

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 817 427**

51 Int. Cl.:

**C08B 37/08** (2006.01)

**A61K 31/728** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.08.2017 PCT/EP2017/069574**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.02.2018 WO18024793**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.08.2017 E 17745195 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.06.2020 EP 3494144**

54 Título: **Procedimiento de reticulación de glicosaminoglicanos**

30 Prioridad:

**03.08.2016 US 201662370479 P**  
**23.12.2016 EP 16206624**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**07.04.2021**

73 Titular/es:

**GALDERMA RESEARCH & DEVELOPMENT**  
**(50.0%)**  
**2400 Route des Colles, Les Templiers**  
**06410 Biot, FR y**  
**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE**  
**SCIENTIFIQUE (50.0%)**

72 Inventor/es:

**AUZELY-VELTY, RACHEL;**  
**FIGUEIREDO, TAMIRIS;**  
**BOITEAU, JEAN-GUY;**  
**HARRIS, CRAIG STEVEN;**  
**GERFAUD, THIBAUT;**  
**TOMAS, LOÏC y**  
**JING JING, LAURA**

74 Agente/Representante:

**SALVÀ FERRER, Joan**

ES 2 817 427 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

Procedimiento de reticulación de glicosaminoglicanos

5 Campo técnico de la invención

**[0001]** La presente invención se refiere al campo de los hidrogeles que contienen polisacáridos reticulados y al uso de tales hidrogeles en aplicaciones médicas y/o cosméticas. Más específicamente, la presente invención se ocupa de hidrogeles hechos de glicosaminoglicanos reticulados, particularmente ácido hialurónico reticulado, 10 condroitina o sulfato de condroitina, que tienen enlaces reversibles, preferentemente enlaces éster de boronato, que conducen a nuevos beneficios.

Antecedentes de la invención

15 **[0002]** Los geles absorbentes de agua, o hidrogeles, se utilizan ampliamente en el campo biomédico. Generalmente se preparan mediante reticulación química de polímeros en redes infinitas. Si bien muchos polisacáridos absorben agua hasta que se disuelven completamente, los geles reticulados de los mismos polisacáridos pueden absorber normalmente una cierta cantidad de agua hasta que se saturan, es decir, tienen una capacidad de retención de líquidos finita o grado de hinchamiento.

20 **[0003]** El ácido hialurónico, la condroitina y el sulfato de condroitina son polímeros biocompatibles bien conocidos. Son polisacáridos naturales que pertenecen al grupo de los glicosaminoglicanos (GAG). Todos los glicosaminoglicanos son cadenas de heteropolisacáridos con carga negativa que tienen la capacidad de absorber grandes cantidades de agua.

25 **[0004]** El sulfato de condroitina (SC) es un glicosaminoglicano muy abundante que se encuentra en los tejidos conectivos de los mamíferos donde, junto con otros glicosaminoglicanos sulfatados, se une a las proteínas como parte de los proteoglicanos. Se ha demostrado anteriormente que los hidrogeles que contienen SC pueden utilizarse con éxito en aplicaciones biomédicas debido a su semejanza con la matriz extracelular natural (Lauder, 30 R.M., Complement Ther Med 17: 56-62, 2009). El sulfato de condroitina también se utiliza en el tratamiento de la osteoartritis, por ejemplo, como suplemento dietético.

**[0005]** La reticulación de los glicosaminoglicanos prolonga la duración de los polímeros degradables que componen la red, lo cual es útil en muchas aplicaciones.

35 **[0006]** Sin embargo, uno de los principales inconvenientes de una gran mayoría de los geles a base de glicosaminoglicanos, tales como los que se utilizan para tratar arrugas, radica en la dificultad de inyectar el hidrogel debido a la alta densidad de reticulación del polisacárido.

40 **[0007]** El ácido hialurónico es uno de los polímeros biocompatibles más utilizados para uso médico. El ácido hialurónico y los demás glicosaminoglicanos son cadenas de heteropolisacáridos con carga negativa que tienen la capacidad de absorber grandes cantidades de agua. El ácido hialurónico y los productos derivados del ácido hialurónico se utilizan ampliamente en los ámbitos biomédico y cosmético, por ejemplo, durante la viscoscirugía y como relleno dérmico.

45 **[0008]** Dado que el ácido hialurónico está presente con una estructura química idéntica en la mayoría de los organismos vivos, excepto por su masa molecular, produce un mínimo de reacciones a cuerpos extraños y permite usos médicos avanzados. La reticulación y/u otras modificaciones de la molécula de ácido hialurónico son normalmente necesarias para mejorar su duración *in vivo*. Además, tales modificaciones afectan a la capacidad de 50 retención de líquidos de la molécula de ácido hialurónico. Como consecuencia de ello, el ácido hialurónico ha sido objeto de muchos intentos de modificación.

**[0009]** En la técnica anterior, los hidrogeles se preparan haciendo reaccionar el ácido hialurónico, por ejemplo, con BDDE (butanodiol diglicidil éter) en un medio acuoso básico que resulta en la formación de enlaces 55 covalentes (WO 97/04012). Este no es un procedimiento reversible. El documento WO 2014/072330 describe una composición polimérica que comprende una mezcla de polímero de ácido hialurónico modificado con ácido fenilborónico injertado en al menos un hidroxilo con un grupo que comprende ácido fénilborónico y un polímero de AH modificado con un cis-diol injertado en al menos un hidroxilo con un grupo que comprende un cis-diol. El documento US 2014/0155305 describe una solución acuosa que comprende un polímero espesante con grupos diol 60 distribuidos a lo largo del mismo, tales como guar u otro polisacárido, el cual está reticulado con un agente reticulante que contiene una pluralidad de grupos boroxol. El documento US 2013/0129797 A1 describe composiciones poliméricas que comprenden al menos un residuo de polímero y al menos una fracción de reticulación, donde el residuo de polímero está reticulado por la fracción de reticulación y donde la fracción de reticulación se forma a partir de una reacción entre una fracción de ácido borónico y una fracción de ácido 65 hidroxámico.

Descripción de la invención

**[0010]** Es un objeto de la presente invención proporcionar un hidrogel que tiene un glicosaminoglicano (GAG) como el polímero hinchable, que tiene enlaces reversibles.

**[0011]** También es un objeto de la presente invención proporcionar un procedimiento para preparar hidrogeles de moléculas de glicosaminoglicano por rutas sencillas y eficientes. Es también un objeto de la invención proporcionar un procedimiento más sencillo y conveniente para fabricar glicosaminoglicanos reticulados, con propiedades de gel cuando se disuelven en un líquido acuoso.

**[0012]** Un objeto de la invención es proporcionar glicosaminoglicanos reticulados con menores modificaciones químicas y/o una estructura más simple.

**[0013]** Otro objeto de la invención es mitigar, aliviar o eliminar uno o más de los inconvenientes de la técnica anterior.

**[0014]** La presente invención se refiere a un nuevo hidrogel que muestra los siguientes beneficios:

- más fácil de inyectar,
- más maleable,
- puede autorrepararse.

**[0015]** La invención también se refiere al uso de tales geles, de particular interés para rellenar arrugas y/o dar forma al rostro con mayor precisión y con menos traumas para (el) paciente.

**[0016]** En un aspecto de la invención se proporcionan glicosaminoglicanos reticulados, donde dichos glicosaminoglicanos están reticulados mediante un anión de éster de alcoxiboronato formado entre una porción de diol de una fracción funcional de diol injertada en un primer glicosaminoglicano y un hemiéster de boronato injertado en un segundo glicosaminoglicano. Los glicosaminoglicanos reticulados según la invención forman un gel con un módulo de almacenamiento (elástico) más elevado en comparación con utilizar ácido fenilborónico como agente reticulante debido a las reticulaciones adicionales formadas entre el hemiéster de boronato y los grupos hidroxilo del glicosaminoglicano (véase el ejemplo 10). Los glicosaminoglicanos reticulados según la invención proporcionan además propiedades de autorreparación al gel obtenido (véase, por ejemplo, la figura 5 y el ejemplo 30). El gel obtenido también es fácil de inyectar, ya que los enlaces reversibles se rompen al ser empujados a través de la jeringa y, a continuación, se vuelven a formar rápidamente en el interior del cuerpo. Los geles pueden inyectarse como sólidos preformados debido a que el gel sólido puede soportar los daños externos y repararse a sí mismo bajo una tensión de cizallamiento adecuada. Gracias a la rápida cinética de gelificación tras la extrusión/inyección, recuperan su forma sólida casi inmediatamente. De este modo, antes de que el gel se vuelva a formar dentro del cuerpo, el gel es maleable, hasta que los enlaces reversibles se vuelvan a formar. Por lo tanto, en una realización, el procedimiento proporciona un gel autorreparable. Los glicosaminoglicanos reticulados pueden, opcionalmente, estar más reticulados.

**[0017]** Una porción de diol según la invención puede ser cualquier grupo que comprenda un diol, tal como un 1,2-diol o un 1,3-diol. En ciertas realizaciones de la invención, la porción de diol es un diol vecinal. En otras realizaciones de la invención, la porción de diol no es un diol vecinal.

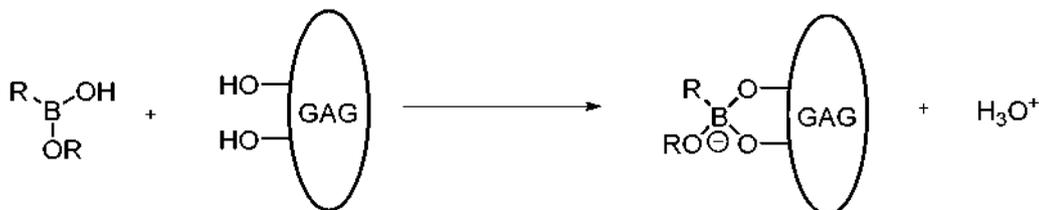
**[0018]** Normalmente, la porción de diol es una fracción de azúcar o un derivado de la misma. Los derivados del azúcar adecuados son derivados aptos para unirse a un glicosaminoglicano. Tales derivados pueden ser un disulfuro de monosacárido o disacárido, o un aminoazúcar.

**[0019]** Como se utiliza en esta invención, el término «hemíéster de boronato» debe interpretarse como un compuesto de fórmula general BR(OR)(OH), en contraposición a un ácido borónico, que tiene una fórmula general BR(OH)<sub>2</sub>, o un éster de boronato, que tiene una fórmula general BR(OR)<sub>2</sub>. Cada R, en este contexto, puede representar independientemente cualquier fracción orgánica, ya que el propósito de estas fórmulas se refiere a grupos funcionales de boro diferentes.

**[0020]** Un éster de boronato está en equilibrio con su forma aniónica tetraédrica en agua (a continuación). La forma aniónica es un anión de éster de hidroxiboronato (Hall, D.G., 2011, Boronic Acids: Preparation and Applications in Organic Synthesis, Medicine and Materials, segunda edición, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.).



**[0021]** Por tanto, en términos generales, un «anión de éster de alcoxiboronato» debe entenderse como una forma tetraédrica aniónica, formada entre un éster de boronato y cualquier grupo alcoxi, sustituido o no sustituido. Según la invención, un «anión de éster de alcoxiboronato» es un «anión de éster de alcoxiboronato» formado entre un hemiéster de boronato y una porción de diol de una fracción funcional de diol injertada en glicosaminoglicano (a continuación).



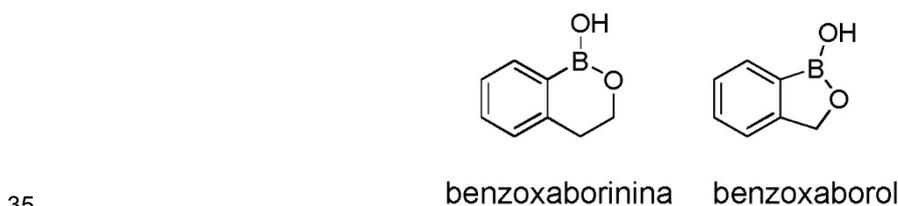
- 10 **[0022]** En una realización de este aspecto de la invención, el hemiéster de boronato es un compuesto que comprende una fracción cíclica de hemiéster de boronato de 5-6 miembros, a veces denominado boroxol (Kotsubayashi y col., ACS Macro Lett. 2013, 2, 260-264). Un boroxol de cinco miembros se denomina oxaborol y uno de seis miembros, oxaborinina, véase a continuación. Por lo tanto, en una realización de este aspecto de la invención, el hemiéster de boronato es un compuesto que comprende una fracción de oxaborol o de oxaborinina.
- 15 Los glicosaminoglicanos reticulados al mezclar un glicosaminoglicano injertado con un boroxol con un glicosaminoglicano injertado con una fracción funcional de diol se muestra en los ejemplos adjuntos (por ejemplo, el ejemplo 29) para producir un gel autorreparable con una mejor estabilidad del pH en comparación con la técnica anterior. Esto proporciona propiedades de inyección facilitadas, más versátiles y mejoradas.



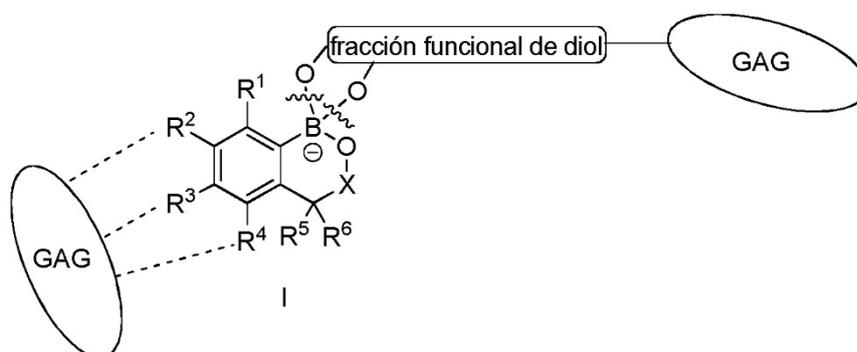
**[0023]** La presente invención propone nuevos hidrogeles:

- 25 - en los que las cadenas de glicosaminoglicanos únicamente están conectadas con reticulaciones reversibles y a base de mezclas de derivados de GAG-boroxol y GAG-poliol.

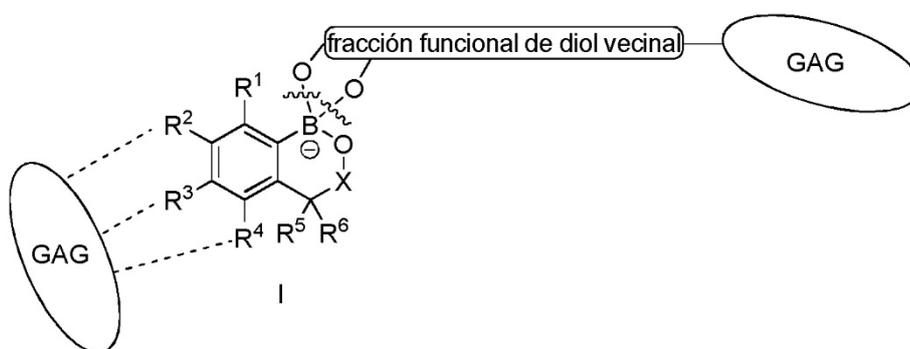
**[0024]** En una realización de este aspecto de la invención, el hemiéster de boronato es un benzoxaborol o benzoxaborinina opcionalmente sustituido. Con frecuencia, el benzoxaborol se denomina benzoboroxol y sus nombres pueden utilizarse indistintamente (documento US 2014/0155305). La posición bencílica del átomo de boro en un benzoxaborol o benzoxaborinina opcionalmente sustituido estabiliza el orbital p vacío del átomo de boro. Normalmente, el benzoxaborol o la benzoxaborinina pueden sustituirse por uno o más de H, F, Cl, NO<sub>2</sub>, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>, haloalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, fenilo y un anillo heteroaromático de cinco a seis miembros que comprende de 1 a 3 heteroátomos seleccionados de entre O, N y S.



**[0025]** En una realización de este aspecto de la invención, dichos glicosaminoglicanos reticulados tienen una estructura de fórmula (I)



tal que



5

donde

R<sup>1</sup> se selecciona de entre H, F, Cl, NO<sub>2</sub>, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>, haloalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> y alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>;

10 R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup> se seleccionan independientemente de entre H, F, Cl, haloalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>, NO<sub>2</sub>, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> y un grupo de unión, uniéndose dicho grupo de unión de forma covalente a dicho segundo glicosaminoglicano;

X se selecciona de entre CHR<sup>7</sup> y un enlace;

15 R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup> y R<sup>7</sup> se seleccionan independientemente de entre H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, fenilo, y un anillo heteroaromático de cinco o seis miembros que comprende de 1 a 3 heteroátomos seleccionados de entre O, N y S; y

20 donde uno de R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup> es un grupo de unión. Utilizar diferentes patrones de sustitución en el hemiéster de boronato afina las características de un gel formado entre una porción de diol de una fracción funcional de diol injertada en un primer glicosaminoglicano y un hemiéster de boronato injertado en un segundo glicosaminoglicano. Tales características pueden incluir una mayor estabilidad, una textura alterada específicamente ventajosa para ciertas aplicaciones o estabilidad para la esterilización en autoclave. El carbono bencílico es una posición en la que diferentes sustituyentes pueden conferir propiedades ligeramente diferentes al gel formado por el compuesto de fórmula (I). Por lo tanto, esto proporciona la oportunidad de afinar las propiedades del gel para diferentes aplicaciones, tales como imitar diferentes tejidos.

25

**[0026]** En ciertas realizaciones de este aspecto la invención, la porción de diol es un diol vecinal. En otras realizaciones de este aspecto de la invención, la porción de diol no es un diol vecinal.

30 **[0027]** Como se utiliza en esta invención, el término «haloalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>» se refiere tanto a grupos de hidrocarburos saturados de cadena lineal como de cadena ramificada, con entre 1 a 3 átomos de carbono y con de 1 a todos los hidrógenos sustituidos por un halógeno diferente o del mismo tipo. Entre los ejemplos de grupos de haloalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> figuran el metilo sustituido por 1 a 3 átomos de halógeno, el etilo sustituido por 1 a 5 átomos de halógeno y el n-propilo o isopropilo sustituido por 1 a 7 átomos de halógeno.

35 **[0028]** Como se utiliza en esta invención, el término «fluoroalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>» se refiere tanto a grupos de hidrocarburos saturados de cadena lineal como de cadena ramificada, con entre 1 a 3 átomos de carbono y con de 1 a todos los hidrógenos sustituidos por un átomo de flúor. Entre los ejemplos de grupos de fluoroalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> figuran el metilo sustituido por 1 a 3 átomos de flúor, el etilo sustituido por 1 a 5 átomos de flúor y el n-propilo o isopropilo sustituido por 1 a 7 átomos de flúor.

40

**[0029]** La presente descripción proporciona nuevos productos de hidrogel y procedimientos ventajosos relacionados para preparar hidrogeles hechos de moléculas de glicosaminoglicanos (GAG) reticulados que tienen enlaces reversibles, y los usos de los mismos. Los glicosaminoglicanos son cadenas de heteropolisacáridos con carga negativa que tienen la capacidad de absorber grandes cantidades de agua. En los productos de hidrogel según la descripción, la molécula de glicosaminoglicanos reticulados es el polímero hinchable que proporciona las propiedades del gel.

**[0030]** Según algunas realizaciones, el glicosaminoglicano se selecciona de entre el grupo que consiste en glicosaminoglicanos sulfatados o no sulfatados como el hialuronán, la condroitina, el sulfato de condroitina, el sulfato de heparano, el heparosán, la heparina, el sulfato de dermatán y el sulfato de queratán. Según algunas realizaciones, el glicosaminoglicano se selecciona de entre el grupo que consiste en ácido hialurónico, condroitina y sulfato de condroitina, y combinaciones de los mismos.

**[0031]** En una realización de este aspecto de la invención, dichos glicosaminoglicanos son ácido hialurónico. El ácido hialurónico (AH) es uno de los polímeros biocompatibles más utilizados para uso médico y cosmético. El AH es un polisacárido natural que pertenece al grupo de los glicosaminoglicanos (GAG). El ácido hialurónico consiste en dos unidades de monosacáridos alternas, la N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc) y el ácido D-glucurónico (GlcA), ensambladas por los enlaces glicosídicos  $\beta(1\rightarrow3)$  y  $\beta(1\rightarrow4)$ , respectivamente. El ácido hialurónico y los productos derivados del ácido hialurónico se utilizan ampliamente en los ámbitos biomédico y cosmético, por ejemplo, durante la viscoscirugía y como relleno dérmico.

**[0032]** La reticulación del ácido hialurónico puede lograrse mediante la modificación con un derivado de boroxol y un derivado de poliol para formar derivados AH-BOR y AH-poliol lineales. El grado de sustitución (GS) de estos conjugados de AH puede variar en un intervalo que oscila entre 0,05 y 0,70 para afinar el comportamiento reológico de los geles.

