



NORGE

(12) **UTLEGNINGSSKRIFT**

(19) **NO**

(11) **175374**

(13) **B**

(51) **Int Cl⁵ C 08 B 37/08**

Styret for det industrielle rettsvern

(21) Søknadsnr	874251	(86) Int. inng. dag og søknadsnummer	
(22) Inng. dag	12.10.87	(85) Videreføringsdag	
(24) Løpedag	12.10.87	(30) Prioritet	13.10.86, IT, 48546/86
(41) Alm. tilgj.	14.04.88		
(44) Utlegningsdato	27.06.94		

(71) Patentsøker	Fidia SpA, Via Ponte della Fabbrica 3/A, I-35031 Abano Terme, IT
(72) Oppfinner	Francesco della Valle, Padova, IT
	Aurelio Romeo, Roma, IT
(74) Fullmektig	Dag Dawes, Bryn & Aarflot AS, Oslo

(54) **Benevnelse** **Fremgangsmåte for fremstilling av tverrbundne partialestere av hyaluronsyre**

(56) **Anførte publikasjoner** EP 44228, EP 193510, EP 161887

(57) **Sammendrag**

Fremstilling av kryssbundne estere av hyaluronsyre ved forestring av flerverdige alkoholer med to eller flere karboksygrupper av hyaluronsyrepolysakkaridet. Disse kryssbundne estere er egnede på området bionedbrytbare plastmaterialer for sanitær- og kirurgiske artikler og på det farmasøytiske og kosmetiske område for fremstilling av egnede preparater og artikler.

Oppfinnelsen angår en fremgangsmåte for fremstilling av tverrbundne partialestere av hyaluronsyre med en C_2-C_{16} -alkylengruppe eller en C_1-C_4 -alkylenfenyl- C_1-C_4 -alkylengruppe i esterdelen og som, om ønsket dertil kan være enkelt-partial-estere av hyaluronsyre med en C_1-C_{18} -alkylgruppe, en fenyl- C_1-C_4 -alkylgruppe eller en polycyklisk $C_{18}-C_{24}$ -alifatisk-cyklo-alifatisk gruppe substituert med en hydroksygruppe og tre oksogrupper i esterdelen, og av jordalkali- eller alkalimetallsalter av de partielle estere.

De tverrbundne hyaluronsyreestere fremstilt ifølge oppfinnelsen kan anvendes som bionedbrytbare plastmaterialer for fremstilling av sanitær- og kirurgiske artikler på det farmasøytiske og kosmetiske område.

Anvendelsesområdet av esterne fremstilt ifølge oppfinnelsen bestemmes av graden av tverrbindings-forestring, det vil si antallet tverrbundne grupper av karboksyfunksjoner forestret med ovennevnte flerverdige alkoholer, antallet enkle forestrede grupper og til slutt dessuten antallet saltdannede grupper, idet denne grad av forestring eller saltdannelse selv står i forbindelse med løseligheten av produktet og med dets viskøs-elastiske egenskaper. Således er for eksempel totalt tverrbundne estere faktisk uløselige i vandige væsker og er på grunn av sin molekylstruktur vel egnet for anvendelse ved fremstilling av plastmaterialer og harpikser og som additiver for disse materialer. Estere med en gjennomsnittlig eller liten grad av forestring og deres salter med uorganiske eller organiske baser er mer eller mindre løselige i vandige miljøer, og er egnet for fremstilling av geler som kan ha mange anvendelser både innen kosmetikken og farmakologien og på det medisinsk-sanitære området generelt.

Europeisk patentpublikasjon nr. 0 161887 av 3. mai 1985, publisert 21. november 1985, inneholder en beskrivelse av en del tverrbundne derivater av hyaluronsyre oppnådd ved omsetning av epoksyforbindelser angitt som "polyfunksjonelle". I ovennevnte publiserte patent betyr betegnelsen "polyfunksjonelle epoksyforbindelser" hydrokarboner med minst én epoksyfunksjon og som eventuelt også har funksjoner som kan

omdannes til epoksyfunksjoner, idet tverrbindingsreaksjonen skjer gjennom epoksygruppene. Blant disse funksjoner er bare halogenene nevnt i patentet. Blant disse polyfunksjonelle epoksyforbindelser er bare noen få eksempler nevnt i ovennevnte patent, nemlig: epiklorhydrin, epibromhydrin, metylepiklorhydrin, metylepibromhydrin, 1,2-bis-(2,3-epoksypropoksy)etan, 1,4-bis-(2,3-epoksypropoksy)butan, 1,6-bis-(2,3-epoksypropoksy)butan, 1,6-bis-(2,3-epoksypropoksy)heksan og en glycidyleter av bisfenol A og bisfenol F. Den fremstillingsmetode som er anvendt i nevnte patent, som er begrenset i kravene til anvendelse av et halogenmetyloksyran eller en bisepoksyforbindelse, likesom den er begrenset i sine mulige anvendelser, gir tverrbundne estere av hyaluronsyre med liten forestringsgrad; som det vil kunne sees av patentets illustrerende eksempler, oppnås faktisk et maksimum på 4% forestring når det gjelder omsetning med epiklorhydrin (Eksempel 4) under oppnåelse av et produkt med liten løselighetsgrad.

Den foreliggende oppfinnelse gjør tilgjengelig et vidt utvalg av tverrbundne estere, innbefattende spesielle estere hvor estergruppene omfatter radikaler som er usubstituerte ved en hydroksylgruppe (som når det gjelder produkter som er et resultat av omsetning av ovennevnte epoksyder med hyaluronsyre eller den salter). Som et betydelig trekk tilveiebringer oppfinnelsen blandede estere omfattende en blanding av estergrupper som er tverrbundne og noen estergrupper som ikke er tverrbundne, hvor prosentandelen av kryssbindende grupper kan overstige 10% av alle disakkarid-enhetene i hyaluronsyre.

Britisk patentsøknad, publ. nr. 2 151 244 A, og DE publikasjon 34 34 082 A1, inneholder beskrivelser av en del tverrbundne derivater av hyaluronsyre som kan oppnås ved innvirkning av formaldehyd, dimetylolurea, dimetyloletylenurea, et polyaziridin, et polyisocyanat og et divinylsulfon på samme. Slike derivater er uløselige og er på grunn av sin bioforenlighet foreslått for anvendelser in vivo i form av forskjellige proteseartikler, såsom hjerteventiler, vaskulære klemmer o.s.v., eller de kan tilsettes til de forskjellige

polymermaterialer som anvendes for fremstilling av slike artikler. De samme patentskrifter beskriver anvendelse av etylenoksyd som et middel til oppnåelse av "tverrbinding", men fremgangsmåten er ikke illustrert, og det er heller ikke den oppnådde produkttype. Strukturen av andre tverrbundne derivater er ikke spesifisert, og typen bindinger som danner tverrbindingen er ikke nevnt. Når det gjelder formaldehyd og de ovennevnte substituerte ureaforbindelser, kan dette bety derivater som innbefatter karboksygruppene av hyaluronsyre med en halvacetalstruktur, mens det i andre tilfeller kan bety alkylerte produkter av hydroksylforbindelser.

Når det gjelder de partielle, tverrbundne estere, kan det være karboksygrupper forestrert med enverdige eller flerverdige alkoholer av alifatisk, alicyklisk, aralifatisk eller heterocyklisk type, og når det gjelder de partielle estere, kan det være ikke-forestrede karboksygrupper saltdannet med uorganiske eller organiske baser, med unntak av tverrbundne estere oppnådd ved innvirkning av et halogenmetyl-oksyan eller en bisepoksy-forbindelse på hyaluronsyre.

Betegnelsen "hyaluronsyre" anvendes i litteraturen i betydningen sure polysakkarider med forskjellig molekylvekt som består av rester av D-glukuron- og N-acetyl-D-glukosaminsyrer, som finnes naturlig i celleoverflater, i basis-ekstracellulær-substansene i bindevevet hos virveldyr, i leddvæsken, i øyets endobulbærveske, i humant navlestrengvev og i hanekam. Hyaluronsyre spiller en viktig rolle i den biologiske organisme, som en mekanisk bærer for cellene i mange vev, såsom huden, senene, musklene og brusk, og den er derfor hovedkomponenten i den intercellulære matriks, men den spiller også andre viktige roller i de biologiske prosesser, såsom fukting av vev, smøring, cellevandring, cellefunksjoner og -differensiering. (Se for eksempel A. Balazs et al i "Cosmetics & Toiletries", italiensk utgave nr. 5/84, sider 8-17).

Hyaluronsyre kan ekstraheres fra ovennevnte naturlige vev, for eksempel fra hanekam, eller dessuten fra en del bakterier. Det er i dag mulig å fremstille hyaluronsyre også

ved mikrobiologiske fremgangsmåter. Molekylvekten for komplett hyaluronsyre oppnådd ved ekstraksjon er 8-13 millioner. Molekylkjeden hos dette polysakkarid nedbrytes imidlertid meget lett ved forskjellige fysiske og kjemiske faktorer, for eksempel på mekaniske måter eller under innvirkning av bestråling eller hydrolyserings-, oksyderings- eller enzymatiske midler. Av denne grunn har de oppnådde nedbrutte fraksjoner lavere molekylvekt, selv ved anvendelse av de vanlige rensefremgangsmåter for friske ekstrakter (se Balazs et al, angitt ovenfor).

Hyaluronsyre, dens molekylfraksjoner og de respektive salter er blitt foreslått for anvendelse i kosmetikk (se for eksempel ovennevnte artikkel av Balazs et al og fransk patent nr. 2 478 468. Som terapeutisk middel er hyaluronsyre og dens salter blitt anvendt særlig ved terapi av artropatier, for eksempel i veterinærmedisinen for behandling av artritt hos hester [Acta Vet. Scand. 167, 379 (1976)]. Som terapeutisk hjelpestoff og erstatningsmiddel for naturlige organer og vev er hyaluronsyre og dens molekylfraksjoner og deres salter blitt anvendt ved øyekirurgi (se for eksempel Balazs et al i "Modern Problems in Ophthalmology", vol.10, 1970, side 3 - forf. E.B. Strieff, S. Karger, Basel, eller "Viscosurgery and the Use of Sodium Hyaluronate During Intraocular Lens Implantation", publikasjon presentert på den Internasjonale kongress og første filmfestival i forbindelse med intraokulær implantering, Cannes, 1979 og US-patent nr. 4 328 803 med en oppsummering av litteraturen når det gjelder anvendelser av HY i oftalmologi, og dessuten US-patent nr. 4 141 973). I publisert europeisk patent nr. 0138572A3 er det en beskrivelse av en molekylfraksjon av hyaluronsyre som kan anvendes, for eksempel som natriumsalt, for henholdsvis intraokulære og intraartikulære injeksjoner, egnet som erstatningsmiddel for øyets endobulbærvæsker og egnet ved behandling av artropatier.

Hyaluronsyre kan også anvendes som et additiv for forskjellige polymer-materialer anvendt for sanitær- og kirurgiske artikler, såsom polyuretaner, polyestere, polyolefiner, polyamider, polysiloksaner, vinyl- og

akrylpolymerer, og karbonfibrer, med den virkning at disse materialer gjøres bioforenlige. I dette tilfelle utføres tilsettingen av HY eller dens salter for eksempel ved at overflaten på slike materialer belegges, eller ved dispersjon i samme eller ved begge disse fremgangsmåter. Slike materialer kan anvendes for fremstilling av forskjellige sanitær- og medisinske artikler, såsom hjerteventiler, intraokulære linser, vaskulære klemmer, pacemakere og liknende artikler (se US-patent nr. 4 500 676).

Betegnelsen "hyaluronsyre" brukes faktisk vanligvis ukorrekt, idet den, som det er blitt sett, betyr en hel serie av polysakkarider med vekslende rester av D-glukuron- og N-acetyl-D-glukosaminsyrer med varierende molekylvekt eller til og med de nedbrutte fraksjoner av samme, og det vil derfor virke riktigere å bruke flertallsbetegnelsen "hyaluronsyrer". Entallsbetegnelsen vil imidlertid ikke desto mindre bli anvendt i denne beskrivelse, likeledes når det gjelder molekylfraksjonene, og dessuten vil forkortelsen "HY" bli anvendt i stedet for denne fellesbetegnelse.

Det er funnet at også esterne av hyaluronsyre med alifatiske, aralifatiske, cykloalifatiske eller heterocykliske alkoholer har like og til og med overlegne egenskaper i forhold til esterne av selve det sure polysakkarid, og de er enda mer egnet for ovennevnte anvendelser. Disse estere og en fremgangsmåte for fremstilling av dem er beskrevet i US-patent nr. 4.851.521. Esterne med en høy grad av forestring, og særlig de fullstendige estere, har i motsetning til hyaluronsyre god løselighet i organiske løsningsmidler, for eksempel i dimetylsulfoksyd. Således oppløses for eksempel benzylesteren av HY ved romtemperatur i DMSO i en mengde på 200 mg/ml. Denne løselighet i visse organiske løsningsmidler, sammen med spesielle og markerte viskøs-elastiske egenskaper, gjør det mulig å oppnå sanitær-, medisinske og kirurgiske artikler som er uløselige i saltoppløsning og som har den spesielle ønskede form; først fremstilles en oppløsning av HY-esteren i et organisk løsningsmiddel, den meget viskøse oppløsning formes så til den form som er ønskelig for den

ferdige artikkel, og til slutt ekstraheres det organiske løsningsmiddel med et annet løsningsmiddel som er blandbart med det første men hvor HY-esteren er uløselig. Disse fordeler finnes også, eventuelt i en enda større grad, ved de tverrbundne forbindelser fremstilt ifølge den foreliggende oppfinnelse.

De tverrbundne estere fremstilt ifølge den foreliggende oppfinnelse kan stamme fra hvilken som helst flerverdig alkohol med alifatisk natur, og disse stammer imidlertid fortrinnsvis fra flerverdige alkoholer med maksimalt 8 alkoholfunksjoner og særlig 4 slike funksjoner og maksimalt 16 karbonatomer. Betegnelsen "flerverdig" angir strengt tatt vanligvis alkoholer med tre eller flere hydroksygrupper, mens betegnelsene "toverdig" eller "glykol" vanligvis angir alkoholer med to hydroksygrupper. Som anvendt i det foreliggende er betegnelsen "flerverdig" ment å omfatte alkoholer med to eller flere hydroksygrupper. Således kan de "flerverdige" alkoholer være toverdige alkoholer, treverdige, fireverdige, fem- og seksverdige alkoholer. Blant disse skal spesielt nevnes glycerol, de tre erytritol-isomerer, pentaerytritol, de fire xylitolisomerer og de 10 dulcitolisomerer.

I de nye estere kan "tverrbindingene" stamme fra forskjellige av ovennevnte flerverdige alkoholer; det er imidlertid foretrukket å fremstille estere hvor alle "tverrbindingene" stammer fra den samme flerverdige alkohol.

Den viktigste klasse av de nye estere er den som stammer fra toverdige alkoholer, det vil si fra glykoler. Slike glykoler har fortrinnsvis det forannevnte maksimum på 16 karbonatomer, og fremfor alt et maksimum på 8 karbonatomer, og er særlig etylenglykol, propylenglykol, butylenglykol, de glykoler som stammer fra pentan, heksan, heptan, oktan og deres stillingsisomerer. Slike glykoler kan imidlertid også ha dobbeltbindinger, for eksempel 1-3 dobbeltbindinger.

De enkle estergrupper, som kan være til stede i tillegg til de tverrbundne grupper, kan stamme fra alkoholer i den alifatiske, aralifatiske, alicykliske eller heterocykliske rekke og kan være substituerte eller usubstituerte, mettede

eller umettede. Alkoholer i den alifatiske rekke er for eksempel alkoholer med maksimalt 34 karbonatomer, som kan være mettede eller umettede og som eventuelt også kan være substituert med andre frie funksjonelle eller funksjonelt modifiserte grupper, såsom amino-, hydroksy-, aldehyd-, keto-, merkpto-, karboksygrupper eller med grupper som stammer fra disse, såsom hydrokarbyl- eller dihydrokarbylaminogrupper (her og i det følgende skal betegnelsen "hydrokarbyl" forstås ikke bare å bety monovalente radikaler av hydrokarboner av f.eks. $-C_nH_{2n+1}$ -typen, men også to- eller treverdige radikaler, såsom "alkylener" $-C_nH_{2n}-$ eller "alkylidener" $>C_nH_{2n}$), eter- eller estergrupper, acetal- eller ketalgrupper, tioeter- eller tioestergrupper og forestrede karboksygrupper eller karbaminsyregrupper og karbaminsyregrupper substituert med én eller to hydrokarbylgrupper, med nitrilgrupper eller med halogenatomer. Blant de substituerte alkoholer er det foretrukket å velge slike som har én eller to av ovennevnte funksjoner.

