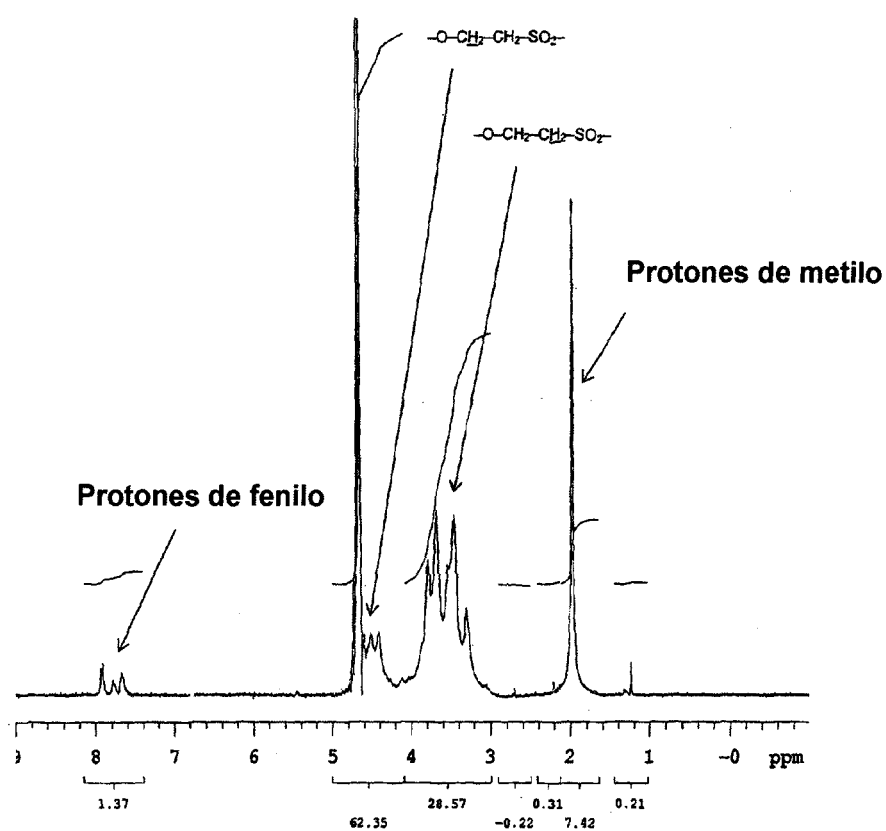


Figura 2: Espectro de RMN ^1H (PVS-HA de HA 300 kDa) relación PVS:HA 1.5:1

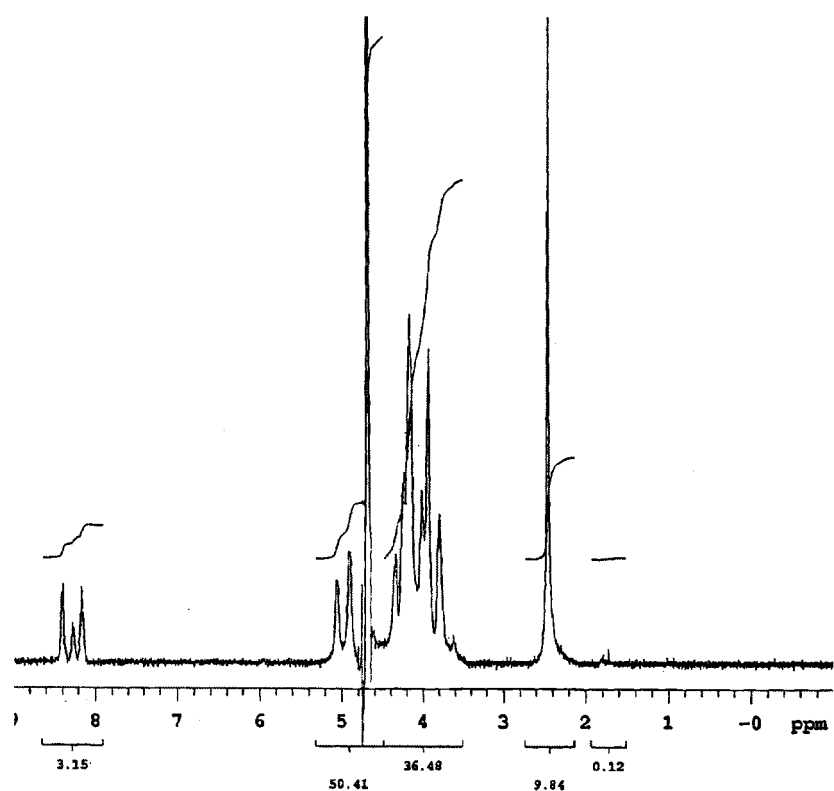


Figura 3: espectro de RMN ^1H (PVS-HA de HA 300 kDa) relación PVS:HA 5:1

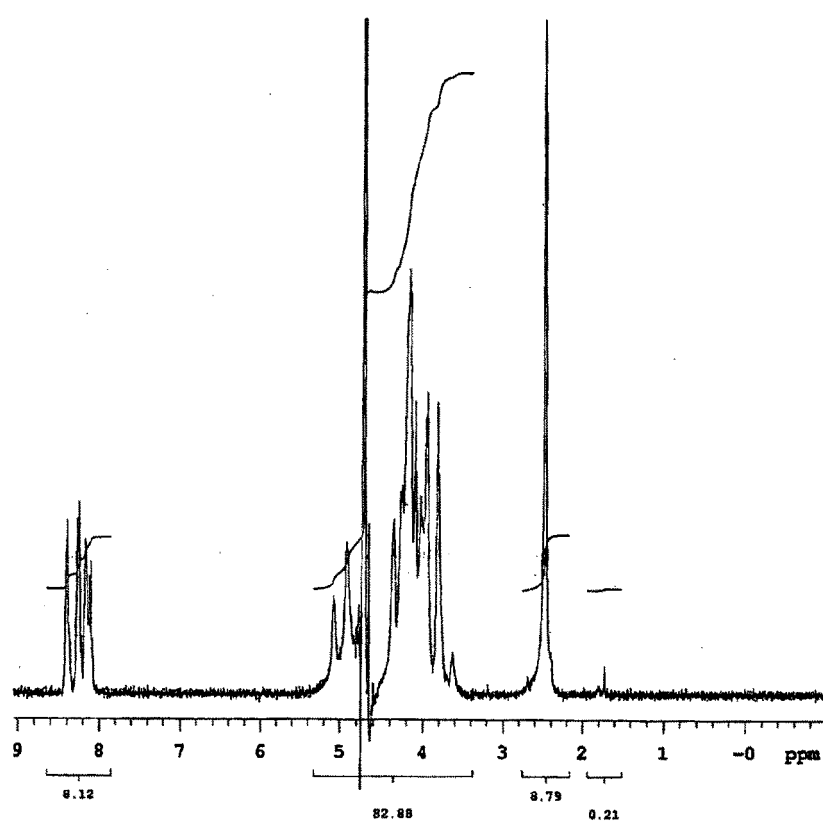


Figura 4: espectro de RMN ^1H (PVS-HA de HA 300 kDa) relación PVS:HA de 10:1

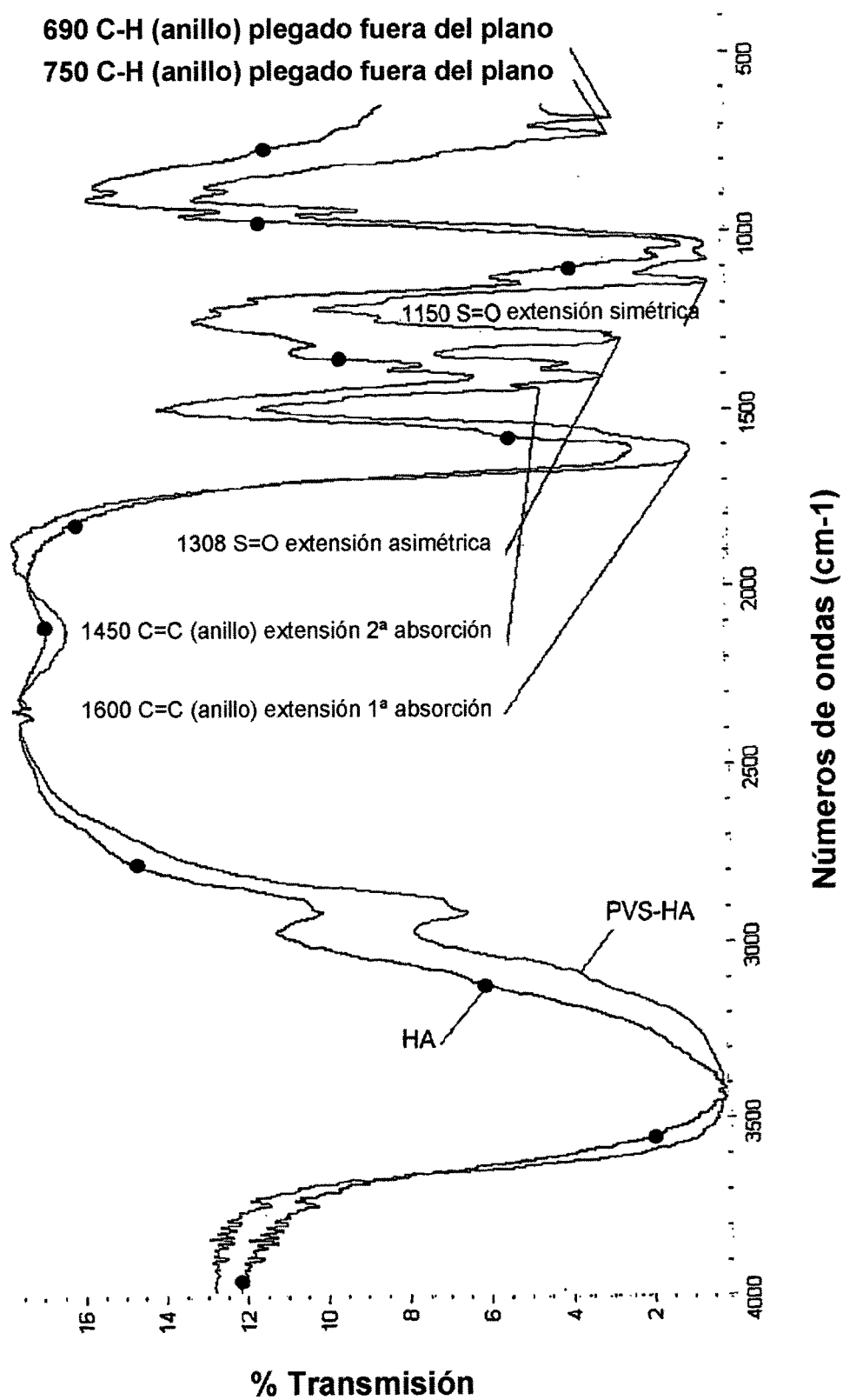