**[0033]** A menos que se especifique lo contrario, el término «ácido hialurónico» abarca todas las variantes y combinaciones de las variantes de ácido hialurónico, hialuronato o hialuronano, de varias longitudes de cadena y estados de carga, así como con varias modificaciones químicas. Es decir, el término también abarca las diversas sales de hialuronato del ácido hialurónico con varios contraiones, tal como el hialuronato de sodio. El ácido hialurónico puede obtenerse de varias fuentes de origen animal y no animal. Las fuentes de origen no animal incluyen la levadura y preferentemente las bacterias. El peso molecular de una única molécula de ácido hialurónico se encuentra normalmente en el intervalo de 0,1-10 kg/mol, pero son posibles otros pesos moleculares. Según la invención, los pesos moleculares preferidos se encuentran en el intervalo de 50-3000 kg/mol, más preferentemente en el intervalo de 70-1000 kg/mol.

**[0034]** En una realización de este aspecto de la invención, el peso molecular del glicosaminoglicano se encuentra entre 200-1500 kg/mol, preferentemente en el intervalo de 400-1100 kg/mol, más preferentemente de 500-1000 kg/mol, más preferentemente de 600-800 kg/mol.

**[0035]** En una realización de este aspecto de la invención, el peso molecular del glicosaminoglicano se encuentra entre 50-1000 kg/mol, tal como 50-500 kg/mol, tal como 50-200 kg/mol, tal como alrededor de 100 kg/mol.

**[0036]** En una realización de este aspecto de la invención, el grado de sustitución de los glicosaminoglicanos es 0,05-0,3, preferentemente 0,1-0,2.

**[0037]** En una realización de este aspecto de la invención, el grado de sustitución de los glicosaminoglicanos es 0,05-0,7, preferentemente 0,1-0,6, más preferentemente 0,15-0,5. Se ha observado experimentalmente que estos intervalos del grado de sustitución del ácido hialurónico por un hemiéster de boronato y posteriormente mezclado con un glicosaminoglicano injertado con una fracción funcional de diol muestran mejores propiedades de gel (por ejemplo, G' y G''). El grado de sustitución puede medirse en los glicosaminoglicanos poliméricos sustituidos mediante RMN.

**[0038]** El término «condroitina» se refiere a los glicosaminoglicanos que tienen una unidad repetida de disacáridos que consiste en fracciones de ácido D-glucurónico no sulfatado y N-acetil-D-galactosamina alternas. Para evitar dudas, el término «condroitina» no abarca ninguna forma de sulfato de condroitina.

**[0039]** El término «sulfato de condroitina» se refiere a los glicosaminoglicanos que tienen una unidad repetida de disacáridos que consiste en fracciones de ácido D-glucurónico y fracciones de N-acetil-D-galactosamina alternas. La fracción de sulfato puede estar presente en varias posiciones diferentes. Las moléculas de sulfato de condroitina preferidas son la 4-sulfato de condroitina y la 6-sulfato de condroitina.

**[0040]** Las moléculas de condroitina pueden obtenerse de varias fuentes de origen animal y no animal. Las fuentes de origen no animal incluyen la levadura y preferentemente las bacterias. El peso molecular de una única molécula de condroitina se encuentra normalmente en el intervalo de 1-500 kg/mol, pero son posibles otros pesos

moleculares.

**[0041]** La expresión «glicosaminoglicanos reticulados» o «moléculas de glicosaminoglicanos reticulados» se refiere en esta invención a glicosaminoglicanos que comprenden reticulaciones entre las cadenas de moléculas de glicosaminoglicanos normalmente covalentes, lo que crea una red continua de moléculas de glicosaminoglicanos que se mantienen unidas mediante las reticulaciones.

**[0042]** El producto de glicosaminoglicanos reticulados es preferentemente biocompatible. Esto implica que no se produce ninguna respuesta inmunológica o solo una respuesta muy leve en el individuo tratado. Es decir, no se producen efectos locales o sistémicos indeseables o son muy leves en el individuo tratado.

**[0043]** El producto reticulado según la descripción es un gel o un hidrogel. Es decir, puede considerarse un sistema reticulado de moléculas de glicosaminoglicanos insoluble en agua, pero sustancialmente diluido cuando se somete a un líquido, normalmente un líquido acuoso.

**[0044]** En una realización de este aspecto de la invención, dicho grupo de unión forma un enlace amida o un enlace éter con dicho segundo glicosaminoglicano.

Según esta realización, el grupo de unión forma un enlace amida o un enlace éter, respectivamente, con la cadena principal de dicho segundo glicosaminoglicano. Por lo tanto, los glicosaminoglicanos reticulados autorreparables se consiguen con glicosaminoglicanos menos modificados. Al tener el grupo de unión del hemiéster de boronato unido mediante un enlace amida o un enlace éter se obtiene un gel estable, ya que tanto los éteres como las amidas son estables en condiciones fisiológicas. El injerto de un compuesto de fórmula I en dicho segundo glicosaminoglicano puede hacerse, por ejemplo, mediante un enlace éter al hacer reaccionar, por ejemplo, un grupo hidroxilo de la cadena principal del glicosaminoglicano con una funcionalidad epoxi de dicho grupo de unión. El injerto del compuesto de fórmula I en dicho segundo glicosaminoglicano también puede hacerse utilizando cloruro de 4-(4,6-dimetoxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metilmorfolinio (DMTMM) para activar los grupos carboxílicos en dicho segundo glicosaminoglicano y hacer reaccionar las especies resultantes con una función amina de dicho grupo de unión para formar una amida estable. De este modo, se obtiene un gel autorreparable con un glicosaminoglicano menos modificado.

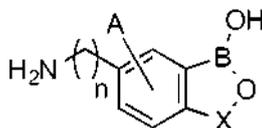
**[0045]** En una realización de este aspecto de la invención, dicho grupo de unión es  $-NR^9-Y$  o  $-O-Y$  y forma un enlace amida o un enlace éter con dicho segundo glicosaminoglicano, donde  $R^9$  se selecciona de entre hidrógeno, alquilo  $C_1-C_3$  y fluoroalquilo  $C_1-C_3$ ;

Y se selecciona de entre un enlace y un alquileo  $C_1-C_6$  en el que uno o dos  $CH_2$  se sustituyen opcionalmente por un grupo seleccionado de entre O, NH y fenileno, siendo el alquileo  $C_1-C_6$  sustituido opcionalmente con 1 a 12  $R^8$ ; y  $R^8$  se selecciona de entre F, Cl, alquilo  $C_1-C_3$ , haloalquilo  $C_1-C_3$ , fenilo, OH, hidroxialquilo  $C_1-C_3$ , alcoxi  $C_1-C_3$ ,  $NH_2$ , alquilamino N- $C_1-C_3$ , dialquilamino N,N- $C_1-C_4$ .

**[0046]** En una realización de este aspecto de la invención,  $R^2$  es un grupo de unión. Tal como se utiliza en esta invención, un grupo de unión es una fracción de una molécula que se une a otra molécula. Por lo tanto, es inherente al término «grupo de unión» que un grupo de unión tenga una porción que es capaz de unirse a otra molécula, preferentemente directamente a la otra molécula. Tal porción de enlace puede ser, por ejemplo, un grupo amina, un grupo hidroxilo o un alqueno. Un grupo de unión, en el sentido de la invención, es la porción del hemiéster de boronato que se une a un glicosaminoglicano. Por lo tanto, el grupo de unión resulta preferentemente en una unión estable con el glicosaminoglicano.

**[0047]** En una realización de este aspecto de la invención, dicho grupo de unión es  $-NR^9-Y$  y forma un enlace amida con dicho segundo glicosaminoglicano, donde  $R^9$  se selecciona de entre hidrógeno, alquilo  $C_1-C_3$  y fluoroalquilo  $C_1-C_3$ ; y donde Y es un enlace o un alquileo  $C_1-C_6$  no sustituido. Al tener el grupo de unión del hemiéster de boronato unido mediante un enlace amida se obtiene un gel estable, ya que las amidas son estables en condiciones fisiológicas. En los glicosaminoglicanos reticulados conocidos que utilizan la química del boro, el ácido aminofenilbórico se unió al ácido hialurónico mediante una fracción de pentanoato de 5-(3-amino-3-oxopropil)sulfanilo. Según la invención, la amina (o anilina) del compuesto de fórmula I puede unirse directamente a la cadena principal de dicho segundo glicosaminoglicano, por ejemplo, utilizando cloruro de 4-(4,6-dimetoxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metilmorfolinio (DMTMM) para activar los grupos carboxílicos en dicho segundo glicosaminoglicano y hacer reaccionar las especies resultantes con una función amina de dicho grupo de unión para formar una amida estable. De este modo, se obtiene un gel autorreparable con un glicosaminoglicano menos modificado.

**[0048]** En una realización de este aspecto de la invención, el hemiéster de boronato es



donde A se selecciona de entre H, F, CF<sub>3</sub>, NO<sub>2</sub>, OCH<sub>3</sub> y CH<sub>3</sub>;

n se selecciona de entre 0, 1, 2 y 3; y

5

X se selecciona de entre CH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>, CH-NC<sub>5</sub>H<sub>11</sub> (CH-piperidina) y C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.

**[0049]** En una realización de este aspecto de la invención, R<sup>1</sup>, R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup> se seleccionan independientemente de entre H, F, OCH<sub>3</sub>, CF<sub>3</sub> y CH<sub>3</sub>;

10 R<sup>2</sup> es un grupo de unión;

dicho grupo de unión es -HN-Y- y forma un enlace amida con dicho segundo glicosaminoglicano;

Y es un enlace o alquileno C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> no sustituido;

X es un enlace o CH<sub>2</sub>; y

R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> se seleccionan independientemente de entre H y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>. X tiene dos conexiones y el término CH<sub>2</sub>, por

15 lo tanto, significa metileno o -CH<sub>2</sub>-.

**[0050]** En una realización de este aspecto de la invención,

R<sup>1</sup> se selecciona de entre H, F y OCH<sub>3</sub>;

R<sup>2</sup> es un grupo de unión;

20 R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup> son hidrógeno;

dicho grupo de unión es -HN- y forma un enlace amida con dicho segundo glicosaminoglicano;

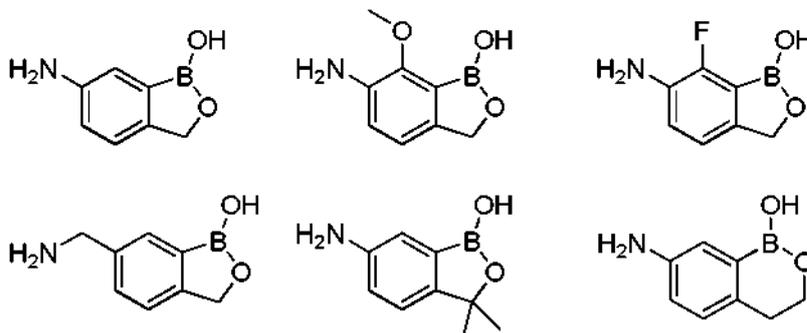
Y es un enlace o un metileno no sustituido;

X es un enlace o CH<sub>2</sub>; y

R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> se seleccionan independientemente de entre H y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>.

25

**[0051]** En una realización de este aspecto de la invención, dicho hemiéster de boronato se selecciona de entre

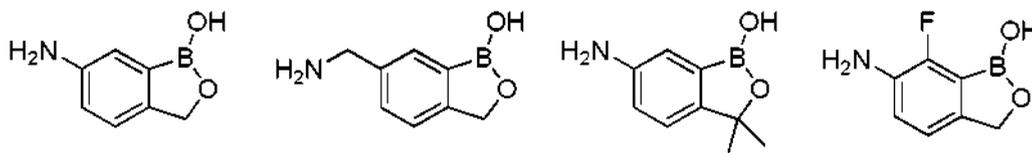


30

donde el hemiéster de boronato se injerta a dicho segundo glicosaminoglicano, por lo que el grupo -NH<sub>2</sub> del hemiéster de boronato forma una amida con una cadena principal de grupo carboxilato de dicho segundo glicosaminoglicano.

35 **[0052]**

En una realización de este aspecto de la invención, dicho hemiéster de boronato se selecciona de entre



40

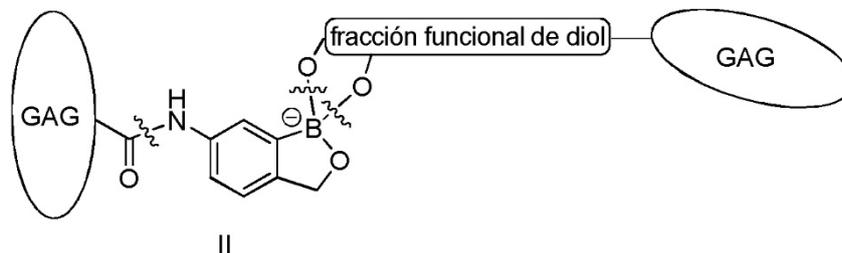
donde el hemiéster de boronato se injerta a dicho segundo glicosaminoglicano, por lo que el grupo -NH<sub>2</sub> del hemiéster de boronato forma una amida con una cadena principal de grupo carboxilato de dicho segundo glicosaminoglicano.

**[0053]** En ciertas realizaciones de la invención, los glicosaminoglicanos reticulados proporcionan un gel que

45 es estable a la esterilización en autoclave, lo que produce un gel más seguro cuando se utiliza en el interior del cuerpo, tal como para inyecciones o cuando se utiliza en implantes.

**[0054]** En una realización de este aspecto de la invención, los glicosaminoglicanos reticulados tienen una

estructura de fórmula (II)



5 **[0055]** Al reticular mediante un anión de éster de alcoxiboronato con una estructura de fórmula II, se obtiene un gel más estable, en particular, un gel más estable en cuanto al pH, como se muestra en el ejemplo 29.

**[0056]** En ciertas realizaciones de este aspecto de la invención, la porción de diol es un diol vecinal. En otras realizaciones de este aspecto de la invención, la porción de diol no es un diol vecinal.

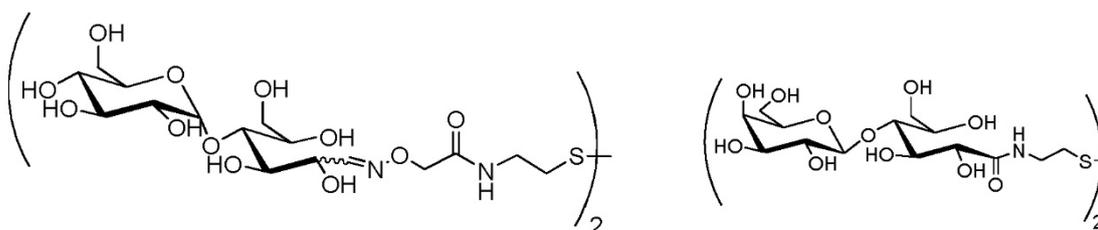
10

**[0057]** En una realización de este aspecto de la invención, dicha porción de diol se selecciona de entre un monosacárido, un disacárido y un alditol o un derivado de los mismos. Normalmente, tal porción de diol se selecciona de entre una hexosa, una dihexosa y un alditol C<sub>6</sub> o un derivado de los mismos. Tales derivados son derivados que permiten el injerto en el glicosaminoglicano al que se debe injertar la porción de diol. Tales derivados pueden ser, por ejemplo, un aminoazúcar, un sulfuro de mono o disacárido o un ácido de azúcar. Por lo tanto, la fracción funcional de diol consiste en una porción de diol y una porción de enlace. Los procedimientos para enlazar una porción de diol, tal como un derivado del azúcar, con un glicosaminoglicano son conocidos por un experto en la materia.

15

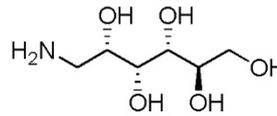
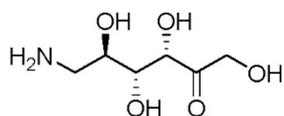
20 **[0058]** En una realización de este aspecto de la invención, dicha porción de diol se selecciona de entre maltosa, fructosa, lactosa y sorbitol o un derivado de los mismos. Los derivados adecuados para unirse a un glicosaminoglicano son los derivados de la maltosa, la fructosa, la lactosa y el sorbitol. Tales derivados pueden ser un disulfuro de monosacárido o disacárido, o un aminoazúcar.

25 **[0059]** En una realización de la invención, dicha porción de diol se selecciona de entre el disulfuro de maltosa, el disulfuro lactobiónico, la 1-amino-1-deoxi-D-fructosa y el 1-amino-1-deoxi-D-sorbitol.



Disulfuro de maltosa

Disulfuro lactobiónico



30

1-amino-1-deoxi-D-fructosa

1-amino-1-deoxi-D-sorbitol

**[0060]** En una realización de este aspecto de la invención, dicha porción de diol es una cetosa o un derivado de la misma.

35 **[0061]** En una realización de este aspecto de la invención, dicha porción de diol es una fructosa o un derivado de la misma.

**[0062]** En un aspecto de la invención, se proporciona un procedimiento de reticulación de un primer

glicosaminoglicano injertado con una fracción funcional de diol que tiene una porción de diol y un segundo glicosaminoglicano injertado con un hemiéster de boronato, comprendiendo

la reticulación dicho primer glicosaminoglicano con dicho segundo glicosaminoglicano formando un enlace de aniones de éster de alcoxiboronato entre el hemiéster de boronato de dicho segundo glicosaminoglicano y la porción

5 de diol de dicha fracción de diol funcional de dicho primer glicosaminoglicano.

El procedimiento no excluye reticulaciones adicionales. Un hemiéster de boronato tiene mayor afinidad por los dioles que, por ejemplo, el ácido fenilbórico. Los glicosaminoglicanos reticulados producidos con un procedimiento según la invención pueden formar geles con un módulo de almacenamiento (elástico) más elevado en comparación con

10 utilizar el ácido fenilbórico como un agente reticulante debido a las reticulaciones adicionales formadas entre el hemiéster de boronato y los grupos hidroxilo de los glicosaminoglicanos, como se muestra en el ejemplo 10. En otras palabras, un glicosaminoglicano puede injertarse en un mayor grado de sustitución con un hemiéster de boronato que un glicosaminoglicano injertado con un ácido fenilbórico correspondiente. Esto es útil cuando se forma un gel

junto con un glicosaminoglicano injertado con una fracción funcional de diol, en particular, un gel autorreparable. El procedimiento según la invención proporciona, además, propiedades de autorreparación al gel obtenido (véase, por

15 ejemplo, la figura 5 y el ejemplo 30). Un gel producido mediante el procedimiento según la invención también es fácil de inyectar, ya que los enlaces reversibles se rompen al ser empujados a través de la jeringa y, a continuación, se vuelven a formar rápidamente en el interior del cuerpo. Los geles pueden inyectarse como sólidos preformados debido a que el gel sólido puede soportar los daños externos y repararse a sí mismo bajo una tensión de

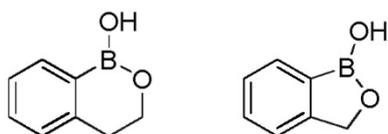
20 cizallamiento adecuada. Gracias a la rápida cinética de gelificación tras la/inyección, recuperan su forma sólida casi inmediatamente. De este modo, antes de que el gel se vuelva a formar dentro del cuerpo, el gel es maleable, hasta que los enlaces reversibles se vuelvan a formar. Por lo tanto, en una realización, el procedimiento proporciona un gel autorreparable.

**[0063]** En una realización de este aspecto de la invención, el hemiéster de boronato es un benzoxaborol o

25 benzoxaborinina opcionalmente sustituido. La posición bencílica del átomo de boro en un benzoxaborol o benzoxaborinina opcionalmente sustituido estabiliza el orbital p vacío del átomo de boro. Normalmente, el benzoxaborol o la benzoxaborinina pueden sustituirse por uno o más de H, F, Cl, NO<sub>2</sub>, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>, haloalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, fenilo y un anillo heteroaromático de cinco a seis miembros que comprende de 1

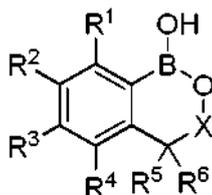
30 ejemplo, el ácido fenilbórico. Los glicosaminoglicanos reticulados producidos con un procedimiento según la invención pueden formar geles con un módulo de almacenamiento (elástico) más elevado en comparación con utilizar el ácido fenilbórico como un agente reticulante debido a las reticulaciones adicionales formadas entre el hemiéster de boronato y los grupos hidroxilo de los glicosaminoglicanos, como se muestra en el ejemplo 10. En otras

35 palabras, un glicosaminoglicano puede injertarse en un mayor grado de sustitución con un benzoxaborol que un glicosaminoglicano injertado con un ácido fenilbórico correspondiente. Esto es útil cuando se forma un gel junto con un glicosaminoglicano injertado con una fracción funcional de diol, en particular, un gel autorreparable.



benzoxaborinina    benzoxaborol

40 **[0064]** En una realización de este aspecto de la invención, el procedimiento comprende, además, previamente a la etapa de reticulación, injertar dicho segundo glicosaminoglicano en dicho hemiéster de boronato, siendo dicho hemiéster de boronato un compuesto de fórmula (III),



III

45 donde

R<sup>1</sup> se selecciona de entre H, F, Cl, NO<sub>2</sub>, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>, haloalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> y alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>;

50 R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup> se seleccionan independientemente de entre H, F, Cl, haloalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>, NO<sub>2</sub>, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> y un grupo de unión que se une de forma covalente a dicho segundo glicosaminoglicano;

X se selecciona de entre CHR<sup>7</sup> y un enlace; y

R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup> y R<sup>7</sup> se seleccionan independientemente de entre H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, fenilo, y un anillo heteroaromático de cinco o seis miembros que comprende de 1 a 3 heteroátomos seleccionados de entre O, N y S, donde uno de R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup> es un grupo de unión.