Blant de forannevnte grupper som inneholder hydrokarbylgrupper, er disse fortrinnsvis lavere alifatiske radikaler, for eksempel alkyler, med maksimalt 6 karbonatomer. Slike alkoholer kan så også være avbrutt i karbonatomkjeden av heteroatomer, såsom oksygenatomer, nitrogen, svovel. Alkoholer i ovennevnte gruppe som fortrinnsvis anvendes innenfor den foreliggende oppfinnelses grenser, er slike som har maksimalt 12 og særlig 6 karbonatomer, og slike, blant de substituerte, hvor hydrokarbylradikalene i ovennevnte amino-, eter-, ester-, tioeter-, tioester-, acetal- og ketalgrupper representerer alkylgrupper med maksimalt 4 karbonatomer, og hvor hydrokarbylgruppene i de forestrede karboksygrupper også, eller i de substituerte karbaminsyregrupper, er alkylgrupper med det samme antall karbonatomer, og hvor amino- eller karbaminsyregruppene kan være alkylamin eller alkylkarbaminsyregrupper med maksimalt 8 karbonatomer. Blant disse alkoholer skal først og fremst nevnes slike som er mettede og usubstituerte såsom for eksempel metyl-, etyl-, propyl-, isopropylalkoholer, n-butyl-, isobutyl-, tert.-butylalkohol,

amylalkoholer, pentyl-, heksyl-, oktyl-, nonyl- og dodekylalkoholer og fremfor alt alle som har rett kjede, såsom n-oktyl- og n-dodekylalkoholer.

Blant de substituerte alkoholer er de allerede nevnte glykoler foretrukket, for øvrig anvendt for dannelsen av "tverrbindinger", men også flerverdige alkoholer, såsom glycerol, aldehydalkoholene såsom tartronsyrealkohol, karboksyalkoholer såsom melkesyrer, for eksempel α -oksypropionsyre, glykolsyre, eplesyre, vinsyrer, sitrønsyre, aminoalkoholer, såsom aminoetanol, aminopropanol, n-amino-butanol og deres dimetyl- og dietylderivater i aminofunksjonen, kolin, pyrrolidinyletanol, piperidinyletanol, piperazinyletanol og de tilsvarende derivater av n-propylalkohol eller n-butylalkohol, monotioetylenglykol eller dens alkylderivater, for eksempel etylderivatet i merkaptofunksjonen. Blant de mettede høyere alifatiske alkoholer er for eksempel cetylalkohol og myricylalkohol foretrukket, men av særlig betydning for formålene ved den foreliggende oppfinnelse er de høyere umettete alkoholer med én eller to dobbeltbindinger, såsom særlig slike som finnes i mange eteriske oljer og som har affinitet for terpenener, såsom for eksempel citronellol, geraniol, nerol, nerolidol, linalool, farnesol og fytol. Blant de umettete lavere alkoholer er allylalkohol og propargylalkohol egnet.

Blant de aralifatiske alkoholer skal fremfor alt nevnes alle slike som bare har én benzenrest og hvor den alifatiske kjede har maksimalt 4 karbonatomer og hvor benzenresten kan substitueres med 1-3 metyl- eller hydroksygrupper eller med halogenatomer, særlig med klor, brom eller jod, og hvor den alifatiske kjede kan substitueres med én eller flere funksjoner valgt fra gruppen bestående av frie amino- eller mono- eller dimetylgrupper eller med pyrrolidinyl- eller piperidingrupper. Blant disse alkoholer er benzylalkohol og fenetylalkohol spesielt foretrukket.

Alkoholene i den cykloalifatiske rekke (også innbefattende cykloalifatisk-alifatiske alkoholer) kan stamme fra mono- eller polycykliske hydrokarboner og kan fortrinnsvis ha

maksimalt 34 karbonatomer. Når det gjelder substituerte alkoholer, kan substituttene være slike som allerede er nevnt når det gjelder alkoholene i den alifatiske rekke.

Blant de alkoholer som stammer fra énringede cykliske hydrokarboner, skal spesielt nevnes slike som har maksimalt 12 karbonatomer, idet ringene har fortrinnsvis 5-7 karbonatomer, som for eksempel kan være substituert med 1-3 laverealkylgrupper, såsom metyl-, etyl-, propyl- eller isopropylgrupper. Som spesifikke alkoholer i denne gruppe er cykloheksanol, cykloheksandiol, 1,2,3-cykloheksantriol og 1,3,5-cykloheksantriol (floroglucitol) og inositol foretrukket. De heterocykliske alkoholer kan ansees å stamme fra ovennevnte cykloalifatiske eller alifatisk-cykloalifatiske alkoholer hvis de rettkjededede eller cykliske kjeder i disse er avbrutt av ett eller flere heteroatomer, for eksempel 1-3 heteroatomer valgt fra gruppen som utgjøres av - O -, - S -, - N = og - NH -, og det kan være én eller flere dobbeltbindinger i dem, spesielt 1-3, idet de således også innbefatter heterocykliske forbindelser med aromatiske strukturer. De kan være enkle alkoholer, såsom furfurylalkohol, eller alkoholer med en mer komplisert struktur, som finnes i mange alkaloid-derivater og i mange medikamenter.

Som allerede angitt kan de tverrbundne derivater fremstilt ifølge den foreliggende oppfinnelse anvendes for alle hovedanvendelser egnet for hyaluronsyre eller denssalter eller de ovennevnte estere beskrevet i US-patent 4.851.521. Som allerede nevnt, er de nye derivater derfor spesielt egnet ved fremstilling av

- 1) medikamenter
- 2) farmasøytiske bærermaterialer for medikamenter
- 3) kosmetikk og bærermaterialer for kosmetikk
- 4) plastartikler for sanitære, medisinske og kirurgiske anvendelser

Det er klart at typen tverrbundet ester velges ifølge den anvendelse den skal ha. Vanligvis øker en høy grad av forestring opp til punktet for total forestring av hyaluronsyren dens lipofile karakter og minsker derfor dens løselighet i

vann. For terapeutiske eller kosmetiske anvendelser er det særlig viktig å regulere graden av forestring på en slik måte at man sikrer tilstrekkelig løselighet i vann, skjønt den har gode lipofile egenskaper sammenliknet med hyaluronsyre eller dens salter. Naturligvis må man ta i betraktning molekylstørrelsen hos selve forestringskomponenten, siden denne vanligvis påvirker vannløseligheten omvendt proporsjonalt. Hva angår anvendelse av medikamenter, bør man ta i betraktning den større eller mindre grad av hydrofile eller lipofile egenskaper i forhold til den vevstype som skal behandles, for eksempel huden når det gjelder hudmedikamenter.

De tverrbundne derivater fremstilt ifølge oppfinnelsen kan anvendes som terapeutiske midler på grunn av selve hyaluronsyre-komponentens iboende egenskaper, for eksempel som legemidler for behandling av artritt, både for human- og veterinærmedisin. I dette tilfelle stammer de fra flerverdige alifatiske alkoholer uten noen farmakologiske egenskaper eller med ubetydelig aktivitet, særlig fra toverdige alkoholer med 2-8 karbonatomer, og de andre enkle estergrupper som er tilstede, stammer eventuelt også fra alkoholer uten noen farmakologisk virkning, for eksempel fra enverdige alifatiske alkoholer med et maksimalt antall på åtte atomer. Administeringen utføres parenteralt og mer presist intraartikulært.

Andre tverrbundne derivater fremstilt ifølge oppfinnelsen kan også stamme fra alkoholer med farmakologisk effekt, og dette er særlig tilfellet når det gjelder alkoholer som enkle estergrupper stammer fra. De har egenskaper som kvalitativt er like alkohols egenskaper, men med et mer differensiert virkningsområde, idet de sikrer en mer balansert, konstant og regelmessig farmakologisk virkning, og har vanligvis en markert "forsinknings"-effekt. Andre tverrbundne derivater igjen kan inneholde enkle estergrupper med to eller flere forskjellige alkoholtyper med eller uten deres egen farmakologiske virkning. Ved at forholdet mellom de forskjellige alkoholtyper som forestringskomponenter passende doseres, er det mulig å oppnå estere med aktive alkohols

farmakologiske aktivitet uten den spesifikke aktivitet hos hyaluronsyre med de egenskaper som er beskrevet ovenfor såsom større stabilitet og bio-tilgjengelighet når det gjelder den ønskede aktivitet og karakteregenskapene hos de farmakologisk aktive alkoholer.

I de derivater som er beskrevet her, som stammer fra farmakologisk aktive alkoholer, fungerer det tverrbundne hyaluronsyremolekyl egentlig som et bærermateriale for den farmakologisk aktive komponent, og det kan derfor også innbefattes i gruppene 2) eller 3). Siden de nye tverrbundne derivater fungerer som virkelige bærermaterialer ifølge anvendelsene 2) og 3), stammer de fortrinnsvis også fra de ovennevnte terapeutisk inaktive flerverdige alkoholer, og estergrupper som stammer fra enverdige alkoholer, er også eventuelt fortrinnsvis uten noen farmakologisk virkning. Den aktive substans blandes fysisk med de nye derivater, og de resulterende legemidler kan også inneholde andre bestanddeler og tilsetningsstoffer som vanligvis anvendes i konvensjonelle farmasøytiske preparater. I stedet for en aktiv substans er det mulig å ha en blanding av aktive substanser. Spesielt interessante er legemidler av denne type hvor de nye hyaluronsyrederivater fungerer som bærermateriale og inneholder topisk aktive substanser.

De farmakologisk aktive alkoholer som anvendes for forestring av karboksygrupper som ikke ennå er tverrbundet i de nye derivater, kan, bortsett fra de som allerede er oppregnet, være alifatisk-cykloalifatiske polycykliske alkoholer, såsom for eksempel steroider, såsom kjønns hormoner og deres syntetiske analoger og spesielt kortikosteroider og deres derivater, såsom for eksempel østradiol og dens metylderivater, etinyl- eller propinylderivater i stilling 17, testosteron og dets derivater, såsom 17- α -metyl-testosteron, 17- α -etinyl-testosteron, 1',1,2-dehydro-testosteron, norgestrel, 19-nor-testosteron, 19-nor-17- α -metyl-testosteron, antihormoner såsom cyproteron, kortison, hydrokortison, deksametason, betametason, parametason, flumetason, fluocinolon, clobetasol, beclometason, alfaksolon, bolasteron.

Andre terapeutisk aktive alkoholer er for eksempel vitaminer, såsom akseroftol, vitaminene D₂ og D₃, aneurin, laktoflavin, askorbinsyre, riboflavin, tiamin og pantotensyre. Blant de heterocykliske alkoholer nevnes også atropin, skopolamin, cinkonin, cinkonidin, kinin, morfin, kodein, nalorfin, N-butylskopolammoniumbromid, ajmalin; fenyletylamin såsom efedrin, isoproterenol, epinefrin, fenotiazin-legemidler såsom perfenazin, pipotiazin, carfenazin, homofenazin, acetofenazin, flufenazin, N-hydroksyetylprometazinklorid; tioxanten-legemidler såsom flupentiksol og clopentiksol; antikonvulsjonsmidler såsom meprofeniol; antipsykotika såsom opipramol; antibrekkmidler såsom oksypendyl; smertestillende midler såsom karbetidin og fenoperidin og metadol; hypnotika såsom etodroksizin; anoreksika såsom benzhydrol og difemetoksidin; mindre betydelige beroligende midler såsom hydroksizin; muskelavslappende midler såsom cinnamedrin, difyllin, mefenesin, metokarbamol, klorfenesin, 2,2-dietyl-1,3-propandiol, guaifenesin, hydrocilamid; koronar-vasodilatorer såsom dipyridamol og oksyfedrin; adrenerg-blokkere såsom propranolol, timolol, pindolol, bupranolol, atenolol, metoprolol, praktolol; anti-neoplastika såsom 6-azauridin, cytara-bin, floksuridin; antibiotika såsom kloramfenikol, tiamfenikol, erythromycin, oleandomycin, lincomycin; anti-virale midler såsom idoksuridin; perifer-vasodilatorer såsom isonikotinyllalkohol; karbonsyreanhydrase-inhibitorer såsom sulokarbilat; anti-astmamidler og anti-inflammatoriske midler såsom tiaramid; sulfamid-midler såsom 2-p-sulfanylanilino-etanol.

De tverrbundne derivater beskrevet i det foreliggende kan selvfølgelig anvendes i de samme tilfeller som de frie alkoholer.

Det er nå mulig å fremstille mer stabile legemidler enn de som er tilgjengelige nå. Det er derfor på den ene side mulig å fremstille tverrbundne derivater for anvendelse ved de indikasjoner som er typiske for hyaluronsyren selv, for eksempel for intraartikulære injeksjoner hvor det tverrbundne derivat fungerer som smøremiddel: på grunn av derivatenes

bedre stabilitet når hyaluronidasen sammenliknes med den frie syre, er det mulig å oppnå en helt bemerkelsesverdig forlenget virkning. På den annen side er det mulig å oppnå legemidler med en "forsinkelses"-virkning når det gjelder ovennevnte derivater også inneholdende estergrupper som stammer fra terapeutisk aktive alkoholer. I disse frigjøres den farmakologisk aktive alkohol meget langsomt i organismen ved hjelp av esteraser. For anvendelse ifølge ovennevnte punkt 4) kan de tverrbundne derivater fremstilt ifølge oppfinnelsen fremfor alt ut fra farmakologisk inerte alkoholer, for eksempel toverdige, mettede, alifatiske alkoholer, særlig slike som har 2-8 karbonatomer, glycerol og enverdige alkoholer, fremfor alt alifatiske alkoholer, men også en del andre fra ovennevnte rekke for delvis forestring av de karboksygrupper som ikke er tverrbundne. I denne siste gruppe er de umettede alkoholer spesielt interessante, for eksempel slike som har én eller flere dobbeltbindinger, såsom vinyl- eller allylalkoholer og deres kondenserte derivater, såsom særlig polyvinylalkohol og glycerol. Også i dette tilfelle er det mulig å anvende blandede estere, i henhold til den spesielt påtenkte anvendelse. Alicykliske alkoholer er også egnet, for eksempel slike som stammer fra cyklopentan og cykloheksan og fra deres derivater substituert med lavere-alkyl-grupper, for eksempel alkylgrupper med 1-4 karbonatomer, særlig metylgrupper.

For kosmetikkanvendelse er det foretrukket å anvende tverrbundne derivater med forestrede grupper som hovedsakelig er identiske med dem som er oppregnet ovenfor for anvendelse i sanitær-, medisinske og kirurgiske artikler. Terpenalkoholer bør også tas med i betraktningen, såsom slike som er nevnt ovenfor, særlig velluktende alkoholer ved fremstilling av parfymer og duftende kremer.

I alle de tverrbundne derivater fremstilt ifølge den foreliggende oppfinnelse kan de karboksygrupper som ikke er "tverrbundne" eller forestret, være frie eller dannet til salt. Saltene kan inneholde uorganiske baser, for eksempel alkalimetaller såsom kalium og spesielt natrium og ammonium,

og jordalkalimetaller såsom kalsium- eller magnesium- og aluminiumsalter, eller de kan inneholde organiske baser, særlig azoterte baser og derfor alifatiske, aralifatiske, cykloalifatiske eller heterocykliske aminer. Disse salter kan stamme fra terapeutisk tilfredsstillende men inaktive aminer, eller fra aminer med terapeutisk virkning.

Blant de førstnevnte skal oppmerksomheten fremfor alt rettes mot de alifatiske aminer, for eksempel mono-, di- og trialkylaminer med alkylgrupper med maksimalt 18 karbonatomer eller arylalkylaminer med det samme antall karbonatomer i den alifatiske del og hvor aryl angir en benzengruppe eventuelt substituert med 1-3 metylgrupper eller halogenatomer eller hydroksygrupper. De biologisk inaktive baser for dannelse av saltene kan også være cykliske, såsom monocykliske alkylenaminer med ringer på 4-6 karbonatomer, eventuelt avbrutt i ringen av heteroatomer valgt fra gruppen bestående av nitrogen, oksygen og svovel, såsom piperidin, piperazin eller morfolin, eller de kan for eksempel være substituert med amino- eller hydroksyfunksjoner, såsom aminoetanol, etylendiamin, efedrin eller kolin.

Det er også mulig å danne de kvaternære ammoniumsalter av partielle estere, for eksempel tetraalkylammoniumsalter med ovennevnte antall karbonatomer og fortrinnsvis salter av samme type hvor den fjerde alkylgruppe har 1-4 karbonatomer, for eksempel en metylgruppe.