Figura 5: espectro de IR (PVS-HA de HA 300 kDa) relación PVS:HA 10:1

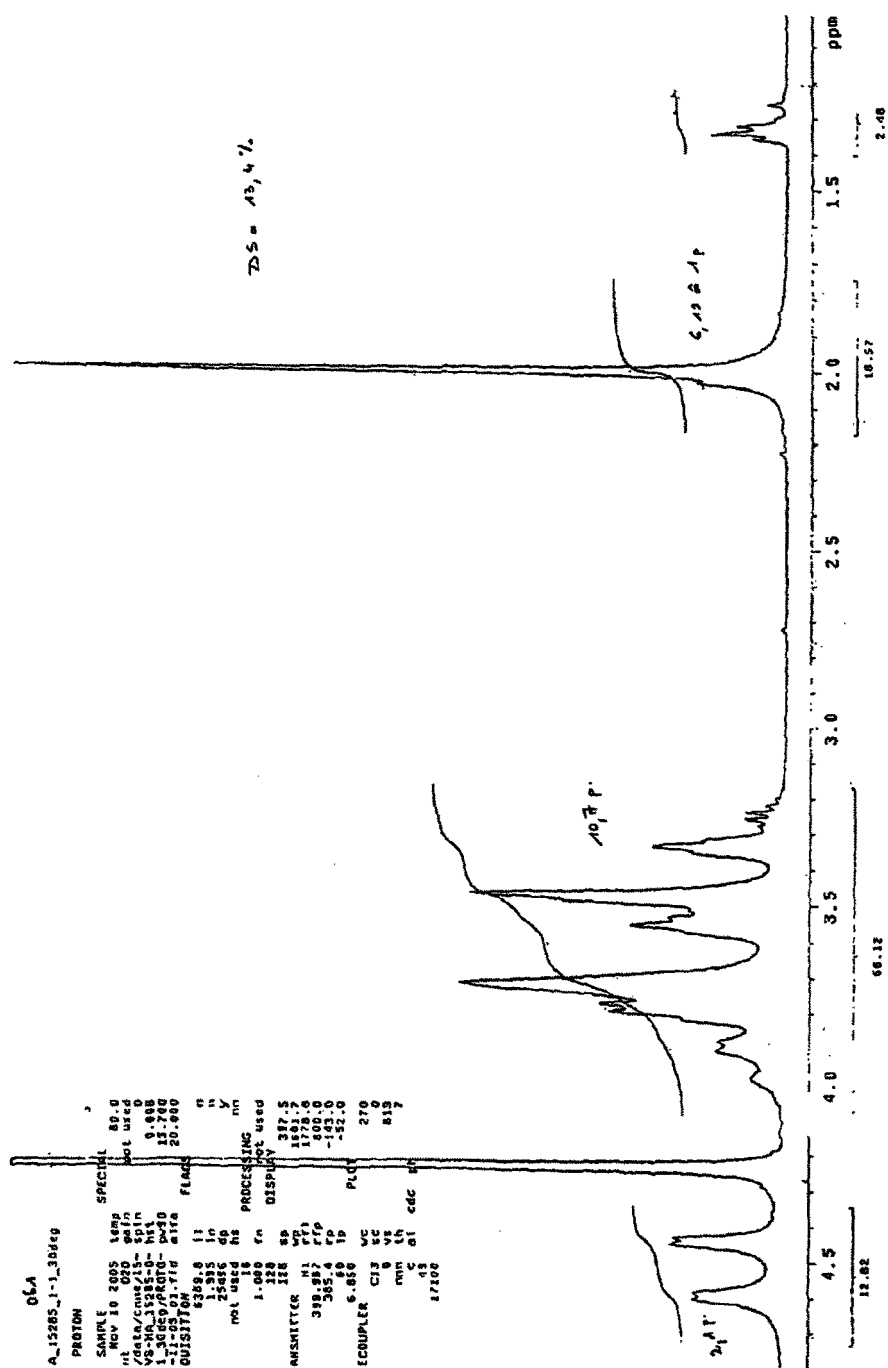


Figura 6: espectro de RMN ^1H (EVS-HA de HA 300 kDa) relación EVS:HA 1.5:1