5

**[0065]** En una realización de este aspecto de la invención, dicho primer y dicho segundo glicosaminoglicanos son ácido hialurónico.

**[0066]** En una realización de este aspecto de la invención, el peso molecular del glicosaminoglicano se encuentra entre 200-1500 kg/mol, preferentemente en el intervalo de 400-1100 kg/mol, más preferentemente de 500-1000 kg/mol, más preferentemente de 600-800 kg/mol.

**[0067]** En una realización de este aspecto de la invención, el peso molecular del glicosaminoglicano se encuentra entre 50-1000 kg/mol, tal como 50-500 kg/mol, tal como 50-200 kg/mol, tal como alrededor de 100 kg/mol.

15

**[0068]** En una realización de este aspecto de la invención, el grado de sustitución de los glicosaminoglicanos es 0,05-0,3, preferiblemente 0,1-0,2.

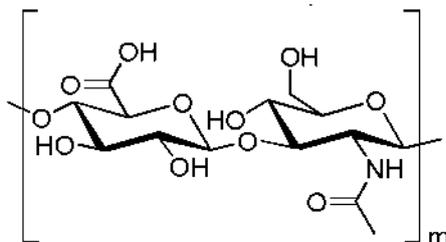
**[0069]** En una realización de este aspecto de la invención, el grado de sustitución de los glicosaminoglicanos es 0,05-0,7, preferentemente 0,1-0,6, más preferentemente 0,15-0,5. Se ha observado experimentalmente que estos intervalos del grado de sustitución del ácido hialurónico por un hemiéster de boronato y posteriormente mezclado con un glicosaminoglicano injertado con una fracción funcional de diol muestran mejores propiedades de gel (por ejemplo, G' y G''). El grado de sustitución puede medirse en los glicosaminoglicanos poliméricos sustituidos mediante RMN.

25

**[0070]** En una realización de este aspecto de la invención, dicho grupo de unión forma un enlace amida o un enlace éter con dicho segundo glicosaminoglicano.

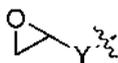
El injerto del compuesto de fórmula I en dicho segundo glicosaminoglicano puede hacerse, por ejemplo, mediante un enlace éter al hacer reaccionar, por ejemplo, un grupo hidroxilo de la cadena principal del glicosaminoglicano con una funcionalidad epoxi de dicho grupo de unión. El injerto del compuesto de fórmula I en dicho segundo glicosaminoglicano también puede hacerse utilizando cloruro de 4-(4,6-dimetoxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metilmorfolinio (DMTMM) para activar los grupos carboxílicos en dicho segundo glicosaminoglicano y hacer reaccionar las especies resultantes con una función amina de dicho grupo de unión para formar una amida estable.

**[0071]** Tal como se utiliza en esta invención, el término «cadena principal» se refiere a la cadena de polisacáridos en su forma nativa, es decir, grupos injertados en la cadena principal que no forman parte de la cadena principal. Como ejemplo, se muestra la cadena principal del ácido hialurónico a continuación.



40

**[0072]** En una realización de este aspecto de la invención, dicho grupo de unión es H<sub>2</sub>N-Y- o



y forma un enlace amida o un enlace éter con dicho segundo glicosaminoglicano;

**[0073]** Y se selecciona de entre un enlace y un alquileno C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> en el que uno o dos CH<sub>2</sub> se sustituyen opcionalmente por un grupo seleccionado de entre O, NH y fenileno, siendo el alquileno C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sustituido opcionalmente con 1 a 12 R<sup>8</sup>; y R<sup>8</sup> se selecciona de entre F, Cl, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>, haloalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>, fenilo, OH, hidroxialquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>, NH<sub>2</sub>, alquilamino N-C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>, dialquilamino N,N-C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>.

**[0074]** En una realización de este aspecto de la invención, R<sup>2</sup> es un grupo de unión.

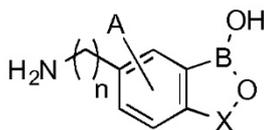
En una realización de este aspecto de la invención, dicho grupo de unión es HR<sup>9</sup>N-Y- y forma un enlace amida con dicho segundo glicosaminoglicano, donde R<sup>9</sup> se selecciona de entre hidrógeno, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> y

fluoroalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>; e

Y es un enlace o alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> no sustituido. El injerto del compuesto de fórmula I en dicho segundo glicosaminoglicano también puede hacerse utilizando cloruro de 4-(4,6-dimetoxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metilmorfolinio (DMTMM) para activar los grupos carboxílicos en dicho segundo glicosaminoglicano y hacer reaccionar las especies resultantes con una función amina (HR<sup>9</sup>N-Y-) de dicho grupo de unión para formar una amida estable.

**[0075]** En una realización de este aspecto de la invención, R<sup>9</sup> es hidrógeno.

**[0076]** En una realización de este aspecto de la invención, el hemiéster de boronato es



donde A se selecciona de entre H, F, CF<sub>3</sub>, NO<sub>2</sub>, OCH<sub>3</sub> y CH<sub>3</sub>;

n se selecciona de entre 0, 1, 2 y 3; y

X se selecciona de entre CH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>, CH-NC<sub>5</sub>H<sub>11</sub> (CH-piperidina) y C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.

**[0077]** En una realización de este aspecto de la invención, R<sup>1</sup>, R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup> se seleccionan independientemente de entre H, F, OCH<sub>3</sub>, CF<sub>3</sub> y CH<sub>3</sub>;

R<sup>2</sup> es un grupo de unión;

dicho grupo de unión es H<sub>2</sub>N-Y- y forma un enlace amida con dicho segundo glicosaminoglicano;

Y es un enlace o un alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> no sustituido;

X es un enlace o CH<sub>2</sub>; y

R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> se seleccionan independientemente de entre H y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>.

**[0078]** En una realización de este aspecto de la invención,

R<sup>1</sup> se selecciona de entre H, F y OCH<sub>3</sub>;

R<sup>2</sup> es un grupo de unión;

R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup> son hidrógeno;

dicho grupo de unión es -HN- y forma un enlace amida con dicho segundo glicosaminoglicano;

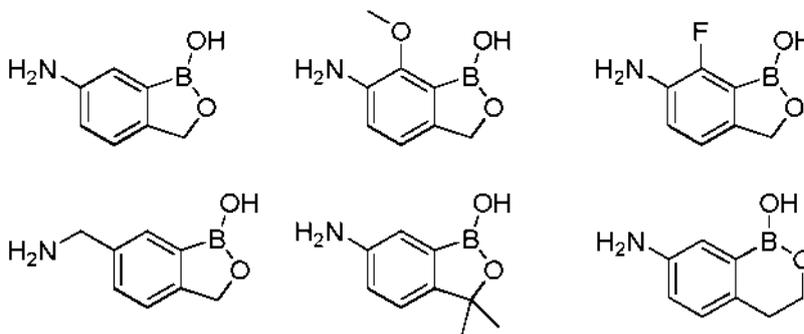
Y es un enlace o un metileno no sustituido;

X es un enlace o CH<sub>2</sub>; y

R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> se seleccionan independientemente de entre H y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>.

35

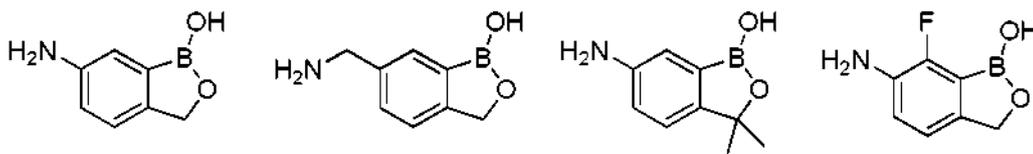
**[0079]** En una realización de este aspecto de la invención, dicho hemiéster de boronato se selecciona de entre



40

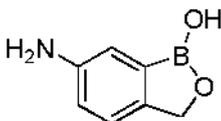
donde el hemiéster de boronato se injerta a dicho segundo glicosaminoglicano, por lo que el grupo -NH<sub>2</sub> del hemiéster de boronato forma una amida con una cadena principal de grupo carboxilato de dicho segundo glicosaminoglicano.

**[0080]** En una realización de este aspecto de la invención, dicho hemiéster de boronato se selecciona de entre



donde el hemiéster de boronato se injerta a dicho segundo glicosaminoglicano, por lo que el grupo  $-NH_2$  del hemiéster de boronato forma una amida con una cadena principal de grupo carboxilato de dicho segundo glicosaminoglicano.

**[0081]** En una realización de este aspecto de la invención, siendo dicho hemiéster de boronato



10

**[0082]** El compuesto anterior puede denominarse ácido 5-amino-2-hidroxi-2-fenilborónico. Según el nombre generado por la IUPAC en Biovia DRAW 4.2, debería denominarse 1-hidroxi-3H-2,1-benzoxaborol-amina.

**[0083]** En una realización de este aspecto de la invención, dicha porción de diol se selecciona de entre un monosacárido, un disacárido y un alditol o un derivado de los mismos. Normalmente, tal porción de diol se selecciona de entre una hexosa, una dihexosa y un alditol  $C_6$  o un derivado de los mismos.

**[0084]** En una realización de este aspecto de la invención, dicha porción de diol se selecciona de entre maltosa, fructosa, lactosa y sorbitol o un derivado de los mismos. Los derivados adecuados para unirse a un glicosaminoglicano son los derivados de la maltosa, la fructosa, la lactosa y el sorbitol. Tales derivados pueden ser un disulfuro de monosacárido o disacárido, o un aminoazúcar.

**[0085]** En una realización de la invención, dicha porción de diol se selecciona de entre el disulfuro de maltosa, el disulfuro lactobiónico, la 1-amino-1-deoxi-D-fructosa y el 1-amino-1-deoxi-D-sorbitol.

25

**[0086]** En una realización de este aspecto de la invención, dicha porción de diol es una fructosa o un derivado de la misma.

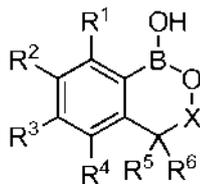
**[0087]** En un aspecto de la invención, se proporciona el uso de un hemiéster de boronato en la fabricación de glicosaminoglicanos reticulados, siendo la reticulación mediante un anión de éster de alcoboronato formado entre una porción de diol de una fracción funcional de diol injertada en un primer glicosaminoglicano y un hemiéster de boronato injertado en un segundo glicosaminoglicano. El uso de un hemiéster de boronato para reticular los glicosaminoglicanos no excluye que los glicosaminoglicanos se reticulen aún más. Un hemiéster de boronato tiene mayor afinidad por los dioles que, por ejemplo, el ácido fenilbórico. Un hemiéster de boronato puede formar geles con un módulo de almacenamiento (elástico) más elevado en comparación con utilizar el ácido fenilbórico como un agente reticulante debido a las reticulaciones adicionales formadas entre el hemiéster de boronato y los grupos hidroxilo de los glicosaminoglicanos, como se muestra en el ejemplo 10. En otras palabras, un glicosaminoglicano puede injertarse en un mayor grado de sustitución con un hemiéster de boronato que un glicosaminoglicano injertado con un ácido fenilbórico correspondiente. Esto es útil cuando se forma un gel junto con un glicosaminoglicano injertado con una fracción funcional de diol, en particular, un gel autorreparable. Por lo tanto, un hemiéster de boronato es un agente reticulante reversible más fuerte. El uso de un hemiéster de boronato en la fabricación de glicosaminoglicanos reticulados según la invención proporciona además propiedades de autorreparación al gel obtenido (véase, por ejemplo, la figura 5 y el ejemplo 30). El gel obtenido también es fácil de inyectar, ya que los enlaces reversibles se rompen al ser empujados a través de la jeringa y, a continuación, se vuelven a formar rápidamente en el interior del cuerpo. Los geles pueden inyectarse como sólidos preformados debido a que el gel sólido puede soportar los daños externos y repararse a sí mismo bajo una tensión de cizallamiento adecuada. Gracias a la rápida cinética de gelificación tras la extrusión/inyección, recuperan su forma sólida casi inmediatamente. De este modo, antes de que el gel se vuelva a formar dentro del cuerpo, el gel es maleable, hasta que los enlaces reversibles se vuelvan a formar. Por lo tanto, en una realización, el procedimiento proporciona un gel autorreparable. Los glicosaminoglicanos reticulados pueden, opcionalmente, estar más reticulados.

**[0088]** En una realización de este aspecto de la invención, el hemiéster de boronato es un benzoxaborol o benzoxaborinina opcionalmente sustituido. La posición bencílica del átomo de boro en un benzoxaborol o benzoxaborinina opcionalmente sustituido estabiliza el orbital p vacío del átomo de boro. Normalmente, el benzoxaborol o la benzoxaborinina pueden sustituirse por uno o más de H, F, Cl,  $NO_2$ , alquilo  $C_1-C_3$ , haloalquilo  $C_1-C_3$ , alcoxi  $C_1-C_3$ , cicloalquilo  $C_3-C_6$ , fenilo y un anillo heteroaromático de cinco a seis miembros que comprende de 1

55

a 3 heteroátomos seleccionados de entre O, N y S. El benzoxaborol tiene mayor afinidad por los dioles que, por ejemplo, el ácido fenilbórico. El benzoxaborol o la benzoxaborinina pueden formar geles con un módulo de almacenamiento (elástico) más elevado en comparación con utilizar el ácido fenilbórico como un agente reticulante debido a las reticulaciones adicionales formadas entre el hemiéster de boronato y los grupos hidroxilo de los glicosaminoglicanos, como se muestra en el ejemplo 10. En otras palabras, el glicosaminoglicano puede injertarse en un mayor grado de sustitución con un benzoxaborol que un glicosaminoglicano injertado con un ácido fenilbórico correspondiente, en particular, un gel autorreparable.

10 **[0089]** En una realización de este aspecto de la invención, dicho hemiéster de boronato es un compuesto de fórmula (IV)



IV

donde

15

R<sup>1</sup> se selecciona de entre H, F, Cl, NO<sub>2</sub>, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>, haloalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> y alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>;

R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup> se seleccionan independientemente de entre H, F, Cl, haloalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>, NO<sub>2</sub>, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> y un grupo de unión, uniéndose dicho grupo de unión de forma covalente a dicho segundo glicosaminoglicano;

20 X se selecciona de entre CHR<sup>7</sup> y un enlace; y

R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup> y R<sup>7</sup> se seleccionan independientemente de entre H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, fenilo, y un anillo heteroaromático de cinco o seis miembros que comprende de 1 a 3 heteroátomos seleccionados de entre O, N y S, donde uno de R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup> es un grupo de unión. La posición bencílica del átomo de boro en un compuesto de fórmula (IV) o en un benzoxaborol o benzoxaborinina opcionalmente sustituido estabiliza el orbital p vacío del átomo de boro. El grupo de unión en la posición R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> o R<sup>4</sup> es el grupo que une un compuesto de fórmula (IV) a dicho segundo glicosaminoglicano y, por lo tanto, permite el injerto de dicho compuesto en dicho segundo glicosaminoglicano.

25

30 **[0090]** En una realización de este aspecto de la invención, dichos glicosaminoglicanos son ácido hialurónico.

30

**[0091]** En una realización de este aspecto de la invención, el peso molecular del glicosaminoglicano se encuentra entre 200-1500 kg/mol, preferentemente en el intervalo de 400-1100 kg/mol, más preferentemente de 500-1000 kg/mol, más preferentemente de 600-800 kg/mol.

35 **[0092]**

En una realización de este aspecto de la invención, el peso molecular del glicosaminoglicano se encuentra entre 50-1000 kg/mol, tal como 50-500 kg/mol, tal como 50-200 kg/mol, tal como alrededor de 100 kg/mol.

**[0093]** En una realización de este aspecto de la invención, el grado de sustitución de los glicosaminoglicanos es 0,05-0,3, preferiblemente 0,1-0,2. Se ha observado experimentalmente que estos intervalos del grado de sustitución del ácido hialurónico por un hemiéster de boronato y posteriormente mezclado con un glicosaminoglicano injertado con una fracción funcional de diol muestran mejores propiedades de gel (por ejemplo, G' y G''). El grado de sustitución puede medirse en los glicosaminoglicanos poliméricos sustituidos mediante RMN.

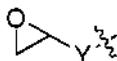
40

**[0094]** En una realización de este aspecto de la invención, dicho grupo de unión es capaz de formar un enlace amida o un enlace éter con dicho segundo glicosaminoglicano. Según esta realización, el grupo de unión forma un enlace amida o un enlace éter, respectivamente, con la cadena principal de dicho segundo glicosaminoglicano. Se puede formar un enlace éter haciendo reaccionar el grupo hidroxilo de la cadena principal del glicosaminoglicano con una funcionalidad epoxi del grupo de unión. Se puede formar un enlace amida entre un grupo de unión que comprende una función amina y un glicosaminoglicano utilizando cloruro de 4-(4,6-dimetoxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metilmorfolinio (DMTMM) para activar los grupos carboxílicos en el segundo glicosaminoglicano y hacer reaccionar las especies resultantes con una función amina de dicho grupo de unión para formar una amida estable. El uso de un compuesto de fórmula (IV) con un grupo de unión capaz de formar un enlace amida o un enlace éter con dicho segundo glicosaminoglicano permite una síntesis más fácil con menos etapas para injertar un hemiéster de boronato a un glicosaminoglicano.

55

**[0095]** En una realización de este aspecto de la invención, R<sup>2</sup> es un grupo de unión.

**[0096]** En una realización de este aspecto de la invención, dicho grupo de unión es HR<sup>9</sup>N-Y- o



5

y capaz de formar un enlace amida o un enlace éter con dicho segundo glicosaminoglicano, donde R<sup>9</sup> se selecciona de entre hidrógeno, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> y fluoroalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>;

Y se selecciona de entre un enlace y un alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> en el que uno o dos CH<sub>2</sub> se sustituyen opcionalmente por un grupo seleccionado de entre O, NH y fenileno, siendo el alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sustituido opcionalmente con 1 a 12 R<sup>8</sup>; y

10 R<sup>8</sup> se selecciona de entre F, Cl, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>, haloalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>, fenilo, OH, hidroxialquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>, NH<sub>2</sub>, alquilamino N-C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>, dialquilamino N,N-C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>.

**[0097]** En una realización de este aspecto de la invención, dicho grupo de unión es HR<sup>9</sup>N-Y- y es capaz de formar un enlace amida con dicho segundo glicosaminoglicano, en el que R<sup>9</sup> se selecciona de entre el hidrógeno,

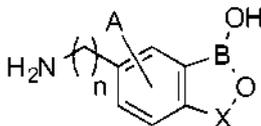
15 alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> y fluoroalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>; e Y es un enlace o un alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> no sustituido. Según esta realización, el grupo de unión forma un enlace amida con la cadena principal de dicho segundo glicosaminoglicano. Se puede formar un enlace amida entre un grupo de unión HR<sup>9</sup>N-Y- y un glicosaminoglicano utilizando cloruro de 4-(4,6-

dimetoxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metilmorfolinio (DMTMM) para activar los grupos carboxílicos en el segundo glicosaminoglicano y hacer reaccionar las especies resultantes con una función amina (HR<sup>9</sup>N-Y-) de dicho grupo de

20 unión para formar una amida estable. El uso de un compuesto de fórmula (IV) con un grupo de unión HR<sup>9</sup>N-Y- produce una síntesis más fácil con menos pasos para injertar un hemiéster de boronato en un glicosaminoglicano.

**[0098]** En una realización de este aspecto de la invención, R<sup>9</sup> es hidrógeno.

25 **[0099]** En una realización de este aspecto de la invención, el hemiéster de boronato es



30 donde A se selecciona de entre H, F, CF<sub>3</sub>, NO<sub>2</sub>, OCH<sub>3</sub> y CH<sub>3</sub>;

30

n se selecciona de entre 0, 1, 2 y 3; y

X se selecciona de entre CH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>, CH-NC<sub>5</sub>H<sub>11</sub> (CH-piperidina) y C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.