De biologisk aktive aminer hvis terapeutiske virkning kan utnyttes, innbefatter azoterte og basiske legemidler såsom de som er innbefattet i følgende grupper:

alkaloider, peptider, fenotiazin, benzodiazepin, tioxanten, hormoner, vitaminer, krampestillende midler, antipsykotika, anti-brekkmidler, anestetika, hypnotika, anoreksika, beroligende midler, muskelavslappende midler, koronar-vasodilatorer, antineoplastika, antibiotika, antibakterielle midler, antivirale midler, antimalaria-midler, karbonsyreanhydrase-inhibitorer, ikkesteroidale anti-inflammatoriske midler, vasokonstriktorer, kolinergiske agonister, kolinergiske antagonist, adrenergiske agonister,

adrenergiske blokkere, narkotiske antagonister.

Alle slike legemidler med de basiske azoterte grupper kan nevnes som eksempler når det gjelder anvendelse av estere. Saltdannelse av de ikke-forestrede karboksygrupper med terapeutisk aktive baser kan erstatte eller utfylle den bærende funksjon hos de nye tverrbundne derivater oppnådd ved forestring med terapeutisk aktive alkoholer og representerer derfor et annet spesielt tilfelle når det gjelder anvendelse av forbindelsene fremstilt ifølge oppfinnelsen som terapeutiske bærermaterialer ifølge punkt 2): de aktive baser bæres både av de nøytrale salter som kan oppnås ved tilsetning av den basiske, støkiometriske mengde, både ved de basiske salter som kan oppnås ved tilsetning av et overskudd av base eller av de syrer som kan oppnås ved tilsetning av base i underskudd.

De hyaluronsyrederivater som er fremstilt ifølge den foreliggende oppfinnelse er spesielt egnet siden de er medikamenter for lokal anvendelse, særlig innenfor oftalmologien, hvor de viser spesiell forenlighet med hornhinne-epitelet og derfor tolereres meget godt, uten noen sensibiliseringseffekter. Når videre medikamentene administreres i form av konsentrerte oppløsninger med elastisk-viskøse karakteregenskaper eller i fast form, er det mulig å oppnå homogene, stabile og fullstendig klare filmer på hornhinne-epitelet som også henger fullstendig fast, hvilket garanterer forlenget biotilgjengelighet for legemidlet og som derfor utgjør utmerkede preparater med en forsinkelseeffekt.

Disse øyemedikamenter har enestående verdi særlig på veterinærområdet, når man tar i betraktning at det for øyeblikket ikke er noen veterinærspesialiteter som inneholder kjemiske midler. Faktisk brukes produkter som er ment for human anvendelse, på dyr, og disse kan ikke alltid garantere et spesifikt virkningsområde og er noen ganger uegnet for anvendelse ved de betingelser under hvilke de skal administreres. Dette er for eksempel tilfellet ved behandling av infeksjøs keratokonjunktivitt, "pink eye" eller IBK, en infeksjon som vanligvis angriper kveg, sauer og geiter.

Sansynnlighvis finnes det spesifikke etiologiske faktorer for disse tre arter, og mer spesielt synes hoved-mikroorganismen når det gjelder kveg å være *Moraxella bovis* (skjønt andre aktive stoffer av viral opprinnelse ikke skal utelukkes, såsom Rhinotracheit-viruset, når det gjelder sauer *Mycoplasma*, *Rickettsia* og *Chlamydia*, når det gjelder geiter *Rickettsia*). Sykdommen viser seg i akutt form og har tendens til å spres hurtig; i begynnelsesfasene er symptomatologien karakterisert ved blefarospasme og stor tåreflom, fulgt av materietømming, konjunktivitt og hornhinnebetennelse, ofte forbundet med feber, reduksjon i apetitten og melkeproduksjonen. Spesielt alvorlig er de hornhinneskader som i slutt-fasene til og med kan forårsake perforering av selve hornhinnen. Det kliniske forløp varierer fra noen få dager til flere uker.

Et vidt område av behandlinger innbefattende kjemiske midler anvendes, administrert både lokalt (ofte forbundet med steroide, anti-inflammatoriske midler), og systemisk, såsom: tetracyklin, såsom oksytetracyklin, penicillin, såsom cloxacillin og benzylpenicillin, sulfamid-preparater, polymyxin B (knyttet til miconazol og prednisolon), kloramfenikol, tylosin og kloromycetin. Lokal behandling av sykdommen er fremdeles et åpent problem, til tross for sin tilsynelatende enkelhet, siden det av en eller annen grunn ikke har vært mulig med de øyepreparater som inntil nå har vært anvendt, å oppnå konsentrasjoner av terapeutisk effektive antibiotika eller sulfamid-preparater i tåresekresjonen. Dette faktum kan lett forstås når det gjelder oppløsninger, idet man tar i betraktning den hovedsakelig bøyde hodestilling hos ovennevnte dyr, men det gjelder også halvfaste medikamenter, siden tilsetningsstoffene som vanligvis anvendes i disse, ikke har de nødvendige egenskaper når det gjelder vedhefting til hornhinnens overflate. Dette er fordi de vanligvis ikke har en tilstrekkelig høy konsentrasjon av aktiv substans og ikke kan oppnå fullstendig fordeling av samme (nærvær av en fordelingsgradient). Disse ulemper når det gjelder konvensjonelle midler for øyebetennelse er for eksempel blitt beskrevet av Slatte et al i "Austr.vet.J.",

1982, 59 (3), sider 69-72. Med esterne fremstilt ifølge den foreliggende oppfinnelse kan disse vanskeligheter overvinnes. Nærværet av hyaluronsyreesteren som bæreremateriale i øye-legemidler muliggjør faktisk utforming av utmerkede preparater uten noen konsentrasjonsgradient for den aktive substans og som derfor er fullstendig homogene, klare og vedhengende på hornhinne-epitelet, uten noen sensibiliseringseffekter og slik at den aktive substans virker som et utmerket bæreremateriale, eventuelt også med en forsinkelseseffekt. Medikamenter inneholdende de nye derivater som kan anvendes ved øyebehandling, har hovedsakelig miotisk, sårtilhørende, antiinflammatorisk og antimikrobiell/antibiotisk effekt. Noen eksempler på antibiotiske substanser er: basiske og ikke-basiske antibiotika, for eksempel aminoglykosid-midler, makrolidmidler, tetracyklin og peptider, såsom for eksempel gentamycin, neomycin, streptomycin, dihydrostreptomycin, kanamycin, amikacin, tobramycin, spektinomycin, erytromycin, oleandomycin, karbomycin, spiramycin, oksytetracyklin, rolitetracyklin, bacitracin, polymyxin B, gramicidin, colistin, kloramfenikol, linkomycin, vankomycin, novobiocin, ristocetin, klindamycin, amfotericin B, griseofulvin, nystatin og eventuelt deres salter, såsom sulfater eller nitrater, eller forbindelser av samme enten innbyrdes eller med andre aktive prinsipper, såsom for eksempel de som er nevnt nedenfor.

Andre øye-legemidler som kan anvendes med fordel, er: andre anti-infeksjonsmidler såsom dietylkarbamazin, mebendazol, sulfamid-midler såsom sulfacetamid, sulfadiazin, sulfisoksazol; antivirale midler og antitumormidler såsom joddeoksyuridin, adeninarabinosid, trifluortymidin, acyclovir, etyldeoksyuridin, bromvinyldeoksyuridin, 5-jod-5'-amino-2',5'-dideoksyuridin; steroide, anti-inflammatoriske midler såsom deksametason, hydrokortison, prednisolon, fluormetolon, medryson og eventuelt deres estere, for eksempel fosforsyreestere; ikke-steroid, anti-inflammatoriske midler såsom indometacin, oksyfenbutazon, flurbiprofen; sårtilhørende midler såsom epidermis-vekstfaktor EGF; lokale anestetika

såsom Benoksinat, proparakain og eventuelt deres salter; kolinergiske agonist-legemidler såsom pilokarpin, metakolin, karbamylkolin, aceclidin, fysostigmin, neostigmin, demekarium og eventuelt deres salter; kolinergiske blokkerings-legemidler såsom atropin og dets salter; adrenergiske agonist-legemidler såsom noradrenalin, adrenalin, nafazolin, metoksamin og eventuelt deres salter; adrenergiske blokkerings-legemidler såsom propranolol, timolol, pindolol, bupranolol, atenolol, metoprolol, oksprenolol, praktolol, butoksamin, sotalol, butadrin, labetalol og eventuelt deres salter.

Eksempler på aktive substanser for anvendelse alene eller i forbindelser innbyrdes med andre aktive prinsipper innenfor dermatologien er: terapeutiske midler såsom anti-infeksjonsmidler, antibiotika, antimikrobielle midler, anti-inflammatoriske midler, cytostatika, cytotoksika, anti-virale midler, anestetika og forebyggende midler såsom solbeskyttelsesmidler, deodoranter, antiseptiske midler og desinfeksjonsmidler.

Av de eksempler som er angitt for oftalmologi og dermatologi er det rimelig å anta ved analogi hvilke av forbindelsene fremstilt ifølge den foreliggende oppfinnelse som er egnet for anvendelse på de forskjellige områder av medisinen, såsom for eksempel otolaryngologi, gynekologi, angiologi, nevrologi eller hvilken som helst annen type patologi i forbindelse med de indre organer som kan behandles ved lokale tilførsler, for eksempel ved rektal virkning. Det er selvfølgelig mulig å fremstille forbindelser av terapeutisk aktive substanser med de nye derivater fremstilt ifølge den foreliggende oppfinnelse, egnet for parenteral administrering. For oppnåelse av vandige oppløsninger for injeksjon i sistnevnte tilfelle bør hyaluronsyrederivater med et lavt nivå av tverrbinding og/eller forestring velges. Derivater som bare er litt, eller ikke i det hele tatt, løselige i vann, kan anvendes for fremstilling av forbindelser som inneholder de aktive substanser for administrering i oppløsninger av organiske substanser, for eksempel oljeaktige oppløsninger.

Medikamentene av den type som er beskrevet her for topisk

anvendelse, kan være i fast form, såsom frysetørrede pulvere inneholdende bare de to komponenter som en blanding eller separat. Slike medikamenter i fast form danner ved kontakt med det epitel som skal behandles, mer eller mindre konsentrerte oppløsninger i henhold til beskaffenheten av det spesielle epitel med de samme karakteregenskaper som de oppløsninger som tidligere er fremstilt in vitro og som representerer et annet spesielt interessant aspekt ved den foreliggende oppfinnelse. Slike oppløsninger er fortrinnsvis i destillert vann eller steril saltoppløsning og inneholder fortrinnsvis intet annet farmasøytisk bærer materiale ved siden av hyaluronsyreesteren eller ett av dens salter.

Konsentrasjonene av slike oppløsninger kan også variere innenfor vide grenser, for eksempel mellom 0,01 og 75% både for hver av de to komponentene separat og for blandinger eller salter av dem. Spesielt foretrukket er oppløsninger med utpregede elsatisk-viskøse egenskaper, for eksempel med et innhold på 10-90% av medikamentet eller av hver av dets komponenter. Spesielt viktige er medikamenter av denne type, både i vannfri form (frysetørret pulver) eller som konsentrerte oppløsninger eller fortynnet i vann eller saltoppløsning, eventuelt med tilsetning av additiv- eller hjelpesubstanser, såsom spesielt desinfeksjonssubstanser eller mineralsalter som fungerer som bærer materiale eller andre, for oftalmologisk anvendelse.

Blant forbindelsene fremstilt ifølge oppfinnelsen er det foretrukket å velge, ettersom tilfellet er, forbindelser med en surhetsgrad som er egnet for det miljø de skal tilføres til, det vil si med en fysiologisk tolererbar pH-verdi. For eksempel kan pH-verdien i ovennevnte salter av hyaluronsyreesterne med en basisk aktiv substans, justeres ved passende regulering av mengden polysakkarid, dens salter og av selve den basiske substans. Hvis således for eksempel surheten av et salt av en hyaluronsyreester med en basisk substans er for høy, nøytraliseres overskuddet av frie syregrupper med ovennevnte uorganiske baser, for eksempel med natrium eller kalium eller ammoniumhydrat.

Forbindelsene fremstilles ifølge oppfinnelsen ved at et kvarternært ammoniumsalt av hyaluronsyre omsettes i et aprotisk løsningsmiddel med et dihalogenid med formelen $\text{Hal-R}^1\text{-Hal}$, hvori Hal er halogen og R^1 er en $\text{C}_2\text{-C}_{16}$ -alkylen-gruppe eller en $\text{C}_1\text{-C}_4$ -alkylenfenyl- $\text{C}_1\text{-C}_4$ -alkylengruppe og, om ønsket, i tillegg med et halogenid med formelen Hal-R , hvori Hal er halogen og R er en $\text{C}_1\text{-C}_{18}$ -alkylgruppe, en fenyl- $\text{C}_1\text{-C}_4$ -alkylgruppe eller en polycyklisk $\text{C}_{18}\text{-C}_{24}$ -alifatisk-cykloalifatisk gruppe substituert med en hydroksygruppe og tre oksogrupper, og om ønsket, en erholdt partialester omsettes med et alkali-metall- eller jordalkalimetallsalt som gir det tilsvarende, partielle alkali-metall- eller jordalkali-metallsalt.

Reaksjonen kan utføres i et egnet løsningsmiddel, for eksempel en alkohol, fortrinnsvis den som svarer til den alkylgruppe som skal innføres i karboksygruppen, men kan også utføres i ikke-polare løsningsmidler såsom ketoner, etere såsom dioksan, eller aprotiske løsningsmidler såsom dimetylsulfoksyd. Som base er det mulig å anvende for eksempel et hydrat av et alkalimetall, jordalkalimetall eller magnesium eller et oksyd av sølv eller et basisk salt av ett av disse metaller, såsom karbonat, og blant de organiske baser en tertiær azotert base såsom pyridin eller kollidin. I stedet for basen kan det anvendes en ionebytter av basisk type.

En annen forestringsmetode innbefatter metallsalter eller salter med organiske azoterte baser, for eksempel ammonium eller ammoniumsubstitutt-salter. Fortrinnsvis bør saltene av alkali- eller jordalkalimetallene anvendes, men hvilket som helst annet metallsalt kan også anvendes. Foretringsmidlene er også i dette tilfelle de som er nevnt ovenfor, og det samme gjelder løsningsmidlene. Fortrinnsvis bør det anvendes aprotiske løsningsmidler, for eksempel dimetylsulfoksyd og dimetylformamid. Disse forestringsmetoder kan selvfølgelig også anvendes for fremstilling av de enkle estere beskrevet ovenfor.

I henhold til en fremgangsmåte beskrevet i US-patent 4.851.521, og som angår de enkle estere av hyaluronsyre, kan

disse fremstilles fordelaktig idet man starter med de kvaternære ammoniumsalter av hyaluronsyre med et foretringsmiddel i et aprotisk løsningsmiddel, såsom dialkylsulfoksyder, dialkylkarboksylamider, såsom spesielt lavere-alkyl-dialkylsulfoksyder, fremfor alt dimetylsulfoksyd, og lavere-alkyl-dialkylamider av lavere alifatiske syrer, såsom dimetyl- eller dietylformamid eller dimetyl- eller dietylacetamid. Reaksjonen utføres fortrinnsvis i et temperaturområde på mellom 0 og 100°, og særlig mellom 25 og 75°, for eksempel ved ca. 30°C. Forestringen utføres fortrinnsvis ved at man gradvis tilsetter foretringsmidlet til ovennevnte ammoniumsalt oppløst i ett av de nevnte løsningsmidler, for eksempel i dimetylsulfoksyd.

Den samme fremgangsmåte kan anvendes for fremstilling ifølge den foreliggende oppfinnelse av de typiske tverrbundne estere, det vil si at brobindingene mellom to karboksygrupper dannes lett ved hjelp av foretringssubstanser som stammer fra ovennevnte flerverdige alkoholer, på de kvaternære ammoniumsalter av hyaluronsyre. Som kvaternære utgangs-ammoniumsalter er det foretrukket å anvende lavere ammoniumtetraalkylater, idet alkylgruppene fortrinnsvis har 1-6 karbonatomer. Som et første valg bør tetrabutylammoniumhyaluronat anvendes. Disse kvaternære ammoniumsalter kan fremstilles ved at et metallsalt av hyaluronsyre, fortrinnsvis ett av dem som er nevnt ovenfor, særlig natrium- eller kaliumsalt, omsettes i vandig oppløsning med en sulfonsyreharpiks som er dannet til salt med den kvaternære ammoniumbase. Tetraalkylammoniumhyaluronat kan oppnås ved frysetørring av eluatet.

Tetraalkylammoniumhyaluronatene som stammer fra lavere-alkyl-forbindelser, særlig alkylforbindelser med 1-6 karbonatomer, er nye og utgjør et annet formål ved fremgangsmåten ifølge den foreliggende oppfinnelse. Slike salter har uventet vist seg å være løselige i ovennevnte aprotiske løsningsmidler, og forestring av hyaluronsyre ifølge ovennevnte nye fremgangsmåte er derfor spesielt lett og gir rikelige utbytter. Det er derfor bare ved en slik fremgangsmåte at det er mulig nøyaktig å dosere antallet

hyaluronsyre-karboksygrupper som skal forestres.