35 **[0100]** En una realización de este aspecto de la invención, R<sup>1</sup>, R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup> se seleccionan independientemente de entre H, F, CF<sub>3</sub> y CH<sub>3</sub>;

R<sup>2</sup> es un grupo de unión;

dicho grupo de unión es H<sub>2</sub>N-Y- y es capaz de formar un enlace amida con dicho segundo glicosaminoglicano;

Y es un enlace o un alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> no sustituido;

40 X es un enlace o CH<sub>2</sub>; y

R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> se seleccionan independientemente de entre H y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>.

**[0101]** En una realización de este aspecto de la invención,

R<sup>1</sup> se selecciona de entre H, F y OCH<sub>3</sub>;

45 R<sup>2</sup> es un grupo de unión;

R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup> son hidrógeno;

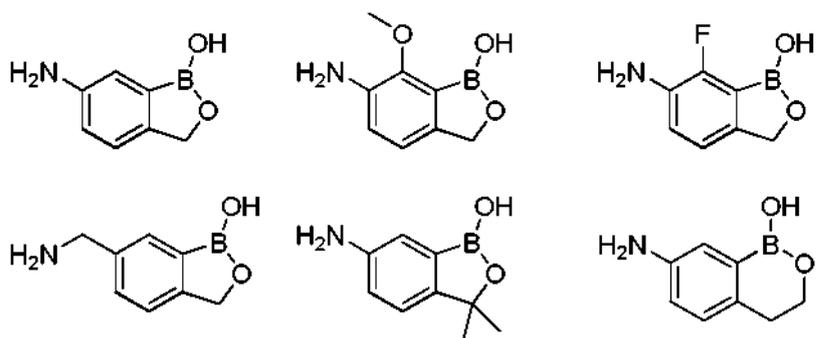
dicho grupo de unión es -HN- y forma un enlace amida con dicho segundo glicosaminoglicano;

Y es un enlace o un metileno no sustituido;

X es un enlace o CH<sub>2</sub>; y

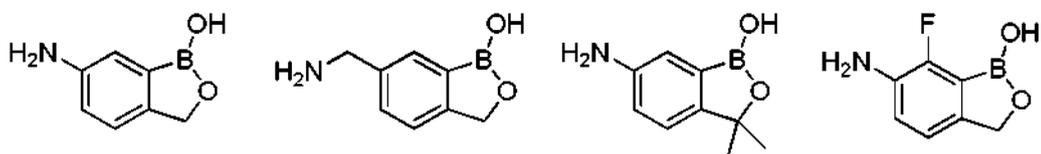
50 R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> se seleccionan independientemente de entre H y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>.

**[0102]** En una realización de este aspecto de la invención, dicho hemiéster de boronato se selecciona de entre



5 donde el hemiéster de boronato se injerta a dicho segundo glicosaminoglicano, por lo que el grupo  $-NH_2$  del hemiéster de boronato forma una amida con una cadena principal de grupo carboxilato de dicho segundo glicosaminoglicano.

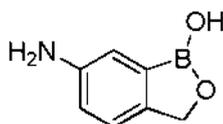
[0103] En una realización de este aspecto de la invención, dicho hemiéster de boronato se selecciona de entre



10

donde el hemiéster de boronato se injerta a dicho segundo glicosaminoglicano, por lo que el grupo  $-NH_2$  del hemiéster de boronato forma una amida con una cadena principal de grupo carboxilato de dicho segundo glicosaminoglicano.

15 [0104] En una realización de este aspecto de la invención, dicho hemiéster de boronato es



20 [0105] En una realización de este aspecto de la invención, dicha porción de diol se selecciona de entre un monosacárido, un disacárido y un alditol o un derivado de los mismos. Normalmente, tal porción de diol se selecciona de entre una hexosa, una dihexosa y un alditol  $C_6$  o un derivado de los mismos.

25 [0106] En una realización de este aspecto de la invención, dicha porción de diol se selecciona de entre maltosa, fructosa, lactosa y sorbitol o un derivado de los mismos. Los derivados adecuados para unirse a un glicosaminoglicano son los derivados de la maltosa, la fructosa, la lactosa y el sorbitol. Tales derivados pueden ser un disulfuro de monosacárido o disacárido, o un aminoazúcar.

30 [0107] En una realización de la invención, dicha porción de diol se selecciona de entre el disulfuro de maltosa, el disulfuro lactobiónico, la 1-amino-1-deoxi-D-fructosa y el 1-amino-1-deoxi-D-sorbitol.

[0108] En una realización de este aspecto de la invención, dicha porción de diol es una cetosa o un derivado de la misma.

35 [0109] En una realización de este aspecto de la invención, dicha porción de diol es una cetosa o un derivado de la misma.

[0110] En una realización de este aspecto de la invención, dicha porción de diol es una fructosa o un derivado de la misma.

40 [0111] En un aspecto de la invención, se proporciona una composición polimérica que comprende glicosaminoglicanos reticulados según la invención y una solución amortiguadora acuosa. La composición polimérica es opcionalmente un hidrogel autorreparable con un mayor grado de sustitución que un gel a base de reticulación de ácido fenilbórico. La solución amortiguadora es normalmente un tampón HEPES. El producto de glicosaminoglicanos reticulados es preferentemente biocompatible. Esto implica que no se produce ninguna respuesta inmunológica o

solo una respuesta muy leve en el individuo tratado. Es decir, no se producen efectos locales o sistémicos indeseables o son muy leves en el individuo tratado.

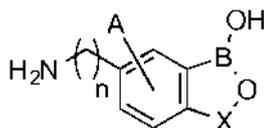
- 5 **[0112]** El producto reticulado según la descripción es un gel o un hidrogel. Es decir, puede considerarse un sistema reticulado de moléculas de glicosaminoglicanos insoluble en agua, pero sustancialmente diluido cuando se somete a un líquido, normalmente un líquido acuoso.
- [0113]** Glicosaminoglicanos reticulados producidos conforme al procedimiento según la invención.
- 10 **[0114]** Según los aspectos relacionados, la presente descripción también proporciona el uso del producto de hidrogel como medicamento, tal como en el tratamiento de los trastornos de los tejidos blandos. Se proporciona un procedimiento de tratar a un paciente que sufre de un trastorno de los tejidos blandos administrando al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz del producto de hidrogel. También se proporciona un procedimiento de proporcionar un tratamiento correctivo o estético a un paciente administrando a éste una cantidad terapéuticamente eficaz del producto de hidrogel.
- 15 **[0115]** Según otros aspectos ilustrados en esta invención, se proporciona un producto de hidrogel obtenido mediante el procedimiento inventivo para su uso como medicamento.
- 20 **[0116]** Según otros aspectos ilustrados en esta invención, se proporciona un producto de hidrogel obtenido mediante el procedimiento inventivo para su uso en el tratamiento de los trastornos de los tejidos blandos.
- [0117]** Según otros aspectos ilustrados en esta invención, se proporciona el uso de un producto de hidrogel obtenido mediante el procedimiento inventivo para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de los trastornos de los tejidos blandos.
- 25 **[0118]** Según otros aspectos ilustrados en esta invención, se proporciona un procedimiento de tratar a un paciente que sufre de un trastorno de los tejidos blandos administrando al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un producto de hidrogel obtenido mediante el procedimiento inventivo.
- 30 **[0119]** Según otros aspectos ilustrados en esta invención, se proporciona un procedimiento de proporcionar un tratamiento correctivo o estético a un paciente administrando al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un producto de hidrogel obtenido mediante el procedimiento inventivo.
- 35 **[0120]** Según otros aspectos ilustrados en esta invención, se proporciona un procedimiento de tratamiento de la piel cosméticamente, que comprende administrar a la piel un producto de hidrogel obtenido mediante el procedimiento inventivo.
- 40 **[0121]** Otros aspectos y realizaciones preferidas de la presente invención serán evidentes en los ejemplos adjuntos.
- [0122]** El gel de glicosaminoglicanos reticulados puede obtenerse simplemente a partir de mezclas de AH-BOR/AH-poliol en una solución amortiguadora fisiológica.
- 45 **[0123]** Debido a su importante contenido líquido, el producto de gel es estructuralmente flexible y similar al tejido natural, lo que lo hace muy útil como armazón en ingeniería de tejidos y para el aumento de los tejidos. También es útil para el tratamiento de los trastornos de los tejidos blandos y para el tratamiento correctivo o estético. Se utiliza preferentemente como formulación inyectable.
- 50 **[0124]** El producto de hidrogel puede estar presente en una solución acuosa, pero también puede estar presente en forma seca o precipitada, por ejemplo, en etanol.
- [0125]** El producto de hidrogel es preferentemente inyectable.
- 55 **[0126]** El ácido hialurónico puede obtenerse de varias fuentes de origen animal y no animal. Las fuentes de origen no animal incluyen la levadura y preferentemente las bacterias. El peso molecular de una única molécula de ácido hialurónico se encuentra normalmente en el intervalo de 0,1-10 kg/mol, pero son posibles otros pesos moleculares.
- 60 **[0127]** En ciertas realizaciones, la concentración de dicho ácido hialurónico se encuentra en el intervalo de 1 a 100 mg/ml. En algunas realizaciones, la concentración de dicho ácido hialurónico se encuentra en el intervalo de 2 a 50 mg/ml. En realizaciones específicas, la concentración de dicho ácido hialurónico se encuentra en el intervalo de 5 a 30 mg/ml o en el intervalo de 10 a 30 mg/ml. El ácido hialurónico reticulado comprende reticulaciones entre las cadenas de ácido hialurónico, lo que crea una red continua de moléculas de ácido hialurónico que se mantiene unida por reticulaciones covalentes reversibles.
- 65

**[0128]** Una aplicación típica del producto de hidrogel resultante conlleva la preparación de formulaciones inyectables para el tratamiento de los trastornos de los tejidos blandos, incluidos, entre otros, los tratamientos correctivos y estéticos.

5

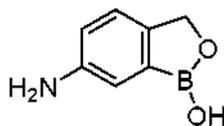
**[0129]** El término «peso molecular», tal como se utiliza en esta invención en relación con diversos polímeros, por ejemplo, los polisacáridos, se refiere al peso molecular medio en peso (PM) de los polímeros, que está bien definido en la literatura científica. El peso molecular medio en peso puede determinarse, por ejemplo, mediante la dispersión de la luz estática, la dispersión de neutrones de ángulo pequeño, la dispersión de rayos X y la velocidad de sedimentación. La unidad del peso molecular para los polímeros es g/mol. El experto en la materia comprende que la presente invención no está limitada en modo alguno a las representaciones preferidas descritas en esta invención. Por el contrario, son posibles muchas modificaciones y variaciones dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas. Adicionalmente, las variaciones de las realizaciones descritas pueden ser comprendidas y llevadas a cabo por el experto en la materia al aplicar la invención reivindicada, a partir de un estudio de los dibujos, de la descripción y de las reivindicaciones adjuntas. En las reivindicaciones, la palabra «que comprende» no excluye otros elementos o etapas, y el artículo indefinido «un/uno/una» o «unos/unas» no excluye una pluralidad. El mero hecho de que ciertas medidas se reciten en reivindicaciones dependientes mutuamente diferentes no indica que no se pueda utilizar una combinación de esas medidas para obtener beneficios.

20 **[0130]** Los derivados del ácido benzoboroxólico seleccionados consisten en, pero no se limitan a, compuestos de fórmula (I):



25 con A = H, F, CF<sub>3</sub>, NO<sub>2</sub>, OCH<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub>  
 n = 0, 1, 2 o 3  
 X = CH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>, CH-NC<sub>5</sub>H<sub>11</sub> (CH-piperidina), C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>

30 **[0131]** Los derivados preferidos del benzoboroxol son el benzoboroxol.



**[0132]** Un objeto de la invención es una composición polimérica que comprende una mezcla de:

35 a) polímero de AH modificado con boroxol injertado en el grupo de carboxilato con un grupo que comprende boroxol, y  
 b) poliol, preferiblemente monosacárido, disacárido y diol modificado con AH, y más preferentemente polímero de AH modificado con monosacárido, disacárido y cis-diol injertado en al menos un grupo hidroxilo o en el grupo carboxilato.

40

Más específicamente, los polioles que pueden utilizarse para formar derivados con AH son preferentemente fructosa, maltosa, glucosa, lactosa, manosa, galactosa, sorbitol o glicerol. El AH-boroxol obtenido es un compuesto de fórmula (III), como se ha definido anteriormente.

45 **[0133]** En un aspecto de la invención, se proporciona una composición polimérica que comprende glicosaminoglicanos (GAG) reticulados mediante enlaces éster de boronato reversibles.

**[0134]** En una realización de este aspecto de la invención, dicho glicosaminoglicano es ácido hialurónico (AH).

50

**[0135]** En una realización de este aspecto de la invención, el ácido hialurónico (AH) modificado con boroxol (BOR) es un polímero injertado en el grupo carboxilato que comprende boroxol.

**[0136]** En una realización de este aspecto de la invención, las composiciones comprenden una mezcla de:

55

a) el polímero injertado en el grupo carboxilato que comprende boroxol; y  
 b) el polímero de ácido hialurónico (AH) modificado con poliol injertado en al menos un hidroxilo con un grupo

que comprende un poliol.

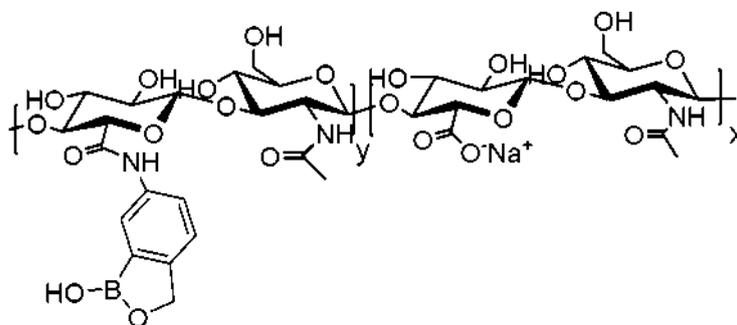
**[0137]** En una realización de este aspecto de la invención, la composición polimérica comprende ácido hialurónico, donde el polímero comprende reticulaciones por duplicado basadas en biopolímero que combina 5 enlaces de éter covalente y enlaces de éster reversible, donde, los enlaces de éter covalente estables se llevan a cabo entre el grupo hidroxilo del ácido hialurónico con 1,4- butanodiol diglicidil éter (BDDE), y donde los enlaces de éster reversible se forman entre el ácido hialurónico modificado con benzoboroxol y el ácido hialurónico modificado con polioles.

10 **[0138]** En una realización de este aspecto de la invención, las composiciones comprenden una mezcla de:

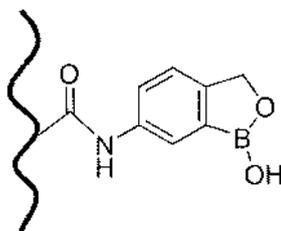
a) polímero de AH modificado con ácido iminodiacético (IDA) o dietanolamina (DEA) injertado en al menos un hidroxilo o en el grupo carboxilato con un grupo que comprende un derivado de IDA o DEA,

15 b) polímero de AH modificado con boroxol o ácido fenilbórico (PBA) injertado en el carboxilato que comprende un derivado de boroxol o PBA,

### HA-BOR

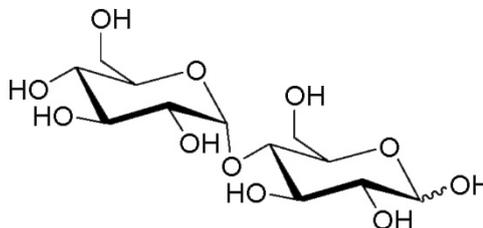


**[0139]** o

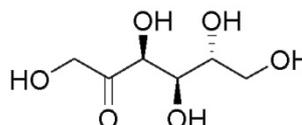


**[0140]** Los polialcoholes seleccionados consisten preferentemente en: maltosa, lactosa, fructosa y sorbitol.

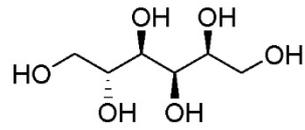
### Maltosa



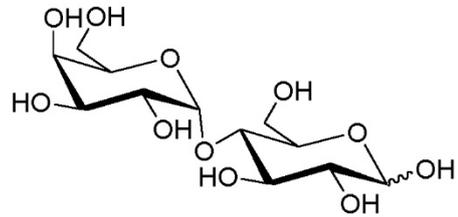
### Fructosa



Sorbitol

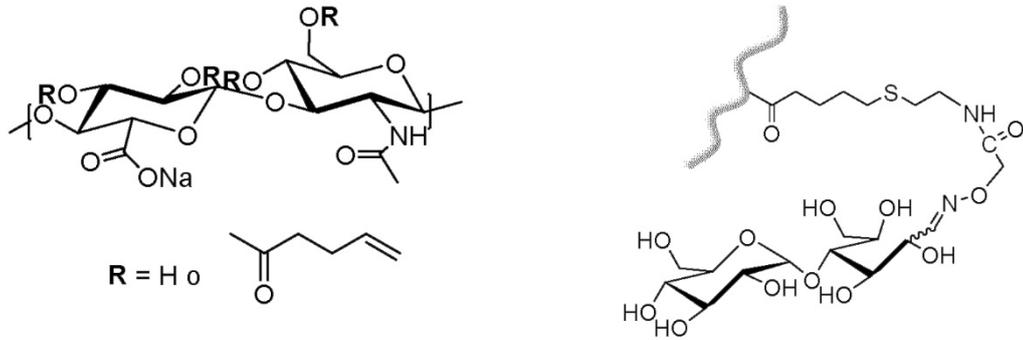


Lactosa

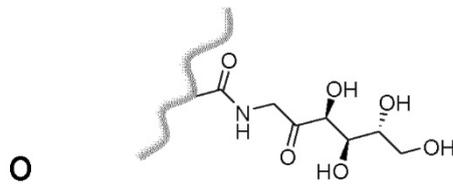
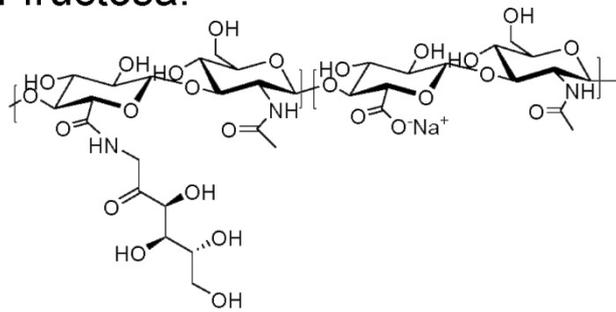


[0141] Los polioles de AH obtenidos son, por ejemplo:

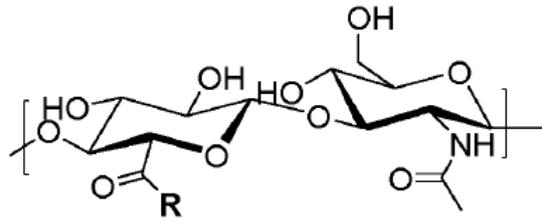
AH-maltosa:



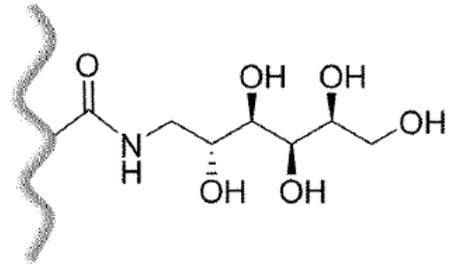
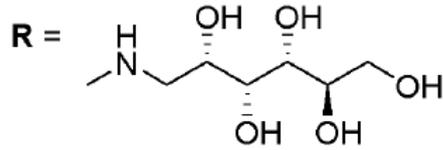
AH-fructosa:



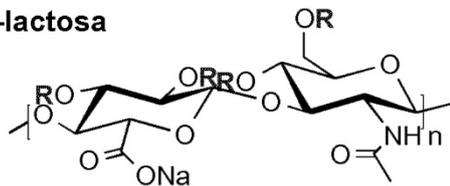
AH-sorbitol:



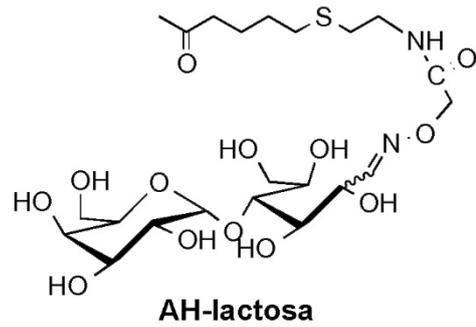
R = O<sup>-</sup>Na<sup>+</sup> or



AH-lactosa

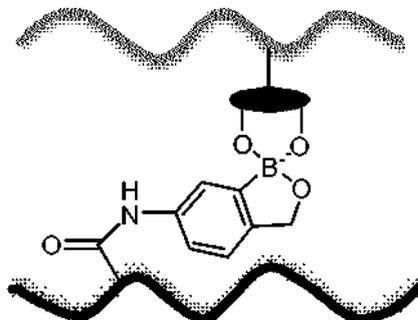


R = H o



AH-lactosa

5 [0142] El hidrogel que combina AH-BOR y AH-poliolés obtenidos según la invención es, por ejemplo:



[0143] En el texto de la presente solicitud, este símbolo  representa el poliól.