En variasjon av den tidligere spesifiserte fremgangsmåte består av omsetning av kalium- eller natriumsaltet av hyaluronsyre, suspendert i et egnet løsningsmiddel såsom dimetylsulfoksyd, med et egnet foretringsmiddel i nærvær av en katalyserende mengde av kvaternært ammoniumsalt, såsom tetrabutylammoniumjodid. For fremstilling av esterne ifølge den foreliggende oppfinnelse kan hyaluronsyrer av hvilken som helst opprinnelse anvendes, for eksempel de syrer som ekstraheres fra ovennevnte naturlige utgangsmaterialer, for eksempel fra hanekam. Fremstillingen av slike syrer er beskrevet i litteraturen; fortrinnsvis bør rensede hyaluronsyrer anvendes. Ifølge oppfinnelsen er det foretrukket å anvende hyaluronsyrer som omfatter molekyllfraksjonene av de komplette syrer som oppnås direkte ved ekstraksjon av de organiske materialer med molekyllvekt som kan variere i stor grad, for eksempel mellom 90-80% og 0,2% av den komplette syres molekyllvekt, fortrinnsvis mellom 5 og 0,2%. Disse fraksjoner kan oppnås ved forskjellige fremgangsmåter beskrevet i litteraturen, d.v.s. ved hydrolysering eller oksydering eller ved enzymatiske midler eller fysiske fremgangsmåter, for eksempel mekaniske fremgangsmåter eller ved bestråling, og derfor dannes det ofte opprinnelige ekstrakter under disse samme rensningsprosesser (se for eksempel ovennevnte artikkel av Balazs et al i "Cosmetics & Toiletries"). Separasjonen og rensningen av de oppnådde molekyllfraksjoner utføres for eksempel ved kjente teknikker, for eksempel ved molekyllfiltrering.

En rensset HY-fraksjon er for eksempel den som kalles "ikke-inflammatorisk natriumhyaluronat-NIF-NaHA" beskrevet av Balazs i brosjyren "Healon" - A guide to its use in Ophthalmic Surgery - D. Miller & R. Stegmann, forfattere John Wiley & Sons N.Y 81983. s.5. Spesielt viktige som utgangsmaterialer for esterne som er fremstilt ifølge den foreliggende oppfinnelse, er de to rensede fraksjoner som kan oppnås fra hyaluronsyre, for eksempel den type som ekstraheres fra hanekam, kjent ved navene "Hyalastin" og "Hyalectin". Frak-

sjonen Hyalastin har en gjennomsnittlig molekylvekt på mellom 50.000 og 100.000, mens fraksjonen Hyalektin har en gjennomsnittlig molekylvekt på mellom 500.000 og 730.000. En fraksjon kombinert med disse to fraksjoner er også blitt isolert og karakterisert til å ha en gjennomsnittlig molekylvekt på mellom 250.000 og 350.000. Denne kombinerte fraksjon kan oppnås idet man får et utbytte av total mengde hyaluronsyre lik 80% av den mengde som er tilgjengelig i det spesielle utgangsmateriale, mens fraksjonen Hyalektin kan oppnås med et utbytte på 30% og fraksjonen Hyalastin med et utbytte på 50% av utgangs-HY. Fremstillingen av disse fraksjoner er beskrevet i Eksempler 38 og 40.

I de tverrbundne derivatene av hyaluronsyre fremstilt ifølge oppfinnelsen, kan de ikke-forestrede karboksygrupper være frie eller dannet til salt eller delvis dannet til salt, og det fås derfor flere forskjellige typer tverrbundne produkter; det vil si slike hvor de gjenværende karboksygrupper er frie eller dannet til salt, slike hvor de gjenværende karboksygrupper er fullstendig eller delvis forestret, og i sistnevnte kan de gjenværende grupper i sin tur være frie eller dannet til salt. Således er et helt område av produkter tilgjengelig, idet de varierer når det gjelder deres fysiske egenskaper og særlig når det gjelder deres surhetsgrad og viskoelastiske egenskaper og deres evne til å danne geler. Antallet syregrupper som skal holdes frie, kan være viktig ved fremstilling av medikamenter med en spesiell pH-verdi.

Fremstillingen av saltene av de nye derivater kan utføres på kjent måte, for eksempel ved at hyaluronsyrederivatet omsettes med den beregnede basiske mengde av for eksempel alkaliske hydrater eller basiske salter av alkalimetaller, såsom karbonater eller bikarbonater. Det er mulig for eksempel først å fremstille vandige oppløsninger av hyaluronsyrederivatet og av basen, idet slike substanser befris for de vandige oppløsninger av sine salter med egnede ionebyttere, og de to oppløsninger blandes ved lav temperatur, for eksempel ved 0-20°; hvis det

således oppnådde salt er lett oppløselig i vann, blir det frysetørket, mens de mindre oppløselige salter kan skilles ved sentrifugering eller filtrering eller dekantering og eventuelt deretter tørkes. Når det gjelder de organiske baser som skal bæres med de tverrbundne derivater fremstilt ifølge oppfinnelsen, kan de medikamenter som fås som salter av slike baser med de nye derivater, være nøytrale, sure eller basiske i henhold til hvorvidt det tilsettes stœkiometriske mengder eller om det er underskudd eller overskudd av base.

Det er mulig å fremstille medikamenter av ovennevnte type idet man starter med de tidligere isolerte salter og som eventuelt er renset, i vannfri tilstand, såsom amorfe pulvere, som ved kontakt med det vev som skal behandles, utgjør en konsentrert vandig oppløsning med gelatinøs karakter, viskøs konsistens og med elastiske egenskaper. Disse karakteregenskaper bibeholdes også ved sterkere fortynninger og kan anvendes i stedet for de ovennevnte vannfrie salter, mer eller mindre konsentrerte oppløsninger i vann eller saltoppløsning, eventuelt med tilsetning av andre eksipienser eller additiver, såsom andre mineralsalter, under regulering av pH og det osmotiske trykk. Det er selvfølgelig også mulig å anvende saltene til fremstilling av geler, innlegg, kremer eller salver, innbefattende andre eksipienser eller bestanddeler som anvendes i tradisjonelle utformninger av disse farmasøytiske preparater.

Blant de forbindelser som er fremstilt ifølge den foreliggende oppfinnelse skal de ovenfor beskrevne estere og deres salter og de som er illustrert ved de følgende illustrerende eksempler spesielt bemerkes.

Oppfinnelsen er illustrert ved hjelp av følgende eksempler, hvor DMSO betyr dimetylsulfoksyd. De produkter som er beskrevet i eksemplene omfatter tverrbundne estere fremstilt ifølge oppfinnelsen, idet en prosentandel av hyaluronsyre-karboksylogruppene forestres med en flerverdig alkohol og resten av karboksylogruppene dannes til salt og/eller forestres med en enverdig alkohol. I Tabell 1 er

oppregnet de forskjellige produkter ifølge eksempler 1-37 som beskriver antallet karboksylgrupper forestret med den spesifiserte flerverdige alkohol, og antaller karboksylgrupper som er dannet til salt med natrium og/eller forestret med den spesifiserte enverdige alkohol.

Eksempel 1 - Fremstilling av hyaluronsyre (HY) delvis forestret med etanol og delvis tverrbundet med 1,3-propandiol

6,21 g tetrabutylammoniumsalt av HY (10 mekv) solubiliseres i 248 ml DMSO ved 25°C under strengt fuktighetsfrie betingelser, i nitrogenatmosfære og borte fra lys. 0,078 g etyljodid tilsettes (0,5 mM) og oppløsningen agiteres i 15 timer ved 30°C. 0,074 g 1,3-dijodpropan tilsettes (0,25 mM, svarende til 0,5 mekv), og etter homogenisering holdes oppløsningen ved 30°C i 24 timer.

For omdannelse av rest-tetrabutylammoniumkarboksylgruppene til natriumsalt, tilsettes det til den resulterende oppløsning 2,5 g NaCl oppløst i 100 ml destillert H₂O, mens det avkjøles fra utsiden med et vann/is-bad.

500 ml aceton tilsettes, utfelningen fraskilles ved filtrering, vaskes 3 ganger med 100 ml aceton/H₂O i forholdet 5:1 og 3 ganger med 100 ml rent aceton, og vakuumtørres deretter.

4,01 g av forbindelsen som er angitt i overskriften, oppnås.

Etoksyl-bestemmelse utføres i henhold til fremgangsmåten ifølge Cundiff et al (Anal. Biochem. 33, 1028, 1961) og viser et innhold på 0,56 vekt% som etanol (teoretisk: 0,574). Analyse av den totale mengde estergrupper utføres ved forsåpningsreaksjon med et overskudd av 0,1 N NaOH ved 50°C i 30 minutter. Overskuddet bestemmes ved titrering med 0,1 N HCl under anvendelse av fenolftalein som indikator. På denne måte er det mulig å bestemme et innhold av total mengde estergrupper på 0,24 mekv/g (teoretisk 0,25).

Eksempel 2 - Fremstilling av hyaluronsyre (HY) delvis foretret med etanol og delvis tverrbundet med 1,3-propandiol

6,21 g tetrabutylammoniumsalt av HY (10 mekv) solubiliseres i 248 ml DMSO ved 25°C under strengt fuktighetsfrie betingelser, i nitrogenatmosfære og borte fra lys. 0,078 g etyljodid tilsettes (0,5 mM) og oppløsningen agiteres i 15 timer ved 30°C. 0,148 g 1,3-dijodpropan tilsettes (0,5 mM, svarende til 1 mekv), og etter homogenisering holdes oppløsningen ved 30°C i 24 timer.

For omdannelse av rest-tetrabutylammoniumkarboksygruppene til natriumsalt, tilsettes det til den resulterende oppløsning 2,5 g NaCl oppløst i 100 ml destillert H₂O, mens det avkjøles fra utsiden med et vann/is-bad.

500 ml aceton tilsettes, utfelningen fraskilles ved filtrering, vaskes 3 ganger med 100 ml aceton/H₂O i forholdet 5:1 og 3 ganger med 100 ml rent aceton, og vakuumtørres deretter.

3,99 g av forbindelsen som er angitt i overskriften, oppnås.

Etoksyl-bestemmelse utføres i henhold til fremgangsmåten ifølge Cundiff et al og viser et innhold innhold på 0,56 vekt% som etanol (teoretisk: 0,574). Analyse av den totale mengde estergrupper utføres ved forsåpningsreaksjon med et overskudd av 0,1 N NaOH ved 50°C i 30 minutter. Overskuddet bestemmes ved titrering med 0,1 N HCl under anvendelse av fenolftalein som indikator. På denne måte er det mulig å bestemme et innhold av total mengde estergrupper på 0,36 mekv/g (teoretisk 0,374).

Eksempel 3 - Fremstilling av hyaluronsyre (HY) delvis foretret med etanol og delvis tverrbundet med 1,3-propandiol

6,21 g tetrabutylammoniumsalt av HY (10 mekv) solubiliseres i 248 ml DMSO ved 25°C under strengt fuktighetsfrie betingelser, i nitrogenatmosfære og borte fra lys. 0,078 g etyljodid tilsettes (0,5 mM) og oppløsningen agiteres i 15

timer ved 30°C. 0,296 g 1,3-dijodpropan tilsettes (1 mM, svarende til 2 mEkv), og etter homogenisering holdes oppløsningen ved 30°C i 24 timer.

For omdannelse av rest-tetrabutylammoniumkarboksygruppene til natriumsalt, tilsettes det til den resulterende oppløsning 2,5 g NaCl oppløst i 100 ml destillert H₂O, mens det avkjøles fra utsiden med et vann/is-bad.

500 ml aceton tilsettes, utfelningen fraskilles ved filtrering, vaskes 3 ganger med 100 ml aceton/H₂O i forholdet 5:1 og 3 ganger med 100 ml rent aceton, og vakuumtørres deretter.

3,98 g av forbindelsen som er angitt i overskriften, oppnås.

Etoksyl-bestemmelse utføres i henhold til fremgangsmåten ifølge Cundiff et al og viser et innhold innhold på 0,56 vekt% som etanol (teoretisk: 0,574). Analyse av den totale mengde estergrupper utføres ved forsåpningsreaksjon med et overskudd av 0,1 N NaOH ved 50°C i 30 minutter. Overskuddet bestemmes ved titrering med 0,1 N HCl under anvendelse av fenolftalein som indikator. På denne måte er det mulig å bestemme et innhold av total mengde estergrupper på 0,61 mEkv/g (teoretisk 0,623).

Eksempel 4 - Fremstilling av hyaluronsyre (HY) delvis forestret med etanol og delvis tverrbundet med 1,3-propandiol

6,21 g tetrabutylammoniumsalt av HY (10 mekv) solubiliseres i 248 ml DMSO ved 25°C under strengt fuktighetsfrie betingelser, i nitrogenatmosfære og borte fra lys. 0,156 g etyljodid tilsettes (1 mM) og oppløsningen agiteres i 15 timer ved 30°C. 0,296 g 1,3-dijodpropan tilsettes (1 mM, svarende til 2 mekv), og etter homogenisering holdes oppløsningen ved 30°C i 24 timer.

For omdannelse av rest-tetrabutylammoniumkarboksygruppene til natriumsalt, tilsettes det til den resulterende oppløsning 2,5 g NaCl oppløst i 100 ml destillert H₂O, mens det avkjøles fra utsiden med et vann/is-bad.

500 ml aceton tilsettes, utfelningen fraskilles ved filtrering, vaskes 3 ganger med 100 ml aceton/H₂O i forholdet 5:1 og 3 ganger med 100 ml rent aceton, og vakuumtørres deretter.

4,00 g av forbindelsen som er angitt i overskriften, oppnås.

Etoksyl-bestemmelse utføres i henhold til fremgangsmåten ifølge Cundiff et al og viser et innhold innhold på 1,08 vekt% som etanol (teoretisk: 1,15). Analyse av den totale mengde estergrupper utføres ved forsåpningsreaksjon med et overskudd av 0,1 N NaOH ved 50°C i 30 minutter. Overskuddet bestemmes ved titrering med 0,1 N HCl under anvendelse av fenolftalein som indikator. På denne måte er det mulig å bestemme et innhold av total mengde estergrupper på 0,735 mekv/g (teoretisk 0,747).

Eksempel 5 - Fremstilling av hyaluronsyre (HY) delvis forestret med etanol og delvis tverrbundet med 1,3-propandiol

6,21 g tetrabutylammoniumsalt av HY (10 mekv) solubiliseres i 248 ml DMSO ved 25°C under absolutt tørre betingelser, i nitrogenatmosfære og borte fra lys. 0,312 g etyljodid tilsettes (2 mM) og oppløsningen agiteres i 15 timer ved 30°C. 0,296 g 1,3-dijodpropan tilsettes (1 mM, svarende til 2 mEkv), og etter homogenisering holdes oppløsningen ved 30°C i 24 timer.

For omdannelse av rest-tetrabutylammoniumkarboksylgruppene til natriumsalt, tilsettes det til den resulterende oppløsning 2,5 g NaCl oppløst i 100 ml destillert H₂O, mens det avkjøles fra utsiden med et vann/is-bad.

500 ml aceton tilsettes, utfelningen fraskilles ved filtrering, vaskes 3 ganger med 100 ml aceton/H₂O i forholdet 5:1 og 3 ganger med 100 ml rent aceton, og vakuumtørres deretter.

4,01 g av forbindelsen som er angitt i overskriften, oppnås.

Etoksyl-bestemmelse utføres i henhold til fremgangsmåten

ifølge Cundiff et al og viser et innhold innhold på 2,18 vekt% som etanol (teoretisk: 2,29). Analyse av den totale mengde estergrupper utføres ved forsåpningsreaksjon med et overskudd av 0,1 N NaOH ved 50°C i 30 minutter. Overskuddet bestemmes ved titrering med 0,1 N HCl under anvendelse av fenolftalein som indikator. På denne måte er det mulig å bestemme et innhold av total mengde estergrupper på 0,98 mekv/g (teoretisk 0,995).

Eksempel 6 - Fremstilling av hyaluronsyre (HY) delvis forestret med etanol og delvis tverrbundet med 1,3-propandiol

6,21 g tetrabutylammoniumsalt av HY (10 mekv) solubiliseres i 248 ml DMSO ved 25°C under strengt fuktighetsfrie betingelser, i nitrogenatmosfære og borte fra lys. 0,624 g etyljodid tilsettes (4 mM) og oppløsningen agiteres i 15 timer ved 30°C. 0,296 g 1,3-dijodpropan tilsettes (1 mM, svarende til 2 mekv), og etter homogenisering holdes oppløsningen ved 30°C i 24 timer.

For omdannelse av rest-tetrabutylammoniumkarboksygruppene til natriumsalt, tilsettes det til den resulterende oppløsning 2,5 g NaCl oppløst i 100 ml destillert H₂O, mens det avkjøles fra utsiden med et vann/is-bad.

500 ml aceton tilsettes, utfelningen fraskilles ved filtrering, vaskes 3 ganger med 100 ml aceton/H₂O i forholdet 5:1 og 3 ganger med 100 ml rent aceton, og vakuumtørres deretter.

4,00 g av forbindelsen som er angitt i overskriften, oppnås.

Etoksyl-bestemmelse utføres i henhold til fremgangsmåten ifølge Cundiff et al og viser et innhold innhold på 4,5 vekt% som etanol (teoretisk: 4,57). Analyse av den totale mengde estergrupper utføres ved forsåpningsreaksjon med et overskudd av 0,1 N NaOH ved 50°C i 30 minutter. Overskuddet bestemmes ved titrering med 0,1 N HCl under anvendelse av fenolftalein som indikator. På denne måte er det mulig å bestemme et innhold av total mengde estergrupper på 1,43 mekv/g

(teoretisk 1,49).

Eksempel 7 - Fremstilling av hyaluronsyre (HY) delvis foretret med etanol og delvis tverrbundet med 1,3-propandiol

6,21 g tetrabutylammoniums salt av HY (10 mekv) solubiliseres i 248 ml DMSO ved 25°C under absolutt tørre betingelser, i nitrogenatmosfære og borte fra lys. 0,934 g etyljodid tilsettes (6 mM) og oppløsningen agiteres i 15 timer ved 30°C. 0,296 g 1,3-dijodpropan tilsettes (1 mM, svarende til 2 mekv), og etter homogenisering holdes oppløsningen ved 30°C i 24 timer.

For omdannelse av rest-tetrabutylammoniumkarboksygruppene til natriumsalt, tilsettes det til den resulterende oppløsning 2,5 g NaCl oppløst i 100 ml destillert H₂O, mens det avkjøles fra utsiden med et vann/is-bad.

500 ml aceton tilsettes, utfelningen fraskilles ved filtrering, vaskes 3 ganger med 100 ml aceton/H₂O i forholdet 5:1 og 3 ganger med 100 ml rent aceton, og vakuumtørres deretter.

4,03 g av forbindelsen som er angitt i overskriften, oppnås.

Etoksyl-bestemmelse utføres i henhold til fremgangsmåten ifølge Cundiff et al og viser et innhold på 6,74 vekt% som etanol (teoretisk: 6,83). Analyse av den totale mengde estergrupper utføres ved forsåpningsreaksjon med et overskudd av 0,1 N NaOH ved 50°C i 30 minutter. Overskuddet bestemmes ved titrering med 0,1 N HCl under anvendelse av fenolftalein som indikator. På denne måte er det mulig å bestemme et innhold av total mengde estergrupper på 1,96 mekv/g (teoretisk 1,98).

Eksempel 8 - Fremstilling av hyaluronsyre (HY) delvis foretret med etanol og delvis tverrbundet med 1,3-propandiol

6,21 g tetrabutylammoniums salt av HY (10 mekv) solubiliseres i 248 ml DMSO ved 25°C under absolutt tørre

betingelser, i nitrogenatmosfære og borte fra lys. 1,170 g etyljodid tilsettes (7,5 mM) og oppløsningen agiteres i 15 timer ved 30°C. 0,296 g 1,3-dijodpropan tilsettes (1 mM, svarende til 2 mekv), og etter homogenisering holdes oppløsningen ved 30°C i 24 timer.

For omdannelse av rest-tetrabutylammoniumkarboksy-gruppene til natriumsalt, tilsettes det til den resulterende oppløsning 2,5 g NaCl oppløst i 100 ml destillert H₂O, mens det avkjøles fra utsiden med et vann/is-bad.

500 ml aceton tilsettes, utfelningen fraskilles ved filtrering, vaskes 3 ganger med 100 ml aceton/H₂O i forholdet 5:1 og 3 ganger med 100 ml rent aceton, og vakuumtørres deretter.

4,02 g av forbindelsen som er angitt i overskriften, oppnås.

Etoksyl-bestemmelse utføres i henhold til fremgangsmåten ifølge Cundiff et al og viser et innhold innhold på 8,46 vekt% som etanol (teoretisk: 8,52). Analyse av den totale mengde estergrupper utføres ved forsåpningsreaksjon med et overskudd av 0,1 N NaOH ved 50°C i 30 minutter. Overskuddet bestemmes ved titrering med 0,1 N HCl under anvendelse av fenolftalein som indikator. På denne måte er det mulig å bestemme et innhold av total mengde estergrupper på 2,28 mekv/g (teoretisk 2,34).

Eksempel 9 - Fremstilling av hyaluronsyre (HY) delvis forestret med etanol og delvis tverrbundet med 1,3-propandiol

6,21 g tetrabutylammoniumsalt av HY (10 mekv) solubiliseres i 248 ml DMSO ved 25°C under absolutt tørre betingelser, i nitrogenatmosfære og borte fra lys. 0,624 g etyljodid tilsettes (4 mM) og oppløsningen agiteres i 15 timer ved 30°C. 0,592 g 1,3-dijodpropan tilsettes (2 mM, svarende til 4 mekv), og etter homogenisering holdes oppløsningen ved 30°C i 24 timer.

For omdannelse av rest-tetrabutylammoniumkarboksy-gruppene til natriumsalt, tilsettes det til den resulterende

oppløsning 2,5 g NaCl oppløst i 100 ml destillert H₂O, mens det avkjøles fra utsiden med et vann/is-bad.

500 ml aceton tilsettes, utfelningen fraskilles ved filtrering, vaskes 3 ganger med 100 ml aceton/H₂O i forholdet 5:1 og 3 ganger med 100 ml rent aceton, og vakuumtørres deretter.

3,99 g av forbindelsen som er angitt i overskriften, oppnås.

Etoksy-l-bestemmelse utføres i henhold til fremgangsmåten ifølge Cundiff et al og viser et innhold innhold på 4,42 vekt% som etanol (teoretisk: 4,57). Analyse av den totale mengde estergrupper utføres ved forsåpningsreaksjon med et overskudd av 0,1 N NaOH ved 50°C i 30 minutter. Overskuddet bestemmes ved titrering med 0,1 N HCl under anvendelse av fenolftalein som indikator. På denne måte er det mulig å bestemme et innhold av total mengde estergrupper på 1,96 mekv/g (teoretisk 1,99).

Eksempel 10 - Fremstilling av hyaluronsyre (HY) delvis forestret med etanol og delvis tverrbundet med 1,3-propandiol

6,21 g tetrabutylammoniumsalt av HY (10 mekv) solubiliseres i 248 ml DMSO ved 25°C under absolutt tørre betingelser, i nitrogenatmosfære og borte fra lys. 0,312 g etyljodid tilsettes (2 mM) og oppløsningen agiteres i 15 timer ved 30°C. 0,310 g 1,3-dijodpropan tilsettes (1 mM, svarende til 2 mekv), og etter homogenisering holdes oppløsningen ved 30°C i 24 timer.

For omdannelse av rest-tetrabutylammoniumkarboksy-gruppene til natriumsalt, tilsettes det til den resulterende oppløsning 2,5 g NaCl oppløst i 100 ml destillert H₂O, mens det avkjøles fra utsiden med et vann/is-bad.

500 ml aceton tilsettes, utfelningen fraskilles ved filtrering, vaskes 3 ganger med 100 ml aceton/H₂O i forholdet 5:1 og 3 ganger med 100 ml rent aceton, og vakuumtørres deretter.

4,02 g av forbindelsen som er angitt i overskriften,

oppnås.

Etoksyl-bestemmelse utføres i henhold til fremgangsmåten ifølge Cundiff et al og viser et innhold innhold på 2,3 vekt% som etanol (teoretisk: 2,28). Analyse av den totale mengde estergrupper utføres ved forsåpningsreaksjon med et overskudd av 0,1 N NaOH ved 50°C i 30 minutter. Overskuddet bestemmes ved titrering med 0,1 N HCl under anvendelse av fenolftalein som indikator. På denne måte er det mulig å bestemme et innhold av total mengde estergrupper på 0,97 mekv/g (teoretisk 0,99).

Eksempel 11 - Fremstilling av hyaluronsyre (HY) delvis forestret med etanol og delvis tverrbundet med 1,4-butandiol

6,21 g tetrabutylammoniums salt av HY (10 mekv) solubiliseres i 248 ml DMSO ved 25°C under absolutt tørre betingelser, i nitrogenatmosfære og borte fra lys. 0,624 g etyljodid tilsettes (4 mM) og oppløsningen agiteres i 15 timer ved 30°C. 0,310 g 1,4-dijodbutan tilsettes (1 mM, svarende til 2 mekv), og etter homogenisering holdes oppløsningen ved 30°C i 24 timer.

For omdannelse av rest-tetrabutylammoniumkarboksygruppene til natriumsalt, tilsettes det til den resulterende oppløsning 2,5 g NaCl oppløst i 100 ml destillert H₂O, mens det avkjøles fra utsiden med et vann/is-bad.

500 ml aceton tilsettes, utfelningen fraskilles ved filtrering, vaskes 3 ganger med 100 ml aceton/H₂O i forholdet 5:1 og 3 ganger med 100 ml rent aceton, og vakuumtørres deretter.

3,95 g av forbindelsen som er angitt i overskriften, oppnås.

Etoksyl-bestemmelse utføres i henhold til fremgangsmåten ifølge Cundiff et al og viser et innhold innhold på 2,25 vekt% som etanol (teoretisk: 2,28). Analyse av den totale mengde estergrupper utføres ved forsåpningsreaksjon med et overskudd av 0,1 N NaOH ved 50°C i 30 minutter. Overskuddet bestemmes ved titrering med 0,1 N HCl under anvendelse av

fenolftalein som indikator. På denne måte er det mulig å bestemme et innhold av total mengde estergrupper på 1,41 mekv/g (teoretisk 1,48).

Eksempel 12 - Fremstilling av hyaluronsyre (HY) delvis forestret med etanol og delvis tverrbundet med 1,4-butandiol

6,21 g tetrabutylammoniumsalt av HY (10 mekv) solubiliseres i 248 ml DMSO ved 25°C under absolutt tørre betingelser, i nitrogenatmosfære og borte fra lys. 0,936 g etyljodid tilsettes (6 mM) og oppløsningen agiteres i 15 timer ved 30°C. 0,310 g 1,4-dijodbutan tilsettes (1 mM, svarende til 2 mekv), og etter homogenisering holdes oppløsningen ved 30°C i 24 timer.

For omdannelse av rest-tetrabutylammoniumkarboksygruppene til natriumsalt, tilsettes det til den resulterende oppløsning 2,5 g NaCl oppløst i 100 ml destillert H₂O, mens det avkjøles fra utsiden med et vann/is-bad.

500 ml aceton tilsettes, utfelningen fraskilles ved filtrering, vaskes 3 ganger med 100 ml aceton/H₂O i forholdet 5:1 og 3 ganger med 100 ml rent aceton, og vakuumtørres deretter.

3,98 g av forbindelsen som er angitt i overskriften, oppnås.

Etoksyl-bestemmelse utføres i henhold til fremgangsmåten ifølge Cundiff et al og viser et innhold innhold på 6,69 vekt% som etanol (teoretisk: 6,81). Analyse av den totale mengde estergrupper utføres ved forsåpningsreaksjon med et overskudd av 0,1 N NaOH ved 50°C i 30 minutter. Overskuddet bestemmes ved titrering med 0,1 N HCl under anvendelse av fenolftalein som indikator. På denne måte er det mulig å bestemme et innhold av total mengde estergrupper på 1,91 mekv/g (teoretisk 1,97).

Eksempel 13 - Fremstilling av hyaluronsyre (HY) delvis forestret med etanol og delvis tverrbundet med 1,6-heksandiol

6,21 g tetrabutylammoniums salt av HY (10 mekv) solubiliseres i 248 ml DMSO ved 25°C under absolutt tørre betingelser, i nitrogenatmosfære og borte fra lys. 0,312 g etyljodid tilsettes (2 mM) og oppløsningen agiteres i 15 timer ved 30°C. 0,244 g 1,6-dibromheksan tilsettes (1 mM, svarende til 2 mekv), og etter homogenisering holdes oppløsningen ved 30°C i 24 timer.

For omdannelse av rest-tetrabutylammoniumkarboksy-gruppene til natriumsalt, tilsettes det til den resulterende oppløsning 2,5 g NaCl oppløst i 100 ml destillert H₂O, mens det avkjøles fra utsiden med et vann/is-bad.

500 ml aceton tilsettes, utfelningen fraskilles ved filtrering, vaskes 3 ganger med 100 ml aceton/H₂O i forholdet 5:1 og 3 ganger med 100 ml rent aceton, og vakuumtørres deretter.

4,05 g av forbindelsen som er angitt i overskriften, oppnås.

Etoksyl-bestemmelse utføres i henhold til fremgangsmåten ifølge Cundiff et al og viser et innhold innhold på 2,18 vekt% som etanol (teoretisk: 2,27). Analyse av den totale mengde estergrupper utføres ved forsåpningsreaksjon med et overskudd av 0,1 N NaOH ved 50°C i 30 minutter. Overskuddet bestemmes ved titrering med 0,1 N HCl under anvendelse av fenolftalein som indikator. På denne måte er det mulig å bestemme et innhold av total mengde estergrupper på 0,96 mekv/g (teoretisk 0,985).

Eksempel 14 - Fremstilling av hyaluronsyre (HY) delvis forestret med etanol og delvis tverrbundet med 1,6-heksandiol

6,21 g tetrabutylammoniums salt av HY (10 mekv) solubiliseres i 248 ml DMSO ved 25°C under absolutt tørre betingelser, i nitrogenatmosfære og borte fra lys. 0,624 g etyljodid tilsettes (4 mM) og oppløsningen agiteres i 15 timer ved 30°C. 0,244 g 1,6-dibromheksan tilsettes (1 mM, svarende til 2 mekv), og etter homogenisering holdes oppløsningen ved 30°C i 24 timer.

For omdannelse av rest-tetrabutylammoniumkarboksy-gruppene til natriumsalt, tilsettes det til den resulterende oppløsning 2,5 g NaCl oppløst i 100 ml destillert H₂O, mens det avkjøles fra utsiden med et vann/is-bad.

500 ml aceton tilsettes, utfelningen fraskilles ved filtrering, vaskes 3 ganger med 100 ml aceton/H₂O i forholdet 5:1 og 3 ganger med 100 ml rent aceton, og vakuumtørres deretter.

4,02 g av forbindelsen som er angitt i overskriften, oppnås.

Etoksyl-bestemmelse utføres i henhold til fremgangsmåten ifølge Cundiff et al og viser et innhold på 4,46 vekt% som etanol (teoretisk: 4,52). Analyse av den totale mengde estergrupper utføres ved forsåpningsreaksjon med et overskudd av 0,1 N NaOH ved 50°C i 30 minutter. Overskuddet bestemmes ved titrering med 0,1 N HCl under anvendelse av fenolftalein som indikator. På denne måte er det mulig å bestemme et innhold av total mengde estergrupper på 1,43 mekv/g (teoretisk 1,47).

Eksempel 15 - Fremstilling av hyaluronsyre (HY) delvis forestret med etanol og delvis tverrbundet med 1,6-heksandiol

6,21 g tetrabutylammoniumsalt av HY (10 mekv) solubiliseres i 248 ml DMSO ved 25°C under absolutt tørre betingelser, i nitrogenatmosfære og borte fra lys. 0,934 g etyljodid tilsettes (6 mM) og oppløsningen agiteres i 15 timer ved 30°C. 0,244 g 1,6-dibromheksan tilsettes (1 mM, svarende til 2 mekv), og etter homogenisering holdes oppløsningen ved 30°C i 24 timer.

For omdannelse av rest-tetrabutylammoniumkarboksy-gruppene til natriumsalt, tilsettes det til den resulterende oppløsning 2,5 g NaCl oppløst i 100 ml destillert H₂O, mens det avkjøles fra utsiden med et vann/is-bad.

500 ml aceton tilsettes, utfelningen fraskilles ved filtrering, vaskes 3 ganger med 100 ml aceton/H₂O i forholdet 5:1 og 3 ganger med 100 ml rent aceton, og vakuumtørres

deretter.

4,00 g av forbindelsen som er angitt i overskriften, oppnås.

Etoksyl-bestemmelse utføres i henhold til fremgangsmåten ifølge Cundiff et al og viser et innhold innhold på 6,68 vekt% som etanol (teoretisk: 6,76). Analyse av den totale mengde estergrupper utføres ved forsåpningsreaksjon med et overskudd av 0,1 N NaOH ved 50°C i 30 minutter. Overskuddet bestemmes ved titrering med 0,1 N HCl under anvendelse av fenolftalein som indikator. På denne måte er det mulig å bestemme et innhold av total mengde estergrupper på 1,91 mekv/g (teoretisk 1,96).