10

Breve descripción de las figuras

[0144]

Figura 1: análisis reológicos de mezclas de AH-BOR/AH-fructosa y AH-PBA/AH-fructosa en un tampón HEPES 0,01 M que contiene NaCl 0,15 M con un pH de 7,4, utilizando AH-BOR y AH-PBA con un GS de 0,15 (A) y con un GS más elevado de 0,4 y 0,5, respectivamente (B). Mediciones de la viscosidad de los derivados AH-BOR y AH-PBA junto con un GS de 0,15 (C) y con GS más elevados de 0,4 y 0,5, respectivamente (D).

Figura 2: fotografía de un gel obtenido con AH-BOR/AH-poliol

Figura 3: propiedades autorreparadoras de un gel dinámico de AH-BOR/AH-fructosa (CAH = 15 g/l) a 25 °C: recuperación del estrés del hidrogel después de cuatro ciclos de recuperación de rupturas inducidas por el estrés con un pH de 7,4.

Figura 4: análisis reológicos de mezclas de AH-BOR/AH-fructosa (A), AH-FBOR/AH-fructosa (B) y AH-PBA/AH-fructosa (C) en un tampón HEPES 0,01 M que contiene NaCl 0,15 M a diferentes pH (desde 4 a 8).

Figura 5: recuperación de  $G'$  y  $G''$  en función del tiempo posterior a la extrusión de los geles de AH-BOR o AH-DMABOR o AH-FBOR/AH-fructosa (PM = 100 kg/mol) a través de una aguja de calibre 27.

**[0145]** En los ejemplos y resultados mostrados se utilizarán los siguientes términos y características. Las definiciones son las siguientes:

**PM** - Peso molecular: la masa molecular media en masa.

**GS** - Grado de sustitución: el término «grado de sustitución» (GS), tal como se utiliza en esta invención en relación con diversos polímeros, por ejemplo, los polisacáridos, se refiere al número medio de grupos sustituyentes por unidad de disacáridos que se repite.

**[CP]** La concentración de polisacáridos (g/l).

**$G'$** : módulo de almacenamiento (elástico) (en Pa)  **$G''$** : módulo de pérdida (de viscosidad) (en Pa).

**$G' 1 \text{ Hz}$** : módulo de almacenamiento (en Pa) medido a una frecuencia de 1 Hz.

**$G'' 1 \text{ Hz}$** : módulo de pérdida de viscosidad (en Pa) medido a una frecuencia de 1 Hz.

**Comportamiento similar al de un gel**:  $G' > G''$  dentro del intervalo de frecuencias cubierto (0,01-10 Hz).

**Comportamiento viscoelástico**: comportamiento viscoso ( $G' < G''$ ) y elástico ( $G' > G''$ ) observado dentro del intervalo de frecuencias cubierto (0,01-10 Hz).

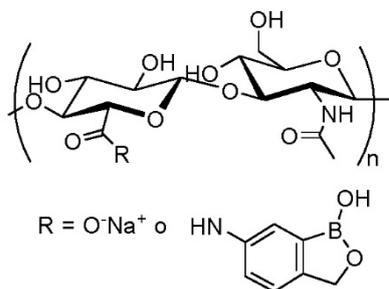
Los nombres IUPAC de los derivados del benzoboroxol en el ejemplo 4-11 se generan utilizando Biovia DRAW 4.2.

## 35 EJEMPLOS

**[0146]** Sin pretender quedar limitada por los mismos, la presente invención se ilustrará en lo sucesivo mediante ejemplos.

### 40 Ejemplo 1: síntesis de AH-BOR

**[0147]**



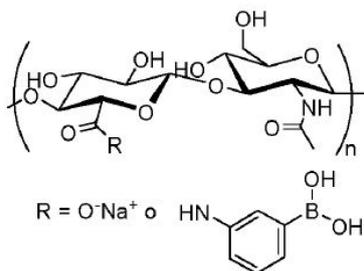
**[0148]** Se disolvió el agente de acoplamiento de aminoácidos 4-(4,6-dimetoxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metilmorfolinio (DMTMM) en 1 ml de agua y se añadió a una solución de AH nativo en una mezcla de agua/DMF (3/2, v/v). Se utilizó una concentración de AH en un medio de reacción de 3 g/l para muestras de AH de 75 y 100 kg/mol, mientras que se utilizó 2 g/l para AH con 600 kg/mol. A continuación, se añadió al medio de reacción clorhidrato de ácido 5-amino-2-hidroximetilfenilborónico (1-hidroxi-3H-2,1-benzoxaborol-amina, ABOR) solubilizado en 1 ml de agua. El pH se ajustó a 6,5 utilizando HCl o NaOH 0,5 M y la reacción se mantuvo bajo agitación a temperatura ambiente durante 24 h. El producto se purificó mediante diafiltración con agua ultrapura y se recuperó por liofilización. El grado de sustitución (GS) de AH-BOR se determinó mediante RMN de <sup>1</sup>H ( $GS_{RMN}$ ), y también se estimó a partir de la cinética de reacción realizada utilizando ácido sulfónico 2,4,6-trinitrobenzeno ( $GS_{TNBS}$ ). Este procedimiento consistió en cuantificar las aminas primarias libres en el medio de reacción en función del tiempo. La tabla 1 resume las relaciones molares DMTMM/AH y BOR/AH utilizadas para las síntesis con diferentes PM del AH,

así como el GS y los rendimientos de los conjugados AH-BOR.

**[0149] AH-BOR:** RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta_{\text{H}}$  (ppm) 4,55 (H-1 de la unidad N-acetilglucosamina), 4,25 (H-1 del ácido glucurónico), 3,9-3,1 (protones H-2, H-3, H-4, H-5, H-6 del AH), 2,08 ( $\text{CH}_3\text{-CO}$  del AH), 7,95 (s, 1H, NH-C-CH-C-B a partir del pH), 7,72 (m, 1H, C-CH-CH-C-C-B a partir del pH), 7,55 (m, 1H, C-CH-CH-C-C-B a partir del pH), 5,13 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{-O-B}$ ).

**Ejemplo 2: síntesis de AH-PBA (ejemplo comparativo)**

10 **[0150]**



**[0151]** El injerto de ácido fenilbórico se realizó según el ejemplo 1, pero utilizando sal de hemisulfato de ácido 3-aminofenilbórico (APBA) en lugar de clorhidrato de ácido 5-amino-2-hidroximetilfenilbórico (ABOR). El grado de sustitución (GS) de AH-PBA se determinó mediante RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{GS}_{\text{RMN}}$ ), y también se estimó a partir de la cinética de reacción realizada utilizando el ácido sulfónico 2,4,6-trinitrobenceno ( $\text{GS}_{\text{TNBS}}$ ). Este procedimiento consistió en cuantificar las aminas primarias libres en el medio de reacción en función del tiempo. La tabla 1 resume las relaciones molares DMTMM/AH y PBA/AH utilizadas para las síntesis con diferentes del PM AH, así como el GS y los rendimientos de los conjugados AH-PBA.

**[0152] AH-PBA:** RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta_{\text{H}}$  (ppm) 4,55 (H-1 de la unidad N-acetilglucosamina), 4,25 (H-1 del ácido glucurónico), 3,9-3,1 (protones H-2, H-3, H-4, H-5, H-6 del AH), 2,08 ( $\text{CH}_3\text{-CO}$  del AH), 7,93 (s, 1H, NH-C-CH-C-B a partir del pH), 7,7 (m, 2H, C-CH-CH-CH-C-B a partir del pH), 7,55 (m, 1H, C-CH-CH-C<sup>3</sup>H-C-B a partir del pH).

Tabla 1. Síntesis de AH-BOR y AH-PBA.

Derivado del AH-ácido borónico	PM de AH (kg/mol)	Relación molar DMTMM/AH	Relación molar BOR o PBA/AH	$\text{GS}_{\text{RMN}}^{\text{a}}$	$\text{GS}_{\text{TNBS}}$	Rendimiento (%) <sup>b</sup>
AH-BOR	75	1	0,16	0,16	0,16	75
AH-BOR	100	1	0,16	0,12	0,14	85
AH-BOR	600	1	0,14	0,11	0,13	75
AH-PBA	75	1	0,16	0,16	0,16	75
AH-PBA	100	1	0,16	0,16	0,16	77
AH-PBA	600	1	0,14	0,14	0,14	78

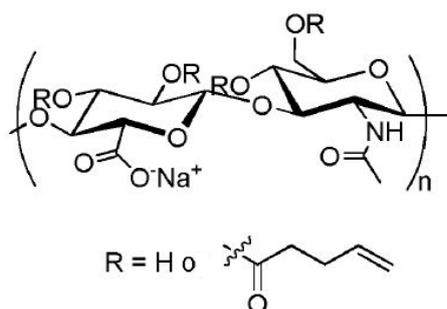
<sup>a</sup>GS mediante RMN de  $^1\text{H}$ : 10 % de precisión.

<sup>b</sup>Rendimiento de AH-BOR o AH-PBA: cálculo considerando el  $\text{GS}_{\text{RMN}}$ .

**Ejemplo 3: síntesis de AH modificado con pentoato**

30

**[0153]**



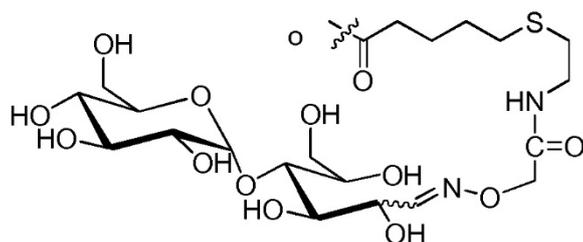
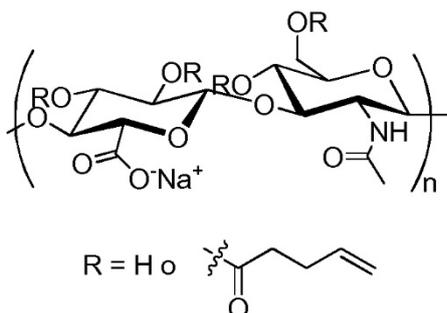
**[0154]** Se disolvió AH (1g, 2,5 mmol, PM = 100 kg/mol) en agua ultrapura (50 ml) bajo agitación continua durante la noche a 4 °C. A continuación, se añadió DMF (33 ml) gota a gota para obtener una relación agua/DMF de (3/2, v/v). Se añadió anhídrido 4-pentenoico (0,454 g, 2,5 mmol) mientras se mantuvo el pH entre 8 y 9 añadiendo NaOH 1 M durante al menos 4 h. La reacción se mantuvo a 4 °C bajo agitación durante una noche. El producto se purificó mediante diafiltración con agua ultrapura y se recuperó por liofilización. Se halló que el grado de sustitución (GS) del AH-pentanoato era de  $0,18 \pm 0,01$  mediante RMN de  $^1\text{H}$ . Se calculó un rendimiento del 49 % considerando su GS.

10 RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta_{\text{H}}$  (ppm) 4,71 (H-1 de la unidad N-acetilglucosamina), 4,53 (H-1 del ácido glucurónico), 4,13-3,2 (protones H-2, H-3, H-4, H-5, H-6 del AH), 2,1 ( $\text{CH}_3\text{-CO}$  del AH), 6,0 (m, 1H,  $\text{CH}=\text{CH}_2$ ), 5,18 (m, 2H,  $\text{CH}=\text{CH}_2$ ), 2,62 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{-C}=\text{O}$ ), 2,45 (m, 2H,  $\text{OCCH}_2\text{-CH}_2$ ).

#### Ejemplo 4: síntesis de AH-maltosa

15

**[0155]**



#### 20 a. Disulfuro de maltosa

**[0156]** Se añadió O-(carboximetil)hidroxilamina hemihidrocloruro (0,0768 g, 0,694 mmol) a una solución acuosa de maltosa (0,25 g, 0,694 mmol) en 25 ml de agua ultrapura a temperatura ambiente. El pH se ajustó a 4,8 utilizando NaOH 0,5 M. La mezcla de reacción se agitó durante 24 horas a temperatura ambiente y, a continuación, se neutralizó a pH 7 mediante la adición de NaOH 0,5 M. A continuación, el derivado de maltosa-COOH se recuperó mediante liofilización sin purificación adicional como un polvo blanco (46 mol% de maltosa-COOH/maltosa). A una solución de maltosa-COOH (0,25 g, 0,622 mmol) en DMF seco (50 ml) se añadieron sucesivamente hidroxibenzotriazol (HOBt) (0,1875 g, 1,39 mmol), diisopropilcarbodiimida (DIC) (0,3483 g, 2,8 mmol) y dihidrocloruro de cistamina (0,094 g, 0,42 mmol). La mezcla resultante se agitó durante la noche a temperatura ambiente bajo nitrógeno. Tras la evaporación de la mayor parte del disolvente, el jarabe residual se vertió gota a gota en acetona (500 ml) bajo agitación. El precipitado blanco se recogió por filtración, se lavó tres veces con acetona y se secó para obtener el disulfuro de maltosa deseado con un rendimiento del 60 % (0,295 g, 0,625 mmol).

30

**[0157]** RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta_{\text{H}}$  (ppm) 7,75 (1H,  $\text{H}\beta$  anomérico de la unidad de glucosa enlazada,  $\text{N}=\text{CH}\beta^-$ ), 7,13 (1H,  $\text{H}\alpha$  anomérico de la unidad de glucosa enlazada,  $\text{N}=\text{CH}\alpha^-$ ), 5,4 (1H, H anomérico de la unidad de glucosa enlazada de maltosa), 5,19 (1H,  $\text{H}\alpha$  anomérico de la unidad de glucosa enlazada), 5,14 (1H, H anomérico de la unidad de glucosa sin enlazar de disulfuro de maltosa), 4,7 (1H,  $\text{H}\beta$  anomérico de la unidad de glucosa sin enlazar), 4,66 (2H,  $\text{N}-\text{O}-\text{CH}_2$ ), 4,6 (1H,  $\text{N}=\text{CH}\alpha,\beta-\text{CH}(\text{OH})$  del grupo de glucosa enlazada), 3,4-4,2 (8H, H-3, H-4, H-5, H-6 del grupo de glucosa enlazada y sin enlazar), 2,95 (4H,  $\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2$ ).

#### b. AH-maltosa

10

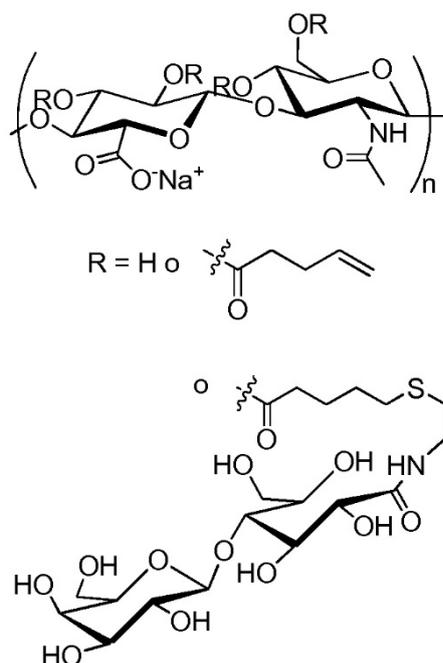
**[0158]** La primera etapa consistió en reducir el enlace disulfuro del disulfuro de maltosa. Por lo tanto, se añadió una solución de TCEP (91 mg, 0,317 mmol) en 1 ml de tampón fosfato salino (PBS) desgasificado a una solución acuosa de este derivado (0,2 g, 0,211 mmol) en 4 ml de PBS desgasificado con un pH de 7,4 a temperatura ambiente, y se ajustó el pH a 5-5,5. La mezcla se agitó durante 15 minutos bajo nitrógeno a temperatura ambiente para producir disulfuro de maltosa. El pH se ajustó a 7,4 utilizando NaOH 0,5 M y la mezcla se añadió a AH-pentanoato solubilizado en PBS en presencia de Irgacure 2959 (0,1 %, p/v) como un fotoiniciador. El injerto de las fracciones de disulfuro de maltosa se realizó bajo radiación UV ( $\lambda = 365 \text{ nm}$ , a  $20 \text{ mW/cm}^2$  durante 15 min). El producto se purificó mediante diafiltración con agua ultrapura y se recuperó por liofilización. Se halló que el grado de sustitución (GS) de AH-maltosa era de  $0,1 \pm 0,01$  mediante RMN de  $^1\text{H}$ .

15

20 RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta_{\text{H}}$  (ppm) 4,55 (H-1 de la unidad N-acetilglucosamina), 4,25 (H-1 del ácido glucurónico), 3,9-3,1 (protones H-2, H-3, H-4, H-5, H-6 del AH), 1,85 ( $\text{CH}_3-\text{CO}$  del AH), 1,52 (m, 2H,  $\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}$ ), 1,62 (m, 2H,  $\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}$ ), 2,35 (m, 2H,  $\text{OC}-\text{CH}_2$ ), 2,63 (m, 2H,  $\text{C}^3\text{H}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}$ ), 2,82 (m, 2H,  $\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}$ ), 7,63 (m, 1H, H anomérico de maltosa).

#### 25 Ejemplo 5: síntesis de AH-lactobiónico

**[0159]**



#### 30 a. Disulfuro lactobiónico

**[0160]** A una solución de ácido lactobiónico (0,5023 g, 1,39 mmol) en DMF seco (50 ml), se añadieron sucesivamente hidroxibenzotriazol (HOBt) (0,3768 g, 2,79 mmol), diisopropilcarbodiimida (DIC) (0,705 g, 5,56 mmol) y dihidrocloruro de cistamina (0,141 g, 0,626 mmol). La mezcla resultante se agitó durante la noche a temperatura ambiente bajo nitrógeno. Tras la evaporación de la mayor parte del disolvente, el jarabe residual se vertió gota a gota en acetona (500 ml) bajo agitación. El precipitado blanco se recogió mediante filtración, se lavó tres veces con acetona y se secó para obtener el disulfuro lactobiónico deseado con un rendimiento del 29 % (0,2362 g, 0,585 mmol).

#### 40 b. AH-lactobiónico

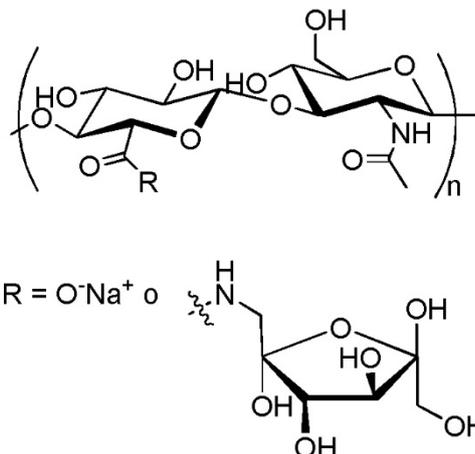
**[0161]** Se realizó una primera etapa de reducción del enlace disulfuro del derivado del disulfuro lactobiónico

(0,2 g, 0,211 mmol) disuelto en 1 ml de PBS desgasificado al añadir TCEP (91 mg, 0,317 mmol) en 1 ml de PBS desgasificado, con el pH ajustado a 5-5,5. La mezcla se agitó durante 15 minutos bajo nitrógeno a temperatura ambiente para producir disulfuro lactobiónico. El pH se ajustó a 7,4 utilizando NaOH 0,5 M y la mezcla se añadió a AH-pentanoato solubilizado en PBS en presencia de Irgacure 2959 (0,1 %, p/v) como un fotoiniciador. El injerto de las fracciones de disulfuro lactobiónico se realizó bajo radiación UV ( $\lambda = 365 \text{ nm}$ , a  $20 \text{ mW/cm}^2$  durante 15 min). El producto se purificó mediante diafiltración con agua ultrapura y se recuperó por liofilización. Se halló que el grado de sustitución (GS) del AH-lactobiónico era de  $0,2 \pm 0,01$  mediante RMN de  $^1\text{H}$ .