Eksempel 16 - Fremstilling av hyaluronsyre (HY) delvis forestret med etanol og delvis tverrbundet med 1,8-oktandiol

6,21 g tetrabutylammoniumsalt av HY (10 mekv) solubiliseres i 248 ml DMSO ved 25°C under absolutt tørre betingelser, i nitrogenatmosfære og borte fra lys. 0,078 g etyljodid tilsettes (0,5 mM) og oppløsningen agiteres i 15 timer ved 30°C. 0,068 g 1,8-dibromoktan tilsettes (0,25 mM, svarende til 0,5 mekv), og etter homogenisering holdes oppløsningen ved 30°C i 24 timer.

For omdannelse av rest-tetrabutylammoniumkarboksygruppene til natriumsalt, tilsettes det til den resulterende oppløsning 2,5 g NaCl oppløst i 100 ml destillert H₂O, mens det avkjøles fra utsiden med et vann/is-bad.

500 ml aceton tilsettes, utfelningen fraskilles ved filtrering, vaskes 3 ganger med 100 ml aceton/H₂O i forholdet 5:1 og 3 ganger med 100 ml rent aceton, og vakuumtørres deretter.

3,99 g av forbindelsen som er angitt i overskriften, oppnås.

Etoksyl-bestemmelse utføres i henhold til fremgangsmåten ifølge Cundiff et al og viser et innhold innhold på 0,54 vekt% som etanol (teoretisk: 0,571). Analyse av den totale mengde estergrupper utføres ved forsåpningsreaksjon med et

overskudd av 0,1 N NaOH ved 50°C i 30 minutter. Overskuddet bestemmes ved titrering med 0,1 N HCl under anvendelse av fenolftalein som indikator. På denne måte er det mulig å bestemme et innhold av total mengde estergrupper på 0,23 mekv/g (teoretisk 0,25).

Eksempel 17 - Fremstilling av hyaluronsyre (HY) delvis foretret med etanol og delvis tverrbundet med 1,8-oktandiol

6,21 g tetrabutylammoniumsalt av HY (10 mekv) solubiliseres i 248 ml DMSO ved 25°C under absolutt tørre betingelser, i nitrogenatmosfære og borte fra lys. 0,078 g etyljodid tilsettes (0,5 mM) og oppløsningen agiteres i 15 timer ved 30°C. 0,136 g 1,8-dibromoktan tilsettes (0,5 mM, svarende til 1 mekv), og etter homogenisering holdes oppløsningen ved 30°C i 24 timer.

For omdannelse av rest-tetrabutylammoniumkarboksygruppene til natriumsalt, tilsettes det til den resulterende oppløsning 2,5 g NaCl oppløst i 100 ml destillert H₂O, mens det avkjøles fra utsiden med et vann/is-bad.

500 ml aceton tilsettes, utfelningen fraskilles ved filtrering, vaskes 3 ganger med 100 ml aceton/H₂O i forholdet 5:1 og 3 ganger med 100 ml rent aceton, og vakuumtørres deretter.

3,97 g av forbindelsen som er angitt i overskriften, oppnås.

Etoksyl-bestemmelse utføres i henhold til fremgangsmåten ifølge Cundiff et al og viser et innhold innhold på 0,55 vekt% som etanol (teoretisk: 0,569). Analyse av den totale mengde estergrupper utføres ved forsåpningsreaksjon med et overskudd av 0,1 N NaOH ved 50°C i 30 minutter. Overskuddet bestemmes ved titrering med 0,1 N HCl under anvendelse av fenolftalein som indikator. På denne måte er det mulig å bestemme et innhold av total mengde estergrupper på 0,35 mekv/g (teoretisk 0,37).

Eksempel 18 - Fremstilling av hyaluronsyre (HY) delvis for-

estret med etanol og delvis tverrbundet med
1,8-oktandiol

6,21 g tetrabutylammoniumsalt av HY (10 mekv)
solubiliseres i 248 ml DMSO ved 25°C under absolutt tørre
betingelser, i nitrogenatmosfære og borte fra lys. 0,078 g
etyljodid tilsettes (0,5 mM) og oppløsningen agiteres i 15
timer ved 30°C. 0,272 g 1,8-dibromoktan tilsettes (1 mM,
svarende til 2 mekv), og etter homogenisering holdes
oppløsningen ved 30°C i 24 timer.

For omdannelse av rest-tetrabutylammoniumkarboksy-
gruppene til natriumsalt, tilsettes det til den resulterende
oppløsning 2,5 g NaCl oppløst i 100 ml destillert H₂O, mens
det avkjøles fra utsiden med et vann/is-bad.

500 ml aceton tilsettes, utfelningen fraskilles ved
filtrering, vaskes 3 ganger med 100 ml aceton/H₂O i forholdet
5:1 og 3 ganger med 100 ml rent aceton, og vakuumtørres
deretter.

4,05 g av forbindelsen som er angitt i overskriften,
oppnås.

Etoksyl-bestemmelse utføres i henhold til fremgangsmåten
ifølge Cundiff et al og viser et innhold innhold på 0,55
vekt% som etanol (teoretisk: 0,564). Analyse av den totale
mengde estergrupper utføres ved forsåpningsreaksjon med et
overskudd av 0,1 N NaOH ved 50°C i 30 minutter. Overskuddet
bestemmes ved titrering med 0,1 N HCl under anvendelse av
fenolftalein som indikator. På denne måte er det mulig å
bestemme et innhold av total mengde estergrupper på 0,60
mekv/g (teoretisk 0,61).

Eksempel 19 - Fremstilling av hyaluronsyre (HY) delvis for-
estret med etanol og delvis tverrbundet med
1,8-oktandiol

6,21 g tetrabutylammoniumsalt av HY (10 mekv)
solubiliseres i 248 ml DMSO ved 25°C under absolutt tørre
betingelser, i nitrogenatmosfære og borte fra lys. 0,156 g
etyljodid tilsettes (1 mM) og oppløsningen agiteres i 15
timer ved 30°C. 0,272 g 1,8-dibromoktan tilsettes (1 mM,

svarende til 2 mekv), og etter homogenisering holdes oppløsningen ved 30°C i 24 timer.

For omdannelse av rest-tetrabutylammoniumkarboksy-gruppene til natriumsalt, tilsettes det til den resulterende oppløsning 2,5 g NaCl oppløst i 100 ml destillert H₂O, mens det avkjøles fra utsiden med et vann/is-bad.

500 ml aceton tilsettes, utfelningen fraskilles ved filtrering, vaskes 3 ganger med 100 ml aceton/H₂O i forholdet 5:1 og 3 ganger med 100 ml rent aceton, og vakuumtørres deretter.

4,01 g av forbindelsen som er angitt i overskriften, oppnås.

Etoksyl-bestemmelse utføres i henhold til fremgangsmåten ifølge Cundiff et al og viser et innhold innhold på 1,09 vekt% som etanol (teoretisk: 1,13). Analyse av den totale mengde estergrupper utføres ved forsåpningsreaksjon med et overskudd av 0,1 N NaOH ved 50°C i 30 minutter. Overskuddet bestemmes ved titrering med 0,1 N HCl under anvendelse av fenolftalein som indikator. På denne måte er det mulig å bestemme et innhold av total mengde estergrupper på 0,70 mekv/g (teoretisk 0,73).

Eksempel 20 - Fremstilling av hyaluronsyre (HY) delvis forestret med etanol og delvis tverrbundet med 1,8-oktandiol

6,21 g tetrabutylammoniums salt av HY (10 mekv) solubiliseres i 248 ml DMSO ved 25°C under absolutt tørre betingelser, i nitrogenatmosfære og borte fra lys. 0,312 g etyljodid tilsettes (2 mM) og oppløsningen agiteres i 15 timer ved 30°C. 0,272 g 1,8-dibromoktan tilsettes (1 mM, svarende til 2 mekv), og etter homogenisering holdes oppløsningen ved 30°C i 24 timer.

For omdannelse av rest-tetrabutylammoniumkarboksy-gruppene til natriumsalt, tilsettes det til den resulterende oppløsning 2,5 g NaCl oppløst i 100 ml destillert H₂O, mens det avkjøles fra utsiden med et vann/is-bad.

500 ml aceton tilsettes, utfelningen fraskilles ved

filtrering, vaskes 3 ganger med 100 ml aceton/H₂O i forholdet 5:1 og 3 ganger med 100 ml rent aceton, og vakuumtørres deretter.

4,05 g av forbindelsen som er angitt i overskriften, oppnås.

Etoksyl-bestemmelse utføres i henhold til fremgangsmåten ifølge Cundiff et al og viser et innhold innhold på 2,05 vekt% som etanol (teoretisk: 2,25). Analyse av den totale mengde estergrupper utføres ved forsåpningsreaksjon med et overskudd av 0,1 N NaOH ved 50°C i 30 minutter. Overskuddet bestemmes ved titrering med 0,1 N HCl under anvendelse av fenolftalein som indikator. På denne måte er det mulig å bestemme et innhold av total mengde estergrupper på 0,96 mekv/g (teoretisk 0,98).

Eksempel 21 - Fremstilling av hyaluronsyre (HY) delvis forestret med etanol og delvis tverrbundet med 1,8-oktandiol

6,21 g tetrabutylammoniumsalt av HY (10 mekv) solubiliseres i 248 ml DMSO ved 25°C under absolutt tørre betingelser, i nitrogenatmosfære og borte fra lys. 0,624 g etyljodid tilsettes (4 mM) og oppløsningen agiteres i 15 timer ved 30°C. 0,272 g 1,8-dibromoktan tilsettes (1 mM, svarende til 2 mekv), og etter homogenisering holdes oppløsningen ved 30°C i 24 timer.

For omdannelse av rest-tetrabutylammoniumkarboksygruppene til natriumsalt, tilsettes det til den resulterende oppløsning 2,5 g NaCl oppløst i 100 ml destillert H₂O, mens det avkjøles fra utsiden med et vann/is-bad.

500 ml aceton tilsettes, utfelningen fraskilles ved filtrering, vaskes 3 ganger med 100 ml aceton/H₂O i forholdet 5:1 og 3 ganger med 100 ml rent aceton, og vakuumtørres deretter.

3,99 g av forbindelsen som er angitt i overskriften, oppnås.

Etoksyl-bestemmelse utføres i henhold til fremgangsmåten ifølge Cundiff et al og viser et innhold innhold på 4,39

vekt% som etanol (teoretisk: 4,49). Analyse av den totale mengde estergrupper utføres ved forsåpningsreaksjon med et overskudd av 0,1 N NaOH ved 50°C i 30 minutter. Overskuddet bestemmes ved titrering med 0,1 N HCl under anvendelse av fenolftalein som indikator. På denne måte er det mulig å bestemme et innhold av total mengde estergrupper på 1,43 mekv/g (teoretisk 1,46).

Eksempel 22 - Fremstilling av hyaluronsyre (HY) delvis foretret med etanol og delvis tverrbundet med 1,8-oktandiol

6,21 g tetrabutylammoniumsalt av HY (10 mekv) solubiliseres i 248 ml DMSO ved 25°C under absolutt tørre betingelser, i nitrogenatmosfære og borte fra lys. 0,934 g etyljodid tilsettes (6 mM) og oppløsningen agiteres i 15 timer ved 30°C. 0,272 g 1,8-dibromoktan tilsettes (1 mM, svarende til 2 mekv), og etter homogenisering holdes oppløsningen ved 30°C i 24 timer.

For omdannelse av rest-tetrabutylammoniumkarboksygruppene til natriumsalt, tilsettes det til den resulterende oppløsning 2,5 g NaCl oppløst i 100 ml destillert H₂O, mens det avkjøles fra utsiden med et vann/is-bad.

500 ml aceton tilsettes, utfelningen fraskilles ved filtrering, vaskes 3 ganger med 100 ml aceton/H₂O i forholdet 5:1 og 3 ganger med 100 ml rent aceton, og vakuumtørres deretter.

4,10 g av forbindelsen som er angitt i overskriften, oppnås.

Etoksyl-bestemmelse utføres i henhold til fremgangsmåten ifølge Cundiff et al og viser et innhold på 6,66 vekt% som etanol (teoretisk: 6,72). Analyse av den totale mengde estergrupper utføres ved forsåpningsreaksjon med et overskudd av 0,1 N NaOH ved 50°C i 30 minutter. Overskuddet bestemmes ved titrering med 0,1 N HCl under anvendelse av fenolftalein som indikator. På denne måte er det mulig å bestemme et innhold av total mengde estergrupper på 1,89 mekv/g (teoretisk 1,94).

Eksempel 23 - Fremstilling av hyaluronsyre (HY) delvis foretret med etanol og delvis tverrbundet med 1,8-oktandiol

6,21 g tetrabutylammoniumsalt av HY (10 mekv) solubiliseres i 248 ml DMSO ved 25°C under absolutt tørre betingelser, i nitrogenatmosfære og borte fra lys. 1,170 g etyljodid tilsettes (7,5 mM) og oppløsningen agiteres i 15 timer ved 30°C. 0,272 g 1,8-dibromoktan tilsettes (1 mM, svarende til 2 mekv), og etter homogenisering holdes oppløsningen ved 30°C i 24 timer.

For omdannelse av rest-tetrabutylammoniumkarboksygruppene til natriumsalt, tilsettes det til den resulterende oppløsning 2,5 g NaCl oppløst i 100 ml destillert H₂O, mens det avkjøles fra utsiden med et vann/is-bad.

500 ml aceton tilsettes, utfelningen fraskilles ved filtrering, vaskes 3 ganger med 100 ml aceton/H₂O i forholdet 5:1 og 3 ganger med 100 ml rent aceton, og vakuumtørres deretter.

4,03 g av forbindelsen som er angitt i overskriften, oppnås.

Etoksyl-bestemmelse utføres i henhold til fremgangsmåten ifølge Cundiff et al og viser et innhold innhold på 8,27 vekt% som etanol (teoretisk: 8,38). Analyse av den totale mengde estergrupper utføres ved forsåpningsreaksjon med et overskudd av 0,1 N NaOH ved 50°C i 30 minutter. Overskuddet bestemmes ved titrering med 0,1 N HCl under anvendelse av fenolftalein som indikator. På denne måte er det mulig å bestemme et innhold av total mengde estergrupper på 2,05 mekv/g (teoretisk 2,3).

Eksempel 24 - Fremstilling av hyaluronsyre (HY) delvis foretret med etanol og delvis tverrbundet med 1,8-oktandiol

6,21 g tetrabutylammoniumsalt av HY (10 mekv) solubiliseres i 248 ml DMSO ved 25°C under absolutt tørre betingelser, i nitrogenatmosfære og borte fra lys. 0,624 g etyljodid tilsettes (4 mM) og oppløsningen agiteres i 15

timer ved 30°C. 0,544 g 1,8-dibromoktan tilsettes (1 mM, svarende til 2 mekv), og etter homogenisering holdes oppløsningen ved 30°C i 24 timer.

For omdannelse av rest-tetrabutylammoniumkarboksy-gruppene til natriumsalt, tilsettes det til den resulterende oppløsning 2,5 g NaCl oppløst i 100 ml destillert H₂O, mens det avkjøles fra utsiden med et vann/is-bad.

500 ml aceton tilsettes, utfelningen fraskilles ved filtrering, vaskes 3 ganger med 100 ml aceton/H₂O i forholdet 5:1 og 3 ganger med 100 ml rent aceton, og vakuumtørres deretter.

4,15 g av forbindelsen som er angitt i overskriften, oppnås.

Etoksyl-bestemmelse utføres i henhold til fremgangsmåten ifølge Cundiff et al og viser et innhold innhold på 4,36 vekt% som etanol (teoretisk: 4,42). Analyse av den totale mengde estergrupper utføres ved forsåpningsreaksjon med et overskudd av 0,1 N NaOH ved 50°C i 30 minutter. Overskuddet bestemmes ved titrering med 0,1 N HCl under anvendelse av fenolftalein som indikator. På denne måte er det mulig å bestemme et innhold av total mengde estergrupper på 1,90 mekv/g (teoretisk 1,92).

Eksempel 25 - Fremstilling av hyaluronsyre (HY) delvis forestret med etanol og delvis tverrbundet med 1,10-dekandiol

6,21 g tetrabutylammoniumsalt av HY (10 mekv) solubiliseres i 248 ml DMSO ved 25°C under absolutt tørre betingelser, i nitrogenatmosfære og borte fra lys. 0,312 g etyljodid tilsettes (2 mM) og oppløsningen agiteres i 15 timer ved 30°C. 0,300 g 1,10-dibromdekan tilsettes (1 mM, svarende til 2 mekv), og etter homogenisering holdes oppløsningen ved 30°C i 24 timer.

For omdannelse av rest-tetrabutylammoniumkarboksy-gruppene til natriumsalt, tilsettes det til den resulterende oppløsning 2,5 g NaCl oppløst i 100 ml destillert H₂O, mens det avkjøles fra utsiden med et vann/is-bad.