### Ejemplo 6: síntesis de AH-fructosa

10

[0162]



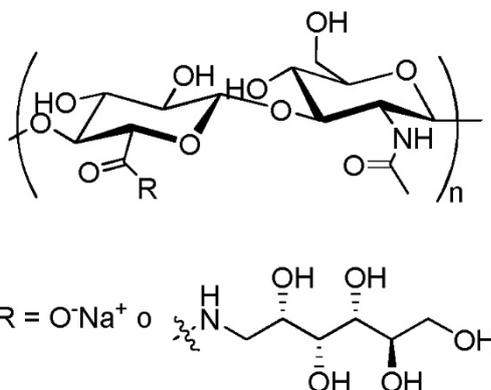
[0163] Se añadió clorhidrato de 1-amino-1-deoxi-D-fructosa (0,0121 g, 0,056 mmol) disuelto en 1 ml de agua ultrapura a una solución de AH nativo (0,15 g, 0,374 mmol) en una mezcla de agua/DMF (3/2, v/v) en presencia de cloruro de 4-(4,6-dimetoxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metilmorfolinio (DMTMM) (0,1035 g, 0,374 mmol) como agente de acoplamiento de aminoácidos. El pH se ajustó a 6,5 utilizando HCl o NaOH 0,5 M y la reacción se mantuvo bajo agitación a temperatura ambiente durante 24 h. El producto se purificó mediante diafiltración con agua ultrapura y se recuperó por liofilización. El grado de sustitución (GS) de AH-fructosa se determinó mediante RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{GS}_{\text{RMN}} = 0,15 \pm 0,01$ ), y también se estimó a partir de la cinética de reacción realizada utilizando el ácido sulfónico 2,4,6-trinitrobenzeno ( $\text{GS}_{\text{TNBS}} = 0,14$ ). Se determinó un rendimiento del 84 % para el AH-fructosa (considerando su  $\text{GS}_{\text{RMN}}$ ).

RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta_{\text{H}}$  (ppm) 4,62 (H-1 de la unidad N-acetilglucosamina), 4,46 (H-1 del ácido glucurónico), 4,05-3,2 (18H, H-2, H-3, H-4, H-5, H-6 protones de AH y de fracciones de fructosa), 2,02 ( $\text{CH}_3\text{-CO}$  del AH).

25

### Ejemplo 7: síntesis de AH-sorbitol

[0164]



30

[0165] Se añadió clorhidrato de 1-amino-1-deoxy-D-sorbitol (D-glucamina) (0,0088 g, 0,05 mmol) disuelto en 1 ml de agua ultrapura a una solución de AH nativo (0,1305 g, 0,325 mmol) en agua ultrapura en la presencia de cloruro de 4-(4,6-dimetoxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metilmorfolinio (DMTMM) (0,09 g, 0,325 mmol) como agente de acoplamiento de aminoácidos. El pH se ajustó a 6,5 utilizando HCl o NaOH 0,5 M y la reacción se mantuvo bajo agitación a temperatura ambiente durante 164 h. El producto se purificó mediante diafiltración con agua ultrapura y se recuperó por liofilización. El grado de sustitución (GS) de AH-sorbitol se determinó mediante RMN de  $^{13}\text{C}$

35

( $GS_{RMN} = 0,15 \pm 0,1$ ), y también se estimó a partir de la cinética de reacción realizada utilizando el ácido sulfónico 2,4,6-trinitrobenzeno ( $GS_{TNBS} = 0,1$ ). Se determinó un rendimiento del 76 % para AH-fructosa (considerando su  $DS_{RMN}$ ).

RMN de  $^1H$  (400 MHz,  $D_2O$ )  $\delta_H$  (ppm) 4,68 (H-1 de la unidad *N*-acetilglucosamina), 4,51 (H-1 del ácido glucurónico), 4,1-3,3 (19H, H-2, H-3, H-4, H-5, H-6 protones de AH y de fracciones de sorbitol), 2,07 ( $CH_3$ -CO del AH).

#### **Ejemplo 8: preparación del gel de AH-BOR/AH-poliol**

**[0166]** Se prepararon soluciones de AH-BOR y de los derivados de AH-poliol (AH-maltosa o AH-lactobiónico o AH-fructosa o AH-sorbitol) a 15 g/l en un tampón HEPES 0,01 M que contenía NaCl 0,15 M con un pH de 7,4, y se mantuvieron bajo agitación durante toda la noche a 4 °C. Se prepararon combinaciones del derivado de AH-BOR/AH-poliol mezclando una solución que contenía AH-BOR con una solución que contenía un derivado de AH-poliol con un pH fisiológico, a una concentración polimérica total de 15 g/l y con una relación molar BOR/poliol de 1/1.

**[0167]** Resultados: los geles se formaron casi instantáneamente al mezclar la solución de AH-BOR con una solución de un derivado de AH-poliol. Las características de las mezclas resultantes de AH-BOR/AH-poliol se resumen en la tabla 2.

#### **Ejemplo 9: preparación del gel de AH-PBA/AH-poliol (ejemplo comparativo)**

**[0168]** Los geles AH-PBA/AH-poliol se prepararon según el ejemplo 8, pero utilizando AH-PBA en lugar de AH-BOR.

**[0169]** Resultados: los geles se formaron casi instantáneamente al mezclar la solución de AH-BOR con una solución de un derivado de AH-poliol. Las características de las mezclas resultantes de AH-PBA/AH-poliol se resumen en la tabla 2.

Tabla 2: características de las mezclas de AH-BOR/AH-poliol y AH-PBA/AH-poliol en una solución tampón HEPES 0,01 M que contiene NaCl 0,15 M con un pH de 7,4 ( $[CP] = 15$  g/l, relación molar BOR o PBA/fructosa = 1/1).

AH-ácido borónico	GS AH-ácido borónico	AH-poliol	GS AH-poliol	PM de AH (kg/mol)	G' 1 Hz (Pa)	G'' 1 Hz (Pa)	Comportamiento reológico
AH-BOR	0,15	AH-maltosa	0,12	75	34	20	Viscoelástico
AH-BOR	0,15	AH-fructosa	0,15	75	515	17	Gel
AH-BOR	0,15	AH-sorbitol	0,15	75	250	125	Viscoelástico
AH-BOR	0,1	AH-fructosa	0,15	100	280	30	Gel
AH-BOR	0,15	AH-fructosa	0,15	100	275 ± 35	20,5 ± 2,5	Gel
AH-BOR	0,12	AH-lactobiónico	0,2	100	87	33	Viscoelástico
AH-BOR	0,1	AH-fructosa	0,08	600	250	80	Gel
AH-PBA	0,15	AH-maltosa	0,12	75	490	7	Gel
AH-PBA	0,15	AH-fructosa	0,15	75	447	6,6	Gel
AH-PBA	0,15	AH-sorbitol	0,15	75	150	45	Viscoelástico
AH-PBA	0,15	AH-fructosa	0,15	100	227 ± 12	8 ± 1,5	Gel
AH-PBA	0,15	AH-lactobiónico	0,2	100	439	21	Gel
AH-PBA	0,15	AH-fructosa	0,08	600	91	27	Gel

#### **Ejemplo 10: efecto de un mayor grado de sustitución (GS) en el comportamiento de los geles AH-BOR/AH-fructosa y AH-PBA/AH-fructosa**

**[0170]** Los geles AH-BOR/AH-fructosa y AH-PBA/AH-fructosa se prepararon según el ejemplo 8, pero utilizando derivados de AH-BOR y AH-PBA con un GS superior de 0,4 y 0,5, respectivamente.

**[0171]** Resultados: los geles se formaron casi instantáneamente al mezclar la solución de AH-BOR con una solución de AH-fructosa. Las características de las mezclas resultantes de AH-BOR o AH-PBA/AH-fructosa se resumen en la tabla 3. Se obtuvieron módulos dinámicos más elevados ( $G'$  y  $G''$ ) para el hidrogel de AH-BOR/AH-fructosa al utilizar AH-BOR con un GS más elevado, en comparación con la mezcla que utiliza AH-PBA con un GS de 0,5 (figura 1). Las mediciones de la viscosidad mostraron que las reticulaciones formadas entre las fracciones BOR y los grupos hidroxilo del AH conducen a un aumento de la viscosidad de la red del AH (figura 1). Por lo tanto, la doble reticulación de las fracciones de BOR/fructosa y BOR/AH contribuye a mejorar las propiedades del gel, en oposición a la mezcla de AH-PBA/AH-fructosa.

Tabla 3: características de las mezclas de AH-BOR/AH-poliol y AH-PBA/AH-poliol en una solución tampón HEPES 0,01 M que contiene NaCl 0,15 M con un pH de 7,4 ( $[CP] = 15 \text{ g/l}$ , relación molar BOR o PBA/fructosa = 1/1).

AH-ácido borónico	GS AH-ácido borónico	AH-poliol	GS AH-poliol	PM de AH (kg/mol)	$G'$ 1 Hz (Pa)	$G''$ 1 Hz (Pa)	Comportamiento reológico
AH-BOR	0,4	AH-fructosa	0,15	100	350	17	Gel
AH-PBA	0,5	AH-fructosa	0,15	100	185	5	Gel

15

#### Ejemplo 11: AH-benzoboroxol (AH-BOR)/AH-poliol:

**[0172]** Los geles obtenidos a partir de mezclas de AH modificado con benzoboroxol (AH-BOR)/AH-poliol se prepararon simplemente mezclando soluciones de los dos pares de AH solubilizados en un tampón HEPES 0,01 M con NaCl 0,15 M y con un pH fisiológico. Cuando estas soluciones se mezclaron con una concentración polimérica total de 15 g/l, y con una relación molar benzoboroxol/poliol de 1/1, se formaron geles transparentes de forma casi instantánea (figura 2).

**[0173]** Resultados: las características de las mezclas resultantes de AH-BOR/AH-poliol se resumen en la tabla 4. Se investigaron las propiedades de autorreparación de un gel dinámico de AH-BOR/AH-fructosa ( $CAH = 15 \text{ g/l}$ ) a 25 °C aplicando valores sucesivos de tensión de 1800 a 2100 Pa durante 2 min al mismo tiempo que se medían  $G'$  y  $G''$ . Estos se intercalaron con períodos de tiempo cortos en los cuales se aplicaron valores de tensión bajos (correspondientes a una tensión del 5 %) durante 3 min. Este experimento demostró la recuperación del estrés del gel de AH-BOR/AH-fructosa después de 4 ciclos de rupturas inducidas por el estrés. Un mayor estrés (entre 1800 y 2100 Pa) invirtió los valores de  $G'$  (círculos llenos) y  $G''$  (círculos vacíos), indicando la ruptura de las reticulaciones y la conversión al estado de solución.  $G'$  se recuperó bajo una pequeña tensión (5 %) en pocos segundos. Estos geles tienen propiedades de autorreparación (figura 3).

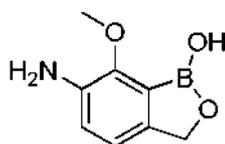
Tabla 4: características del hidrogel de AH-BOR/AH-poliol

GS del derivado de AH-BOR	Derivado de AH-poliol	GS del derivado de AH-poliol	PM de AH (kg/mol)	$G'$ 1 Hz (Pa)	$G''$ 1 Hz (Pa)	Comportamiento reológico
0,16	AH-maltosa	0,12	75	34	20	Viscoelástico
0,16	AH-fructosa	0,15	75	500	17	Gel
0,16	AH-sorbitol	0,15	75	250	125	Viscoelástico
0,12	AH-fructosa	0,15	100	490	7	Gel
0,11	AH-fructosa	0,08	600	250	80	Gel

35

#### Ejemplo 12: síntesis de AH-1-hidroxi-7-metoxi-3H-2,1-benzoxaborol-6-amina

**[0174]**



[0175] El ejemplo 12 se realiza según el ejemplo 1, pero utilizando clorhidrato de 1-hidroxi-7-metoxi-3H-2,1-benzoxaborol-6-amina como derivado ABOR en lugar de clorhidrato de 1-hidroxi-3H-2,1-benzoxaborol-amina.

**Ejemplo 13: preparación del gel de AH-1-hidroxi-7-metoxi-3H-2,1-benzoxaborol-6-amina/AH-poliol**

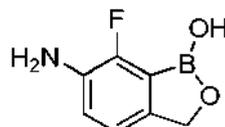
5

[0176] Los geles se preparan según el ejemplo 8, pero utilizando AH-1-hidroxi-7-metoxi-3H-2,1-benzoxaborol-6-amina en lugar de AH-BOR.

**Ejemplo 14: síntesis de AH-7-fluoro-1-hidroxi-3H-2,1-benzoxaborol-6-amina**

10

[0177]



[0178] El ejemplo 14 se realiza según el ejemplo 1, pero utilizando clorhidrato de 7-fluoro-1-hidroxi-3H-2,1-benzoxaborol-6-amina como derivado ABOR en lugar de clorhidrato de 1-hidroxi-3H-2,1-benzoxaborol-amina.

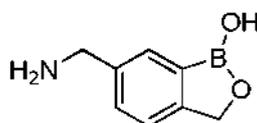
**Ejemplo 15: preparación del gel de AH-7-fluoro-1-hidroxi-3H-2,1-benzoxaborol-6-amina/AH-poliol**

[0179] Los geles se preparan según el ejemplo 8, pero utilizando AH-7-fluoro-1-hidroxi-3H-2,1-benzoxaborol-6-amina en lugar de AH-BOR.

**Ejemplo 16: síntesis de AH-(1-hidroxi-3H-2,1-benzoxaborol-6-il)metanamina**

[0180]

25



[0181] El ejemplo 16 se realiza según el ejemplo 1, pero utilizando clorhidrato de (1-hidroxi-3H-2,1-benzoxaborol-6-il)metanamina como derivado ABOR en lugar de clorhidrato de 1-hidroxi-3H-2,1-benzoxaborol-amina.

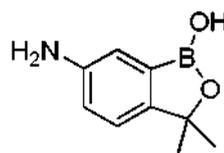
**Ejemplo 17: preparación del gel de AH-(1-hidroxi-3H-2,1-benzoxaborol-6-il)metanamina/AH-poliol**

[0182] Los geles se preparan según el ejemplo 8, pero utilizando AH-(1-hidroxi-3H-2,1-benzoxaborol-6-il)metanamina en lugar de AH-BOR.

**Ejemplo 18: síntesis de AH-1-hidroxi-3,3-dimetil-2,1-benzoxaborol-6-amina**

[0183]

\_\_\_\_\_



40

[0184] El ejemplo 18 se realiza según el ejemplo 1, pero utilizando clorhidrato de 1-hidroxi-3,3-dimetil-2,1-benzoxaborol-6-amina como derivado ABOR en lugar de clorhidrato de 1-hidroxi-3H-2,1-benzoxaborol-amina.

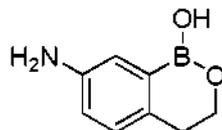
**Ejemplo 19: preparación del gel de AH-1-hidroxi-3,3-dimetil-2,1-benzoxaborol-6-amina/AH-poliol**

[0185] Los geles se preparan según el ejemplo 8, pero utilizando AH-1-hidroxi-3,3-dimetil-2,1-benzoxaborol-6-amina en lugar de AH-BOR.

**Ejemplo 20: síntesis de AH-1-hidroxi-3,4-dihidro-2,1-benzoxaborin-7-amina**

50

[0186]



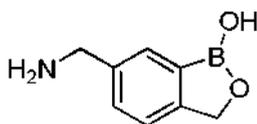
- 5 [0187] El ejemplo 20 se realiza según el ejemplo 1, pero utilizando clorhidrato de 1-hidroxi-3,4-dihidro-2,1-benzoxaborin-7-amina como derivado ABOR en lugar de clorhidrato de 1-hidroxi-3H-2,1-benzoxaborol-amina.

**Ejemplo 21: preparación del gel de AH-1-hidroxi-3,4-dihidro-2,1-benzoxaborin-7-amina/AH-poliol**

- 10 [0188] Los geles se preparan según el ejemplo 8, pero utilizando AH-1-hidroxi-3,4-dihidro-2,1-benzoxaborin-7-amina en lugar de AH-BOR.

**Ejemplo 22: síntesis de AH-(1-hidroxi-3H-2,1-benzoxaborol-6-il)metanamina**

15 [0189]



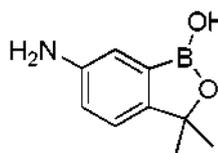
- [0190] El ejemplo 22 se realizó según el ejemplo 1, pero utilizando clorhidrato de (1-hidroxi-3H-2,1-benzoxaborol-6-il)metanamina (AMBOR) como derivado ABOR en lugar de clorhidrato de 1-hidroxi-3H-2,1-benzoxaborol-amina. El peso molecular del ácido hialurónico era de 100 kg/mol.

**Ejemplo 23: preparación del gel de AH-(1-hidroxi-3H-2,1-benzoxaborol-6-il)metanamina/AH-poliol**

- 25 [0191] Los geles se prepararon de acuerdo con el ejemplo 8, pero utilizando AH-(1-hidroxi-3H-2,1-benzoxaborol-6-il)metanamina (AH-AMBOR) en lugar de AH-BOR.

**Ejemplo 24: síntesis de AH-1-hidroxi-3,3-dimetil-2,1-benzoxaborol-6-amina**

30 [0192]



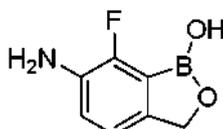
- [0193] El ejemplo 24 se realizó según el ejemplo 1, pero utilizando clorhidrato de 1-hidroxi-3,3-dimetil-2,1-benzoxaborol-6-amina (DMABOR) como derivado ABOR en lugar de clorhidrato de 1-hidroxi-3H-2,1-benzoxaborol-amina. El peso molecular del ácido hialurónico era de 100 kg/mol.

**Ejemplo 25: preparación del gel de AH-1-hidroxi-3,3-dimetil-2,1-benzoxaborol-6-amina/AH-poliol**

- 40 [0194] Los geles se prepararon según el ejemplo 8, pero utilizando AH-1-hidroxi-3,3-dimetil-2,1-benzoxaborol-6-amina (AH-100DMABOR) en lugar de AH-BOR.

**Ejemplo 26: síntesis de AH-7-fluoro-1-hidroxi-3H-2,1-benzoxaborol-6-amina**

45 [0195]



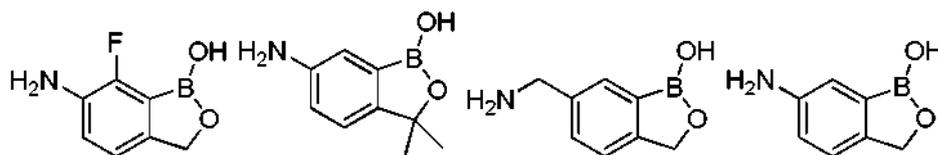
[0196] El ejemplo 26 se realizó de acuerdo con el ejemplo 1, pero utilizando clorhidrato de 7-fluoro-1-hidroxi-3H-2,1-benzoxaborol-6-amina (FBOR) como derivado ABOR en lugar de clorhidrato de 1-hidroxi-3H-2,1-benzoxaborol-6-amina. El peso molecular del ácido hialurónico era de 100 kg/mol.

5 **Ejemplo 27: preparación del gel de AH-1-hidroxi-3,3-dimetil-2,1-benzoxaborol-6-amina/AH-poliol**

[0197] Los geles se prepararon de acuerdo con el ejemplo 8, pero utilizando 7-fluoro-1-hidroxi-3H-2,1-benzoxaborol-6-amina (AH-FBOR) en lugar de AH-BOR.

10 **Ejemplo 28: comportamiento reológico de los geles que utilizan derivados AH-BOR en comparación con los que utilizan AH-PBA**

[0198]



[0199] Resultados: las características de las mezclas resultantes de AH-BOR/AH-poliol se resumen en la tabla 5.

20 **Tabla 5: Mezclas de AH100-ácido borónico/AH100-fructosa analizadas mediante reología ([CP] = 15 g/l; relación molar BOR o DMABOR o AMBOR o FBOR o PBA/fructosa = 1; tampón HEPES 0,01 M/tampón NaCl 0,15 M con pH de 7,4).**

AH-ácido borónico	GS de AH-ácido borónico	GS de AH-fructosa	Comportamiento reológico	G' 1 Hz (Pa)	G'' 1 Hz (Pa)
AH100-BOR	0,15	0,15	Gel	275 ± 35	20,5 ± 2,5
AH100-FBOR	0,12	0,15	Gel	525 ± 11	14 ± 2,8
AH100-DMABOR	0,14	0,15	Gel	120 ± 32	7 ± 1,3
AH100-AMBOR	0,12	0,15	Gel/viscoelástico	116 ± 9	12 ± 1,3
AH100-PBA	0,16	0,15	Gel	227 ± 12	8 ± 1,5

25 **Ejemplo 29: efecto del pH en el comportamiento de los geles de AH-BOR/AH-fructosa o AH-FBOR/AH-fructosa y AH-PBA/AH-fructosa**

[0200] Se realizaron análisis reológicos para comparar el efecto del pH en el comportamiento de los geles de AH-BOR/AH-fructosa o AH-FBOR/AH-fructosa en comparación con los geles de AH-PBA/AH-fructosa (figura 4).

[0201] Resultados: la tabla 6 resume las características de los geles a diferentes pH. Estos resultados mostraron que se observó una mayor estabilidad en un intervalo de pH comprendido entre 4 y 8 para las mezclas de AH-BOR/AH-fructosa y AH-FBOR/AH-fructosa, en comparación con AH-PBA/AH-fructosa (figura 4).

35 **Tabla 6: análisis de mezclas de AH-BOR o AH-FBOR o AH-PBA/AH-fructosa en un tampón HEPES 0,01 M que contiene NaCl 0,15 M a diferente pH (PM AH = 75 o 100 kg/mol, [CP] = 15 g/l, GS de AH-BOR o AH-PBA o AH-fructosa = 0,15. GS de AH-FBOR = 0,12, relación molar BOR o FBOR o PBA/fructosa = 1). Frecuencia de cruce: <0,01 = cerca de 0,01 Hz o <<0,01 = muy por debajo de 0,01 Hz.**

Derivado del AH-ácido borónico	pH	G' 1 Hz (Pa)	G'' 1 Hz (Pa)	Frecuencia de cruce (Hz)
AH-BOR (PM = 75 kg/mol)	4	6	2	0,13
	5	23,5	9	0,25
	6	125	20	0,063
	6,5	210	17,5	0,02
	7,4	515	17	< 0,01

<0,01 = cerca de 0,01 Hz o <<0,01 = muy por debajo de 0,01 Hz.

Derivado del AH-ácido borónico	pH	G' 1 Hz (Pa)	G'' 1 Hz (Pa)	Frecuencia de cruce (Hz)
AH-BOR (PM = 75 kg/mol)	8	572	13	<<0,01
AH-FBOR (PM = 100 kg/mol)	4	1,4	4	G' < G''
	5	19	22	1,3
	6	126	50	0,2
	6,5	332	50	0,025
	7,4	533	12	<<0,01
	8	545	11	<<0,01
AH-PBA (PM = 75 kg/mol)	4	<0,1	<0,1	G' < G''
	5	<0,1	<0,1	G' < G''
	6	2,4	1,2	0,13
	6,5	93,5	5	0,016
	7,4	447	7	<<0,01
	8	564	9	<<0,01

### **Ejemplo 30: propiedades de autorreparación de los geles obtenidos**

5 **[0202]** Se investigó la variación de la G' y la G'' en función del tiempo inmediatamente después de la inyección a través de una aguja de calibre 27 de geles de AH-BOR/AH-fructosa o AH-DMABOR/AH-fructosa o AH-FBOR/AH-fructosa. Los geles se prepararon en un tampón HEPES 0,01 M/tampón de NaCl 0,15 M con un pH de 7,4, a una [CP] = 15 g/l y una relación molar BOR o DMABOR o FBOR/fructosa de 1/1).

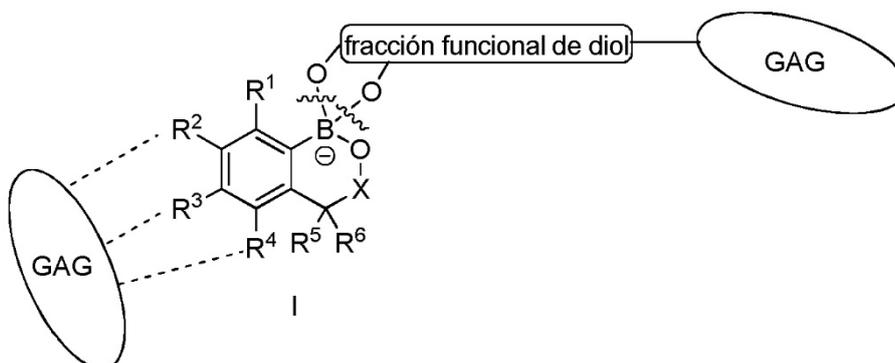
10 Resultados:

**[0203]** los hidrogeles exhibieron propiedades de autorreparación. En consecuencia, pueden inyectarse como sólidos preformados debido a que el gel sólido puede soportar los daños externos y repararse a sí mismo bajo una tensión de cizallamiento adecuada. Gracias a la rápida cinética de gelificación tras la extrusión/inyección, recuperan su forma sólida inmediatamente. Como ejemplo, la figura 5 muestra la variación de G' y G'' en función del tiempo inmediatamente después de la inyección de los geles AH-BOR/AH-fructosa o AH-DMABOR/AH-fructosa o AH-FBOR/AH-fructosa a través de una aguja de calibre 27. A partir de esta figura, se puede observar que las tres muestras se recuperaron en un gel sólido casi instantáneamente.

REIVINDICACIONES

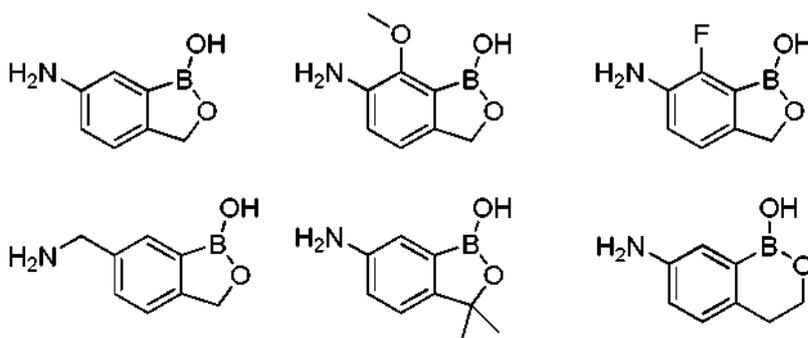
1. Glicosaminoglicanos reticulados, donde dichos glicosaminoglicanos están reticulados mediante un anión de éster de alcoxiboronato formado entre una porción de diol de una fracción funcional de diol injertada en un primer glicosaminoglicano y un hemiéster de boronato injertado en un segundo glicosaminoglicano.
2. Glicosaminoglicanos reticulados según la reivindicación 1, donde dichos glicosaminoglicanos reticulados tienen una estructura de fórmula (I)

10



donde

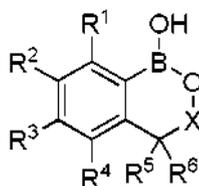
- 15 R<sup>1</sup> se selecciona de entre H, F, Cl, NO<sub>2</sub>, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>, haloalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> y alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>; R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup> se seleccionan independientemente de entre H, F, Cl, haloalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>, NO<sub>2</sub>, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> y un grupo de unión, uniéndose dicho grupo de unión de forma covalente a dicho segundo glicosaminoglicano;
- 20 X se selecciona de entre CHR<sup>7</sup> y un enlace;
- R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup> y R<sup>7</sup> se seleccionan independientemente de entre H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, fenilo y un anillo heteroaromático de cinco o seis miembros que comprende de 1 a 3 heteroátomos seleccionados de entre O, N y S; y donde uno de los R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup>, tal como R<sup>2</sup>, es un grupo de unión.
3. Glicosaminoglicanos reticulados según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, donde dichos glicosaminoglicanos son ácido hialurónico.
4. Glicosaminoglicanos reticulados según la reivindicación 2 o 3, donde dicho grupo de unión es -NR<sup>9</sup>-Y o -O-Y- y forma un enlace amida o un enlace éter con dicho segundo glicosaminoglicano, donde R<sup>9</sup> se selecciona de entre hidrógeno, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> y fluoroalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>;
- 30 Y se selecciona de entre un enlace y un alqueno C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> en el que uno o dos CH<sub>2</sub> se sustituyen opcionalmente por un grupo seleccionado de entre O, NH y fenileno, siendo el alqueno C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sustituido opcionalmente con 1 a 12 R<sup>8</sup>; y R<sup>8</sup> se selecciona de entre F, Cl, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>, haloalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>, fenilo, OH, hidroxialquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>, NH<sub>2</sub>, alquilamino N-C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>, dialquilamino N,N-Ci-C<sub>4</sub>.
- 35 5. Glicosaminoglicanos reticulados según la reivindicación 1, donde dicho hemiéster de boronato se selecciona de entre



40 donde el hemiéster de boronato se injerta a dicho segundo glicosaminoglicano, por lo que el grupo -NH<sub>2</sub> del

hemiéster de boronato forma una amida con una cadena principal de grupo carboxilato de dicho segundo glicosaminoglicano.

6. Glicosaminoglicanos reticulados según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde dicha porción de diol se selecciona a partir de un monosacárido, un disacárido y un alditol o un derivado de los mismos, tales como los seleccionados de entre una hexosa, una dihexosa y un alditol C<sub>6</sub> o un derivado de los mismos, tales como los seleccionados de entre la maltosa, la fructosa, la lactosa y el sorbitol o un derivado de los mismos.
7. Procedimiento de reticulación de un primer glicosaminoglicano injertado con una fracción funcional de diol que tiene una porción de diol y un segundo glicosaminoglicano injertado con un hemiéster de boronato, que comprende reticular dicho primer glicosaminoglicano con dicho segundo glicosaminoglicano formando un enlace de aniones de éster de alcoiboronato entre el hemiéster de boronato del segundo glicosaminoglicano y la porción de diol de dicha fracción funcional de diol de dicho primer glicosaminoglicano.
8. Procedimiento según la reivindicación 7, que comprende además antes de la etapa de reticulación: injertar dicho segundo glicosaminoglicano con dicho hemiéster de boronato, siendo dicho hemiéster de boronato un compuesto de fórmula (III),

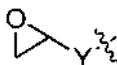


III

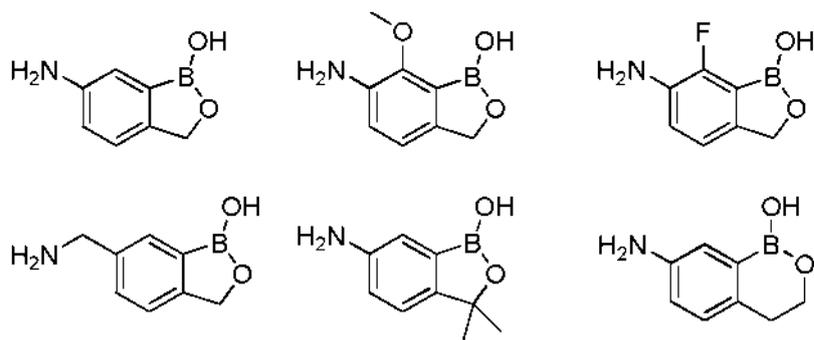
20 donde

- R<sup>1</sup> se selecciona de entre H, F, Cl, NO<sub>2</sub>, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>, haloalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> y alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>;  
 R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup> se seleccionan independientemente de entre H, F, Cl, haloalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>, NO<sub>2</sub>, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> y un grupo de unión que se une de forma covalente a dicho segundo glicosaminoglicano;  
 X se selecciona de entre CHR<sup>7</sup> y un enlace; y  
 R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup> y R<sup>7</sup> se seleccionan independientemente de entre H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, fenilo, y un anillo heteroaromático de cinco o seis miembros que comprende de 1 a 3 heteroátomos seleccionados de entre O, N y S, donde uno de los R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup>, tal como R<sup>2</sup>, es un grupo de unión.

9. Procedimiento según la reivindicación 7 o la reivindicación 8, donde dicho primero y dicho segundo glicosaminoglicanos son ácido hialurónico.
10. Procedimiento según la reivindicación 8 o la reivindicación 9, donde dicho grupo de unión es H<sub>2</sub>N-Y- o



- y forma un enlace amida o un enlace éter con dicho segundo glicosaminoglicano;
- Y se selecciona de entre un enlace y un alquileno C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> en el que uno o dos CH<sub>2</sub> se sustituyen opcionalmente por un grupo seleccionado de entre O, NH y fenileno, siendo el alquileno C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sustituido opcionalmente con 1 a 12 R<sup>8</sup>; y R<sup>8</sup> se selecciona de entre F, Cl, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>, haloalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>, fenilo, OH, hidroxialquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>, NH<sub>2</sub>, alquilamino N-C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>, dialquilamino N,N-C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>.
11. Procedimiento según la reivindicación 7, donde dicho hemiéster de boronato se selecciona de entre

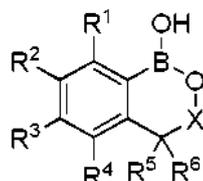


5 donde el hemiéster de boronato se injerta a dicho segundo glicosaminoglicano, por lo que el grupo  $-NH_2$  del hemiéster de boronato forma una amida con una cadena principal de grupo carboxilato de dicho segundo glicosaminoglicano.

12. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11, donde dicha porción de diol se selecciona de entre un monosacárido, un disacárido y un alditol o un derivado de los mismos, tales como los seleccionados de una hexosa, una dihexosa y un grupo alditol  $C_6$  o un derivado de los mismos, tales como los seleccionados de la maltosa, la fructosa, la lactosa y el sorbitol o un derivado de los mismos.

13. Uso de un hemiéster de boronato en la fabricación de glicosaminoglicanos reticulados, tales como ácidos hialurónicos, siendo la reticulación mediante un anión de éster de alcoxiboronato formado entre una porción de diol de una fracción funcional de diol injertada en un primer glicosaminoglicano y un hemiéster de boro injertado en un segundo glicosaminoglicano.

14. Uso según la reivindicación 13, donde dicho hemiéster de boronato es un compuesto de fórmula (IV)



IV

20 donde

25  $R^1$  se selecciona de entre H, F, Cl,  $NO_2$ , alquilo  $C_1-C_3$ , haloalquilo  $C_1-C_3$  y alcoxi  $C_1-C_3$ ;  
 $R^2$ ,  $R^3$  y  $R^4$  se seleccionan independientemente de entre H, F, Cl, haloalquilo  $C_1-C_3$ ,  $NO_2$ , alcoxi  $C_1-C_3$ , alquilo  $C_1-C_3$  y un grupo de unión, uniéndose dicho grupo de unión de forma covalente a dicho segundo glicosaminoglicano;  
X se selecciona de entre  $CHR^7$  y un enlace; y  
 $R^5$ ,  $R^6$  y  $R^7$  se seleccionan independientemente de entre H, alquilo  $C_1-C_4$ , cicloalquilo  $C_3-C_6$ , fenilo, y un anillo heteroaromático de cinco o seis miembros que comprende de 1 a 3 heteroátomos seleccionados de entre O, N y S, donde uno de los  $R^2$ ,  $R^3$  y  $R^4$ , tal como  $R^2$ , es un grupo de unión.

15. Composición polimérica que comprende glicosaminoglicanos reticulados según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 y una solución amortiguadora acuosa.