500 ml aceton tilsettes, utfelningen fraskilles ved filtrering, vaskes 3 ganger med 100 ml aceton/H₂O i forholdet 5:1 og 3 ganger med 100 ml rent aceton, og vakuumtørres deretter.

4,12 g av forbindelsen som er angitt i overskriften, oppnås.

Etoksyl-bestemmelse utføres i henhold til fremgangsmåten ifølge Cundiff et al og viser et innhold innhold på 2,12 vekt% som etanol (teoretisk: 2,24). Analyse av den totale mengde estergrupper utføres ved forsåpningsreaksjon med et overskudd av 0,1 N NaOH ved 50°C i 30 minutter. Overskuddet bestemmes ved titrering med 0,1 N HCl under anvendelse av fenolftalein som indikator. På denne måte er det mulig å bestemme et innhold av total mengde estergrupper på 0,94 mekv/g (teoretisk 0,97).

Eksempel 26 - Fremstilling av hyaluronsyre (HY) delvis forestret med etanol og delvis tverrbundet med 1,10-dekandiol

6,21 g tetrabutylammoniumsalt av HY (10 mekv) solubiliseres i 248 ml DMSO ved 25°C under absolutt tørre betingelser, i nitrogenatmosfære og borte fra lys. 0,624 g etyljodid tilsettes (4 mM), og oppløsningen agiteres i 15 timer ved 30°C. 0,300 g 1,10-dibromdekan tilsettes (1 mM, svarende til 2 mekv), og etter homogenisering holdes oppløsningen ved 30°C i 24 timer.

For omdannelse av rest-tetrabutylammoniumkarboksylgruppene til natriumsalt, tilsettes det til den resulterende oppløsning 2,5 g NaCl oppløst i 100 ml destillert H₂O, mens det avkjøles fra utsiden med et vann/is-bad.

500 ml aceton tilsettes, utfelningen fraskilles ved filtrering, vaskes 3 ganger med 100 ml aceton/H₂O i forholdet 5:1 og 3 ganger med 100 ml rent aceton, og vakuumtørres deretter.

4,10 g av forbindelsen som er angitt i overskriften, oppnås.

Etoksyl-bestemmelse utføres i henhold til fremgangsmåten

ifølge Cundiff et al og viser et innhold innhold på 4,36 vekt% som etanol (teoretisk: 4,46). Analyse av den totale mengde estergrupper utføres ved forsåpningsreaksjon med et overskudd av 0,1 N NaOH ved 50°C i 30 minutter. Overskuddet bestemmes ved titrering med 0,1 N HCl under anvendelse av fenolftalein som indikator. På denne måte er det mulig å bestemme et innhold av total mengde estergrupper på 1,43 mekv/g (teoretisk 1,45).

Eksempel 27 - Fremstilling av hyaluronsyre (HY) delvis forestret med etanol og delvis tverrbundet med 1,10-dekandiol

6,21 g tetrabutylammoniumsalt av HY (10 mekv) solubiliseres i 248 ml DMSO ved 25°C under absolutt tørre betingelser, i nitrogenatmosfære og borte fra lys. 0,934 g etyljodid tilsettes (6 mM) og oppløsningen agiteres i 15 timer ved 30°C. 0,300 g 1,10-dibromdekan tilsettes (1 mM, svarende til 2 mekv), og etter homogenisering holdes oppløsningen ved 30°C i 24 timer.

For omdannelse av rest-tetrabutylammoniumkarboksygruppene til natriumsalt, tilsettes det til den resulterende oppløsning 2,5 g NaCl oppløst i 100 ml destillert H₂O, mens det avkjøles fra utsiden med et vann/is-bad.

500 ml aceton tilsettes, utfelningen fraskilles ved filtrering, vaskes 3 ganger med 100 ml aceton/H₂O i forholdet 5:1 og 3 ganger med 100 ml rent aceton, og vakuumtørres deretter.

4,12 g av forbindelsen som er angitt i overskriften, oppnås.

Etoksyl-bestemmelse utføres i henhold til fremgangsmåten ifølge Cundiff et al og viser et innhold innhold på 6,5 vekt% som etanol (teoretisk: 6,67). Analyse av den totale mengde estergrupper utføres ved forsåpningsreaksjon med et overskudd av 0,1 N NaOH ved 50°C i 30 minutter. Overskuddet bestemmes ved titrering med 0,1 N HCl under anvendelse av fenolftalein som indikator. På denne måte er det mulig å bestemme et innhold av total mengde estergrupper på 1,87 mekv/g

(teoretisk 1,93).

Eksempel 28 - Fremstilling av hyaluronsyre (HY) delvis foretret med etanol og delvis tverrbundet med α, α' -paraxylendiol

6,21 g tetrabutylammoniumsalt av HY (10 mekv) solubiliseres i 248 ml DMSO ved 25°C under absolutt tørre betingelser, i nitrogenatmosfære og borte fra lys. 0,624 g etyljodid tilsettes (4 mM) og oppløsningen agiteres i 15 timer ved 30°C. 0,264 g α, α' -dibrom-p-xylen tilsettes (1 mM, svarende til 2 mekv), og etter homogenisering holdes oppløsningen ved 30°C i 24 timer.

For omdannelse av rest-tetrabutylammoniumkarboksygruppene til natriumsalt, tilsettes det til den resulterende oppløsning 2,5 g NaCl oppløst i 100 ml destillert H₂O, mens det avkjøles fra utsiden med et vann/is-bad.

500 ml aceton tilsettes, utfelningen fraskilles ved filtrering, vaskes 3 ganger med 100 ml aceton/H₂O i forholdet 5:1 og 3 ganger med 100 ml rent aceton, og vakuumtørres deretter.

4,04 g av forbindelsen som er angitt i overskriften, oppnås.

Etoksyl-bestemmelse utføres i henhold til fremgangsmåten ifølge Cundiff et al og viser et innhold innhold på 4,4 vekt% som etanol (teoretisk: 4,5). Analyse av den totale mengde estergrupper utføres ved forsåpningsreaksjon med et overskudd av 0,1 N NaOH ved 50°C i 30 minutter. Overskuddet bestemmes ved titrering med 0,1 N HCl under anvendelse av fenolftalein som indikator. På denne måte er det mulig å bestemme et innhold av total mengde estergrupper på 1,36 mekv/g (teoretisk 1,47).

Eksempel 29 - Fremstilling av hyaluronsyre (HY) delvis foretret med benzylalkohol og delvis tverrbundet med 1,8-oktandiol

6,21 g tetrabutylammoniumsalt av HY (10 mekv) solubiliseres i 248 ml DMSO ved 25°C under absolutt tørre

betingelser, i nitrogenatmosfære og borte fra lys. 0,342 g benzylbromid tilsettes (2 mM) og oppløsningen agiteres i 15 timer ved 30°C. 0,272 g dibromoktan tilsettes (1 mM, svarende til 2 mekv), og etter homogenisering holdes oppløsningen ved 30°C i 24 timer.

For omdannelse av rest-tetrabutylammoniumkarboksygruppene til natriumsalt, tilsettes det til den resulterende oppløsning 2,5 g NaCl oppløst i 100 ml destillert H₂O, mens det avkjøles fra utsiden med et vann/is-bad.

500 ml aceton tilsettes, utfelningen fraskilles ved filtrering, vaskes 3 ganger med 100 ml aceton/H₂O i forholdet 5:1 og 3 ganger med 100 ml rent aceton, og vakuumtørres deretter.

4,15 g av forbindelsen som er angitt i overskriften, oppnås.

Analyse av den totale mengde estergrupper utføres ved forsåpningsreaksjon med et overskudd av 0,1 N NaOH ved 50°C i 30 minutter. Overskuddet bestemmes ved titrering med 0,1 N HCl under anvendelse av fenolftalein som indikator. På denne måte er det mulig å bestemme et innhold av total mengde estergrupper på 0,93 mekv/g (teoretisk 0,95).

Eksempel 30 - Fremstilling av hyaluronsyre (HY) delvis forestret med benzylalkohol og delvis tverrbundet med α,α' -paraxylendiol

6,21 g tetrabutylammoniumsalt av HY (10 mekv) solubiliseres i 248 ml DMSO ved 25°C under absolutt tørre betingelser, i nitrogenatmosfære og borte fra lys. 0,342 g benzylbromid tilsettes (2 mM) og oppløsningen agiteres i 15 timer ved 30°C. 0,264 g α,α' -dibrom-p-xylen tilsettes (1 mM, svarende til 2 mekv), og etter homogenisering holdes oppløsningen ved 30°C i 24 timer.

For omdannelse av rest-tetrabutylammoniumkarboksygruppene til natriumsalt, tilsettes det til den resulterende oppløsning 2,5 g NaCl oppløst i 100 ml destillert H₂O, mens det avkjøles fra utsiden med et vann/is-bad.

500 ml aceton tilsettes, utfelningen fraskilles ved

filtrering, vaskes 3 ganger med 100 ml aceton/H₂O i forholdet 5:1 og 3 ganger med 100 ml rent aceton, og vakuumtørres deretter.

4,11 g av forbindelsen som er angitt i overskriften, oppnås.

Analyse av den totale mengde estergrupper utføres ved forsåpningsreaksjon med et overskudd av 0,1 N NaOH ved 50°C i 30 minutter. Overskuddet bestemmes ved titrering med 0,1 N HCl under anvendelse av fenolftalein som indikator. På denne måte er det mulig å bestemme et innhold av total mengde estergrupper på 0,92 mekv/g (teoretisk 0,95).

Eksempel 31 - Fremstilling av hyaluronsyre (HY) delvis tverrbundet med 1,3-propandiol

6,21 g tetrabutylammoniumsalt av HY (10 mekv) solubiliseres i 248 ml DMSO ved 25°C under absolutt tørre betingelser, i nitrogenatmosfære og borte fra lys. 0,296 g 1,3-dijodpropan tilsettes (1 mM, svarende til 2 mekv), og etter homogenisering holdes oppløsningen ved 30°C i 24 timer.

For omdannelse av rest-tetrabutylammoniumkarboksy-gruppene til natriumsalt, tilsettes det til den resulterende oppløsning 2,5 g NaCl oppløst i 100 ml destillert H₂O, mens det avkjøles fra utsiden med et vann/is-bad.

500 ml aceton tilsettes, utfelningen fraskilles ved filtrering, vaskes 3 ganger med 100 ml aceton/H₂O i forholdet 5:1 og 3 ganger med 100 ml rent aceton, og vakuumtørres deretter.

3,98 g av forbindelsen som er angitt i overskriften, oppnås.

Analyse av den totale mengde estergrupper utføres ved forsåpningsreaksjon med et overskudd av 0,1 N NaOH ved 50°C i 30 minutter. Overskuddet bestemmes ved titrering med 0,1 N HCl under anvendelse av fenolftalein som indikator. På denne måte er det mulig å bestemme et innhold av total mengde estergrupper på 0,47 mekv/g (teoretisk 0,499).

Eksempel 32 - Fremstilling av hyaluronsyre (HY) delvis

tverrbundet med 1,3-propandiol

6,21 g tetrabutylammoniumsalt av HY (10 mekv) solubiliseres i 248 ml DMSO ved 25°C under absolutt tørre betingelser, i nitrogenatmosfære og borte fra lys. 0,740 g 1,3-dijodpropan tilsettes (2,5 mM, svarende til 5 mekv), og etter homogenisering holdes oppløsningen ved 30°C i 24 timer.

For omdannelse av rest-tetrabutylammoniumkarboksygruppene til natriumsalt, tilsettes det til den resulterende oppløsning 2,5 g NaCl oppløst i 100 ml destillert H₂O, mens det avkjøles fra utsiden med et vann/is-bad.

500 ml aceton tilsettes, utfelningen fraskilles ved filtrering, vaskes 3 ganger med 100 ml aceton/H₂O i forholdet 5:1 og 3 ganger med 100 ml rent aceton, og vakuumtørres deretter.

3,89 g av forbindelsen som er angitt i overskriften, oppnås.

Analyse av den totale mengde estergrupper utføres ved forsåpningsreaksjon med et overskudd av 0,1 N NaOH ved 50°C i 30 minutter. Overskuddet bestemmes ved titrering med 0,1 N HCl under anvendelse av fenolftalein som indikator. På denne måte er det mulig å bestemme et innhold av total mengde estergrupper på 1,21 mekv/g (teoretisk 1,25).

Eksempel 33 - Fremstilling av hyaluronsyre (HY) delvis tverrbundet med 1,3-propandiol

6,21 g tetrabutylammoniumsalt av HY (10 mekv) solubiliseres i 248 ml DMSO ved 25°C under strengt fuktighetsfrie betingelser, i nitrogenatmosfære og borte fra lys. 1,184 g 1,3-dijodpropan tilsettes (4 mM, svarende til 8 mekv), og etter homogenisering holdes oppløsningen ved 30°C i 24 timer.

For omdannelse av rest-tetrabutylammoniumkarboksygruppene til natriumsalt, tilsettes det til den resulterende oppløsning 2,5 g NaCl oppløst i 100 ml destillert H₂O, mens det avkjøles fra utsiden med et vann/is-bad.

500 ml aceton tilsettes, utfelningen fraskilles ved filtrering, vaskes 3 ganger med 100 ml aceton/H₂O i forholdet

5:1 og 3 ganger med 100 ml rent aceton, og vakuumtørres deretter.

3,87 g av forbindelsen som er angitt i overskriften, oppnås.

Analyse av den totale mengde estergrupper utføres ved forsåpningsreaksjon med et overskudd av 0,1 N NaOH ved 50°C i 30 minutter. Overskuddet bestemmes ved titrering med 0,1 N HCl under anvendelse av fenolftalein som indikator. På denne måte er det mulig å bestemme et innhold av total mengde estergrupper på 1,97 mekv/g (teoretisk 2,00).

Eksempel 34 - Fremstilling av hyaluronsyre (HY) delvis tverrbundet med 1,4-butandiol

6,21 g tetrabutylammoniumsalt av HY (10 mekv) solubiliseres i 248 ml DMSO ved 25°C under absolutt tørre betingelser, i nitrogenatmosfære og borte fra lys. 0,310 g 1,4-dijodbutan tilsettes (1 mM, svarende til 2 mekv), og etter homogenisering holdes oppløsningen ved 30°C i 24 timer.

For omdannelse av rest-tetrabutylammoniumkarboksygruppene til natriumsalt, tilsettes det til den resulterende oppløsning 2,5 g NaCl oppløst i 100 ml destillert H₂O, mens det avkjøles fra utsiden med et vann/is-bad.

500 ml aceton tilsettes, utfelningen fraskilles ved filtrering, vaskes 3 ganger med 100 ml aceton/H₂O i forholdet 5:1 og 3 ganger med 100 ml rent aceton, og vakuumtørres deretter.

4,00 g av forbindelsen som er angitt i overskriften, oppnås.

Analyse av den totale mengde estergrupper utføres ved forsåpningsreaksjon med et overskudd av 0,1 N NaOH ved 50°C i 30 minutter. Overskuddet bestemmes ved titrering med 0,1 N HCl under anvendelse av fenolftalein som indikator. På denne måte er det mulig å bestemme et innhold av total mengde estergrupper på 0,492 mekv/g (teoretisk 0,497).

Eksempel 35 - Fremstilling av hyaluronsyre (HY) delvis tverrbundet med 1,6-heksandiol

6,21 g tetrabutylammoniumsalt av HY (10 mekv) solubiliseres i 248 ml DMSO ved 25°C under absolutt tørre betingelser, i nitrogenatmosfære og borte fra lys. 0,370 g tetrabutylammoniumjodid tilsettes (1 mM) og oppløsningen agiteres i 1 time ved 20°C. 0,244 g 1,6-dibromheksan tilsettes (1 mM, svarende til 2 mekv), og etter homogenisering holdes oppløsningen ved 30°C i 24 timer.

For omdannelse av rest-tetrabutylammoniumkarboksy-gruppene til natriumsalt, tilsettes det til den resulterende oppløsning 2,5 g NaCl oppløst i 100 ml destillert H₂O, mens det avkjøles fra utsiden med et vann/is-bad.

500 ml aceton tilsettes, utfelningen fraskilles ved filtrering, vaskes 3 ganger med 100 ml aceton/H₂O i forholdet 5:1 og 3 ganger med 100 ml rent aceton, og vakuumtørres deretter.

4,01 g av forbindelsen som er angitt i overskriften, oppnås.

Analyse av den totale mengde estergrupper utføres ved forsåpningsreaksjon med et overskudd av 0,1 N NaOH ved 50°C i 30 minutter. Overskuddet bestemmes ved titrering med 0,1 N HCl under anvendelse av fenolftalein som indikator. På denne måte er det mulig å bestemme et innhold av total mengde estergrupper på 0,486 mekv/g (teoretisk 0,494).