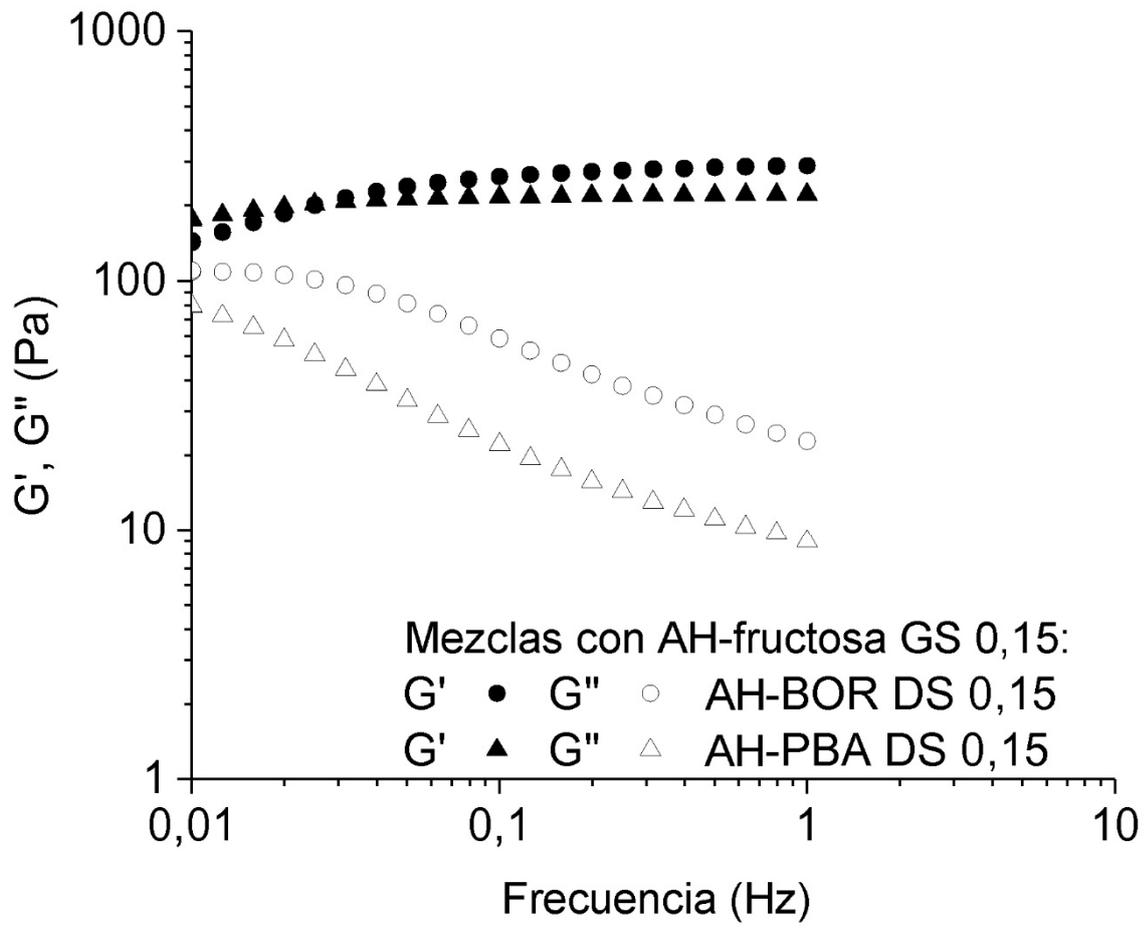


Figura 1A

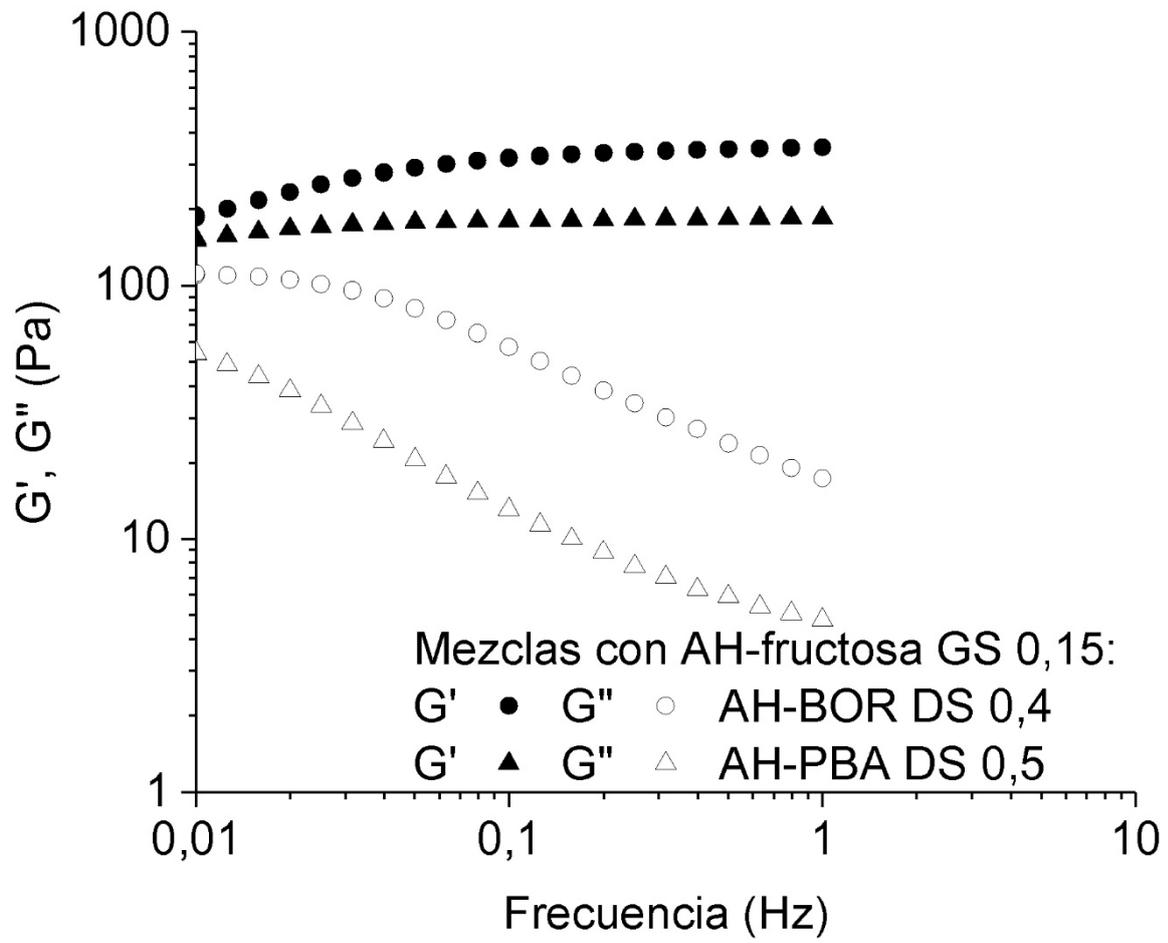


Figura 1B

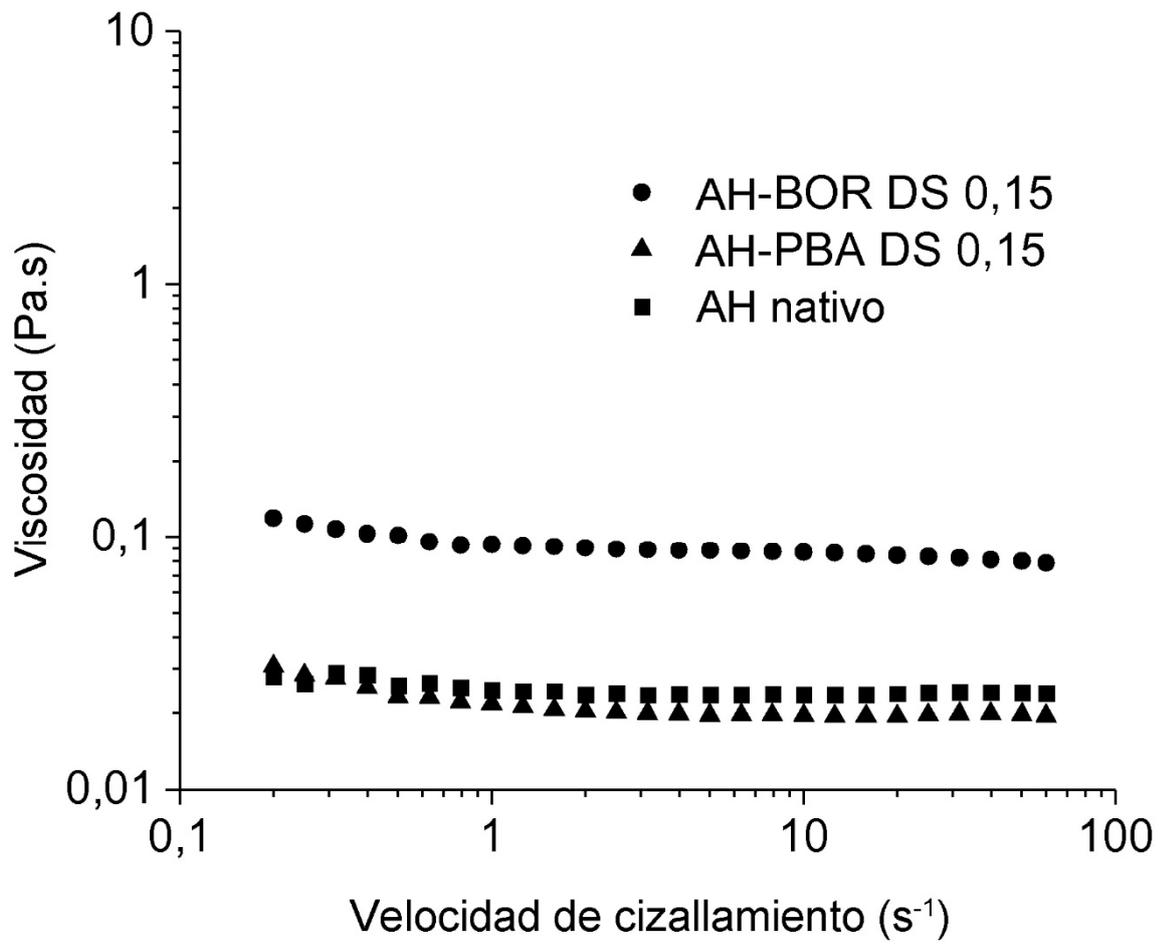


Figura 1C

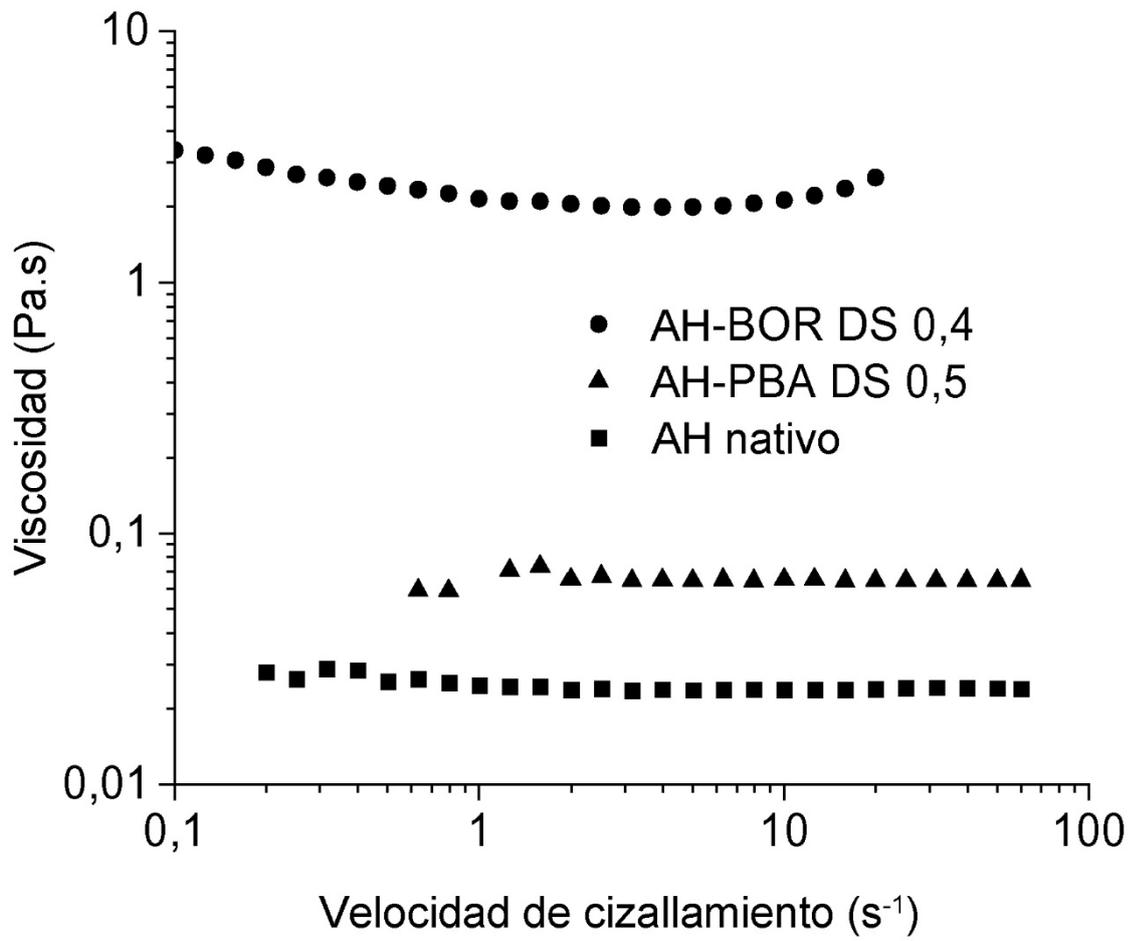


Figura 1D

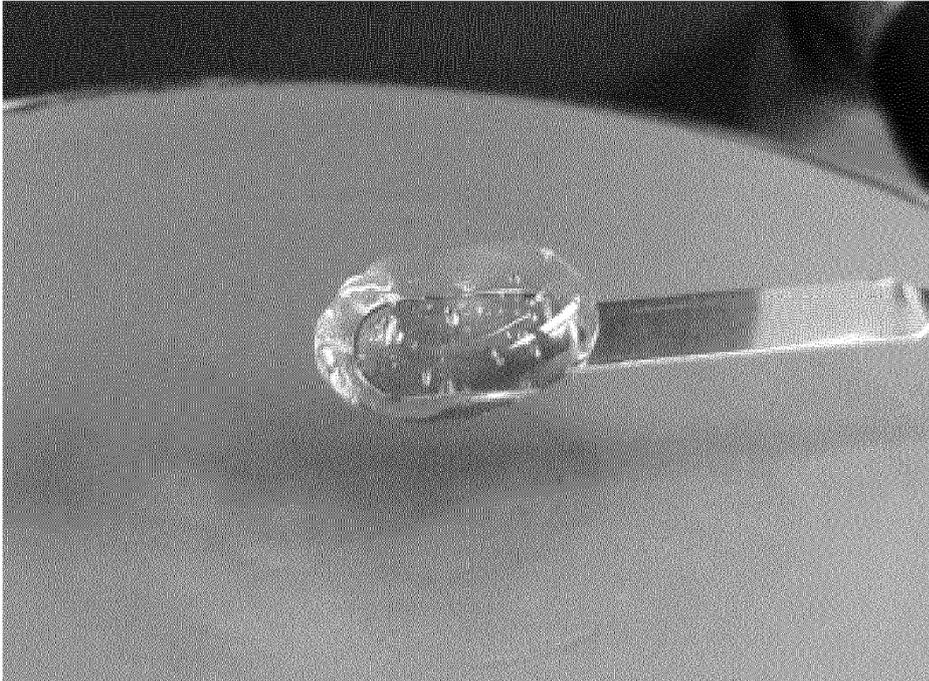


Figura 2

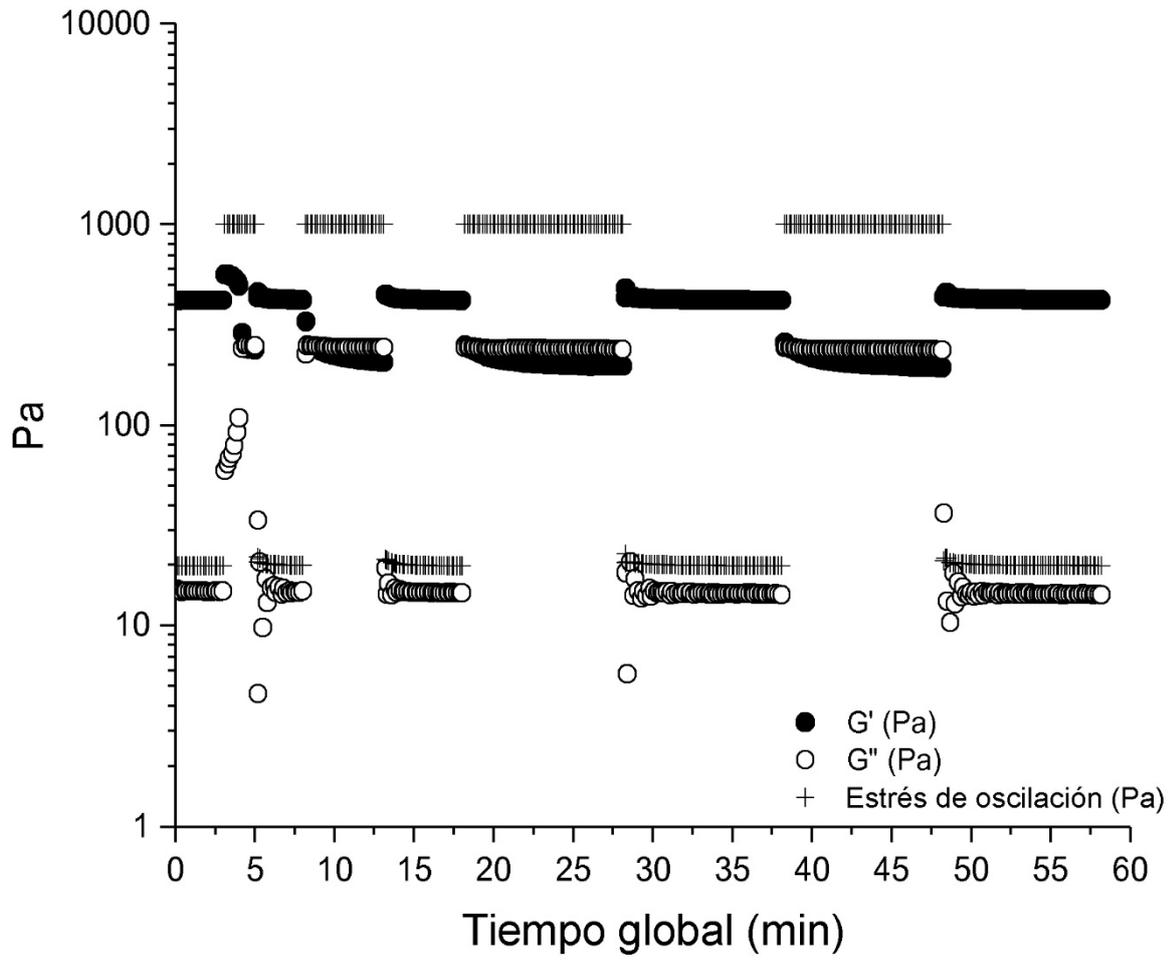


Figura 3

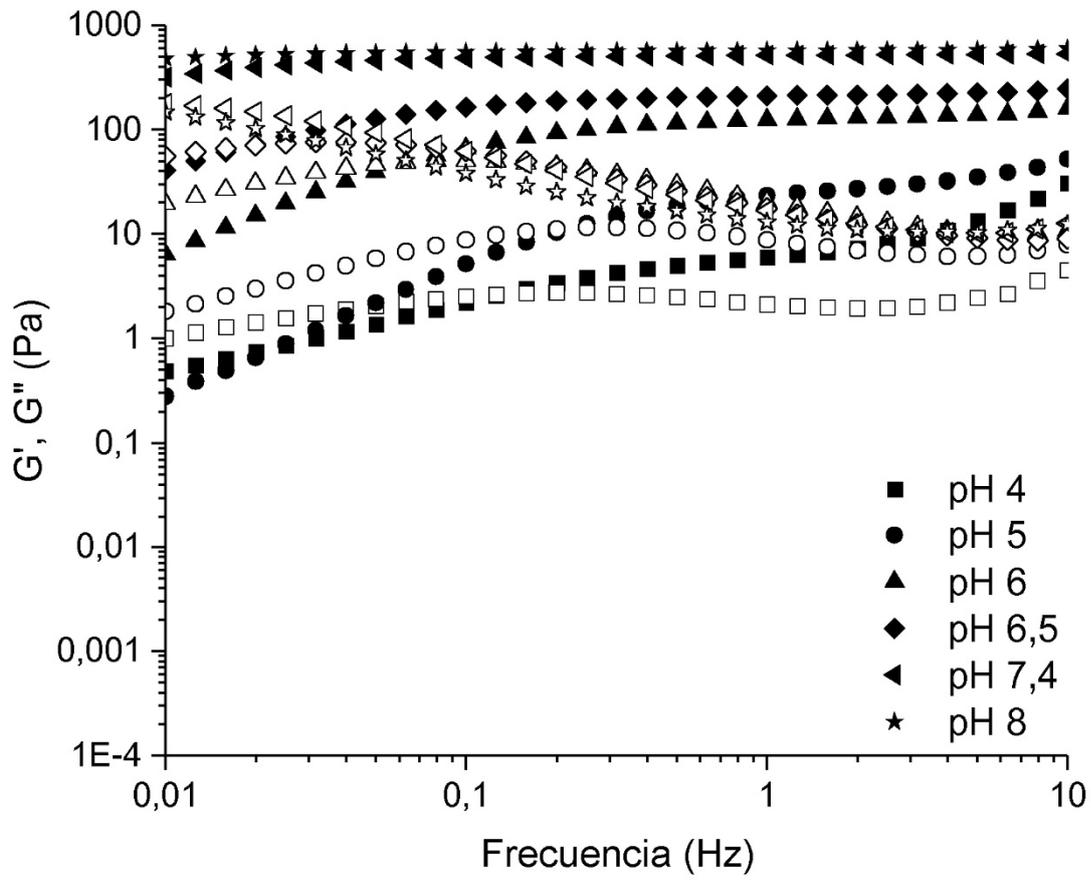


Figura 4A

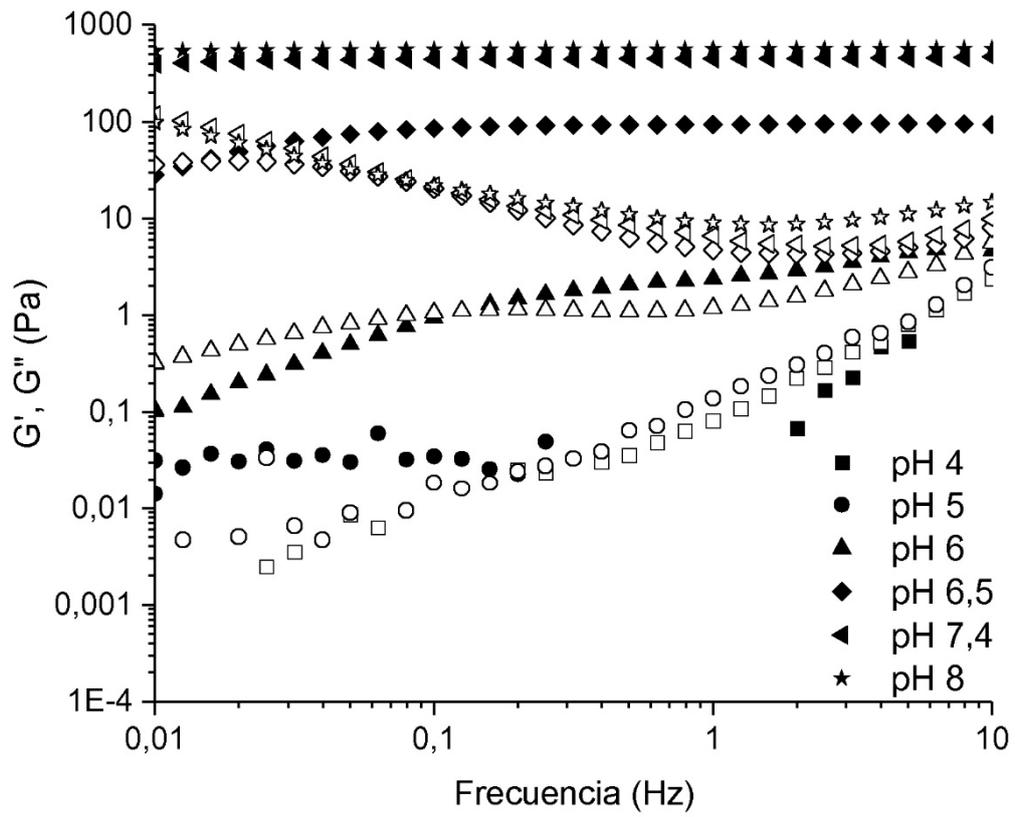


Figura 4B

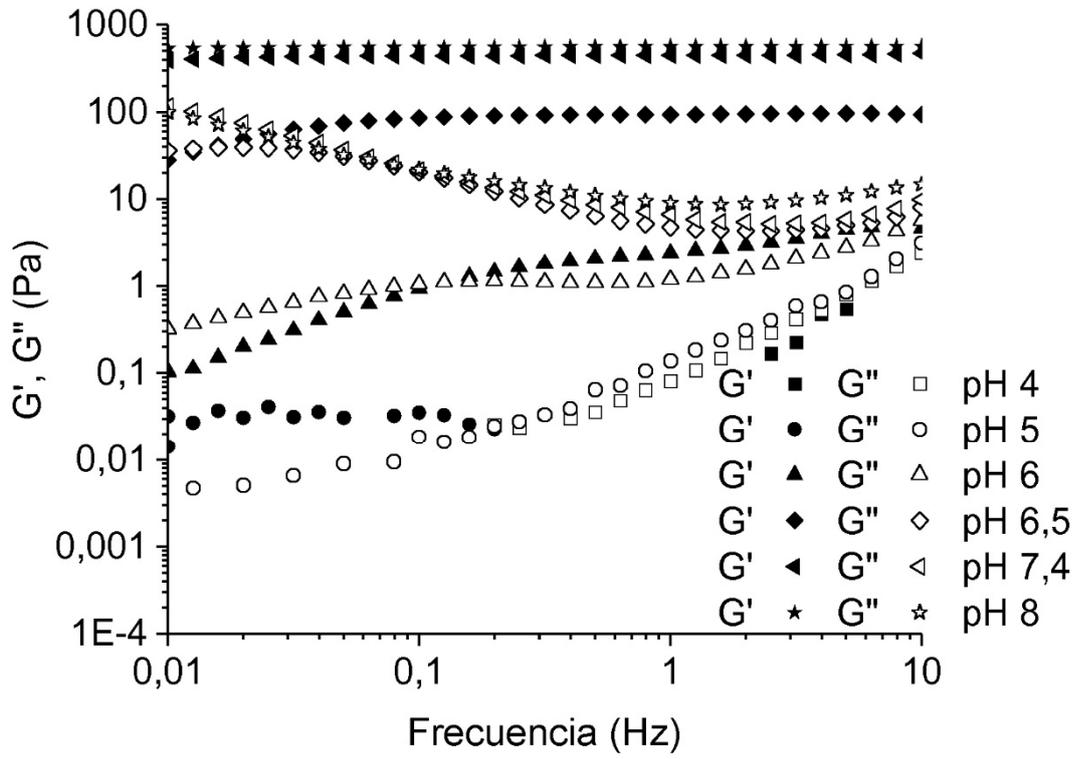


Figura 4C