Eksempel 36 - Fremstilling av hyaluronsyre (HY) delvis tverrbundet med 1,8-oktandiol

6,21 g tetrabutylammoniumsalt av HY (10 mekv) solubiliseres i 248 ml DMSO ved 25°C under absolutt tørre betingelser, i nitrogenatmosfære og borte fra lys. 0,370 g tetrabutylammoniumjodid tilsettes (1 mM) og oppløsningen agiteres i 1 time ved 20°C. 0,272 g 1,8-dibromoktan tilsettes (1 mM, svarende til 2 mekv), og etter homogenisering holdes oppløsningen ved 30°C i 24 timer.

For omdannelse av rest-tetrabutylammoniumkarboksy-gruppene til natriumsalt, tilsettes det til den resulterende oppløsning 2,5 g NaCl oppløst i 100 ml destillert H₂O, mens det avkjøles fra utsiden med et vann/is-bad.

500 ml aceton tilsettes, utfelningen fraskilles ved filtrering, vaskes 3 ganger med 100 ml aceton/H₂O i forholdet 5:1 og 3 ganger med 100 ml rent aceton, og vakuumtørres deretter.

4,02 g av forbindelsen som er angitt i overskriften, oppnås.

Analyse av den totale mengde estergrupper utføres ved forsåpningsreaksjon med et overskudd av 0,1 N NaOH ved 50°C i 30 minutter. Overskuddet bestemmes ved titrering med 0,1 N HCl under anvendelse av fenolftalein som indikator. På denne måte er det mulig å bestemme et innhold av total mengde estergrupper på 0,478 mekv/g (teoretisk 0,490).

Eksempel 37 - Fremstilling av hyaluronsyre (HY) delvis
tverrbundet med 1,10-dekandiol

6,21 g tetrabutylammoniumsalt av HY (10 mekv) solubiliseres i 248 ml DMSO ved 25°C under absolutt tørre betingelser, i nitrogenatmosfære og borte fra lys. 0,369 g jodid tilsettes (1 mM) og oppløsningen agiteres i 1 time ved 20°C. 0,300 g 1,10-dibromdekan tilsettes (1 mM, svarende til 2 mekv), og etter homogenisering holdes oppløsningen ved 30°C i 24 timer.

For omdannelse av rest-tetrabutylammoniumkarboksygruppene til natriumsalt, tilsettes det til den resulterende oppløsning 2,5 g NaCl oppløst i 100 ml destillert H₂O, mens det avkjøles fra utsiden med et vann/is-bad.

500 ml aceton tilsettes, utfelningen fraskilles ved filtrering, vaskes 3 ganger med 100 ml aceton/H₂O i forholdet 5:1 og 3 ganger med 100 ml rent aceton, og vakuumtørres deretter.

3,99 g av forbindelsen som er angitt i overskriften, oppnås.

Analyse av den totale mengde estergrupper utføres ved forsåpningsreaksjon med et overskudd av 0,1 N NaOH ved 50°C i 30 minutter. Overskuddet bestemmes ved titrering med 0,1 N HCl under anvendelse av fenolftalein som indikator. På denne måte er det mulig å bestemme et innhold av total mengde

estergrupper på 0,476 mekv/g (teoretisk 0,487).

Eksempel 37A - Fremstilling av (den partielle og blandede) oktandiol- og kortisonester av hyaluronsyre (HY)

- 40% av karboksylsyregruppene forestret med oktandiol - 20% av karboksylsyregruppene forestret med kortison (C_{21}) - 40% av karboksylsyregruppene dannet til salt (Na)

6,2 g HY-tetrabutylammoniumsalt med en molekylvekt på 125.000 svarende til 10 mekv av en monomer enhet solubiliseres i 310 ml dimetylsulfoksyd ved 25°C, 1,09 g (4 mekv) 1,8-dibromoktan tilsettes og oppløsningen holdes i 24 timer ved 30°C. 0,85 g (2 mekv) 21-brom-4-pregnen-17 α -1-3,11,20-trion tilsettes og oppløsningen holdes i 24 timer ved 30°.

Deretter tilsettes en oppløsning som inneholder 100 ml vann og 5 g natriumklorid, og den resulterende blanding helles langsomt i 2.000 ml aceton under stadig agitering. Det dannes en utfelning som filtreres og vaskes tre ganger med 100 ml aceton/vann 5:1 og tre ganger med 100 ml aceton og vakuumtørres til slutt i åtte timer ved 30°C.

4,5 g av forbindelsen som er angitt i overskriften, oppnås.

Kvantitativ bestemmelse av kortison, etter mild alkalisk hydrolyse med hydroalkoholisk oppløsning av Na_2CO_3 og ekstrahering med kloroform utføres i henhold til Britisk Pharmacopea, 1980, s. 224.

TABELL 1

PROSENTVIS SAMMENSETNING AV DE FORSKJELLIGE
Tverrbundne PRODUKTER

EKSEMPLER NR.	ANTALL FOREST- REDE KARBOKSYL- SYREGRUPPER PR. 100 MED ...	ANTALL TVERR- BUNDNE KARBOKSYL- SYREGRUPPER PR. 100 MED ...	ANTALL KARBOK- SYLSYREGRUPPER DANNET TIL SALT MED NATRIUM PR. 100
1	5 / CH ₃ -CH ₂ -	5 / -(CH ₂) ₃ -	90
2	5 / CH ₃ -CH ₂ -	10 / -(CH ₂) ₃ -	85
3	5 / CH ₃ -CH ₂ -	20 / -(CH ₂) ₃ -	75
4	10 / CH ₃ -CH ₂ -	20 / -(CH ₂) ₃ -	70
5	20 / CH ₃ -CH ₂ -	20 / -(CH ₂) ₃ -	60
6	40 / CH ₃ -CH ₂ -	20 / -(CH ₂) ₃ -	40
7	60 / CH ₃ -CH ₂ -	20 / -(CH ₂) ₃ -	20
8	75 / CH ₃ -CH ₂ -	20 / -(CH ₂) ₃ -	5
9	40 / CH ₃ -CH ₂ -	40 / -(CH ₂) ₃ -	20
10	20 / CH ₃ -CH ₂ -	20 / -(CH ₂) ₄ -	60
11	40 / CH ₃ -CH ₂ -	20 / -(CH ₂) ₄ -	40
12	60 / CH ₃ -CH ₂ -	20 / -(CH ₂) ₄ -	20
13	20 / CH ₃ -CH ₂ -	20 / -(CH ₂) ₆ -	60
14	40 / CH ₃ -CH ₂ -	20 / -(CH ₂) ₆ -	40
15	60 / CH ₃ -CH ₂ -	20 / -(CH ₂) ₆ -	20
16	5 / CH ₃ -CH ₂ -	5 / -(CH ₂) ₈ -	90
17	5 / CH ₃ -CH ₂ -	10 / -(CH ₂) ₈ -	85
18	5 / CH ₃ -CH ₂ -	20 / -(CH ₂) ₈ -	75
19	10 / CH ₃ -CH ₂ -	20 / -(CH ₂) ₈ -	70
20	20 / CH ₃ -CH ₂ -	20 / -(CH ₂) ₈ -	60
21	40 / CH ₃ -CH ₂ -	20 / -(CH ₂) ₈ -	40
22	60 / CH ₃ -CH ₂ -	20 / -(CH ₂) ₈ -	20
23	75 / CH ₃ -CH ₂ -	20 / -(CH ₂) ₈ -	5
24	40 / CH ₃ -CH ₂ -	40 / -(CH ₂) ₈ -	20
25	20 / CH ₃ -CH ₂ -	20 / -(CH ₂) ₁₀ -	60
26	40 / CH ₃ -CH ₂ -	20 / -(CH ₂) ₁₀ -	40
27	60 / CH ₃ -CH ₂ -	20 / -(CH ₂) ₁₀ -	20
28	40 / CH ₃ -CH ₂ -	20 / -(CH ₂ -Ph-CH ₂)-	40
29	20 / Ph-CH ₂ -	20 / -(CH ₂) ₈ -	60
30	20 / Ph-CH ₂ -	20 / -(CH ₂ -Ph-CH ₂)-	60
31	-	20 / -(CH ₂) ₃ -	80
32	-	50 / -(CH ₂) ₃ -	50
33	-	80 / -(CH ₂) ₃ -	20
34	-	20 / -(CH ₂) ₄ -	80
35	-	20 / -(CH ₂) ₆ -	80
36	-	20 / -(CH ₂) ₈ -	80
37	-	20 / -(CH ₂) ₁₀ -	80

Eksempel 38 - Fremgangsmåte ved hvilken en blanding av Hyalastin- og Hyalektin-fraksjoner, uten noen inflammatorisk aktivitet, kan oppnås

Frisk eller frosset hanekam (3.000 g) finhakkes i en hakke-maskin og homogeniseres deretter grundig i en mekanisk homogeniseringsinnretning. Den således oppnådde pasta anbringes i en rustfri stålbeholder av typen AISI 316 eller i glass og behandles med 10 volumdeler vannfritt aceton. Det hele agiteres i 6 timer ved en hastighet på 50 opm (omdreining pr. minutt). Det får stå for separasjon i 12 timer, og deretter fjernes acetonet ved hjelp av hevert. Acetonekstraksjonen gjentas inntil det fjernede aceton når den rette fuktighetsgrad (Karl-Fischer-metoden). Det hele sentrifugeres så og vakuumtørres ved en egnet temperatur i 5-8 timer. Ca. 500-600 g tørr, pulverisert hanekam fås på denne måte.

300 g tørt pulver underkastes enzymatisk digererings med papain (0,2 g) i vandig medium bufret med fosfatbuffer i nærvær av en passende mengde cysteinhydroklorid. Det agiteres i 24 timer ved 60 opm ved konstant temperatur på 60-65°C. Det hele avkjøles deretter til 25°C og "Celite" (60 g) tilsettes, idet agiteringen opprettholdes i nok en time. Den oppnådde blanding filtreres inntil det fås en klar væske. Den klare væske underkastes molekyl-ultrafiltrering på membraner med en molekyl-utelukkelsesgrense på 30.000 under tilbakeholdelse av molekyler med en molekylvekt på over 30.000 på membranen.

5-6 opprinnelige volumer ultrafiltreres, idet det kontinuerlig tilsettes destillert vann til det produkt som ultrafiltreres. Tilsetningen av vann suspenderes og ultrafiltreringen fortsettes inntil volumet er redusert til 1/3 av det opprinnelige. Restvæsken bringes til 0,1 M ved tilsetning av natriumklorid, og temperaturen bringes til 50°C. Under agitering ved 60 opm tilsettes 45 g cetylpyridiniumklorid. Det agiteres i 60 minutter og deretter tilsettes 50 g "Celite". Temperaturen bringes under agitering til 25°C, og det bunnfall som dannes ved sentrifugering, oppsamles. Det oppnådde bunnfall suspenderes i en 0,01 M oppløsning i natriumklorid (5 liter) inneholdende 0,5% cetylpyridinium-

klorid. Det agiteres i 60 minutter ved 50°C, og temperaturen bringes deretter til 25°C og bunnfallet sentrifugeres.

Vaskingen gjentas 3 ganger, og til slutt oppsamles bunnfallet i en resipient som inneholder 3 liter av en 0,05 M oppløsning av natriumklorid inneholdende 0,5% cetylpyridiniumklorid.

Det røres ved 60 opm i 60 minutter, og temperaturen holdes konstant ved 25°C i to timer. Supernatanten fjernes ved sentrifugering. Fremgangsmåten gjentas flere ganger med oppløsninger av 0,1 M natriumklorid inneholdende 0,05% cetylpyridiniumklorid. Blandingen sentrifugeres og supernatanten kastes. Bunnfallet dispergeres i en oppløsning av 0,30 M natriumklorid inneholdende 0,5% cetylpyridiniumklorid (3 liter). Blandingen agiteres, og både bunnfallet og den klare væske oppsamles. Ekstraksjonen av bunnfallet gjentas 3 ganger til, idet det hver gang anvendes 0,5 liter av den samme vandige oppløsning.

Til slutt fjernes rest-bunnfallet, og de klare væsker oppsamles i én beholder. Temperaturen i væsken bringes til 50°C mens agitering opprettholdes. Væsken bringes deretter til 0,23 M med natriumklorid. 1 g cetylpyridiniumklorid tilsettes, og agiteringen opprettholdes i 12 timer.

Blandingen avkjøles til 25°C og filtreres deretter først på "Celite" og deretter gjennom et filter. Den underkastes deretter igjen molekyl-ultrafiltrering på membran med en molekyl-utelukkelsesgrense på 30.000, idet tre begynnelsesvolumer med tilsetning av en 0,33 M natriumkloridoppløsning ultrafiltreres. Tilsetningen av natriumkloridoppløsning suspenderes, og volumet reduseres til 1/4 av begynnelsesvolumet. Oppløsningen som er konsentrert på denne måte, utfelles under agitering (60 rpm) ved 25°C med 3 volumdeler etanol (95%). Bunnfallet oppsamles ved sentrifugering og supernatanten kastes. Bunnfallet oppløses i 1 liter 0,1 M natriumkloridoppløsning, og utfellingen gjentas med 3 volumdeler 95% etanol. Bunnfallet oppsamles og vaskes først med 75% etanol 3 ganger, deretter med absolutt etanol (3 ganger) og til slutt med absolutt aceton (3 ganger).

Det således oppnådde produkt (Hyalastin- + Hyalektin-

fraksjonene) har en gjennomsnittlig molekylvekt på 250.000-350.000.

Utbyttet av HY er 0,6% av opprinnelig friskt vev.

Eksempel 39 - Fremgangsmåte for oppnåelse av
Hyalastinfraksjonen fra blandingen oppnådd
ved fremgangsmåten beskrevet i Eksempel 38

Den blanding som oppnås ved fremgangsmåten beskrevet i Eksempel 38, oppløses i ikke-pyrogent, destillert vann i en mengde på 10 mg produkt pr. 1 ml vann. Den oppnådde oppløsning underkastes molekylfiltrering gjennom filtermembraner med en molekyl-utelukkelsesgrense på 200.000, idet det anvendes en konsentreringsteknikk uten tilsetning av vann på toppen av membranen. Under ultrafiltreringsprosessen gjennom membraner med en molekyl-utelukkelsesgrense på 200.000 kan molekylene med en molekylvekt på over 200.000 ikke gå igjennom, mens de mindre molekyler passerer gjennom membranen sammen med vannet. Under filtreringsprosessen tilsettes det ikke noe vann på toppen av membranen, slik at volumet minker, og følgelig øker konsentrasjonen av molekyler med en molekylvekt på over 200.000. Ultrafiltreringen fortsettes inntil volumet på toppen av membranen er redusert til 10% av begynnelsesvolumet. To volumdeler ikke-pyrogent destillert vann tilsettes, og det ultrafiltreres igjen inntil volumet er redusert til 1/3 av det opprinnelige. Operasjonen gjentas to ganger til. Oppløsningen som har passert gjennom membranen, bringes til 0,1 M med natriumklorid og utfelles deretter med 4 volumdeler 95% etanol. Bunnfallet vaskes 3 ganger med 75% etanol og blir deretter vakuumtørret.

Det således oppnådde produkt (Hyalastin-fraksjonen) har en gjennomsnittlig molekylvekt på 50.000-100.000.

Utbyttet av HY er 0,4% av det opprinnelige friske utgangsvæv.

Eksempel 40 - Fremgangsmåte for oppnåelse av Hyalektinfraksjonen

Den konsentrerte oppløsning oppsamlet i beholderen på toppen

av ultrafiltreringsmembranen med en molekyl-utelukkelsesgrense på 200.000 som i Eksempel 39 fortynnes med vann inntil det oppnås en oppløsning inneholdende 5 mg/ml hyaluronsyre, bestemt ved kvantitativ analyse basert på doseringen av glukuronsyre.

Oppløsningen bringes til 0,1 M i natriumklorid og utfelles deretter med 4 volumdeler 95% etanol. Bunnfallet vaskes 3 ganger med 75% etanol og vakuumtørres deretter.

Det således oppnådde produkt (Hyalektin-fraksjonen) har en molekylvekt på 500.000-730.000. Dette svarer til en spesifikk hyaluronsyrefraksjon med en molekylkjede som måler mellom ca. 2.500 og 3.500 sakkaridenheter og som har en høy renhetsgrad. Utbyttet av HY er 0,2% av det opprinnelige friske utgangsvev.

Eksempel 41 - Fremstilling av filmer av tverrbundne derivater av hyaluronsyre (HY) delvis forestret med forskjellige alkoholer

DMSO-oppløsningene helles etter tilsetning av alle bestanddelene og etter homogenisering oppnådd som i Eksempler 6-15, 19-30 og 37, i glasskåler i lag med ønsket tykkelse og i en atmosfære av nitrogen, under absolutt tørre betingelser og uten lys i 24 timer.

Filmene av tverrbundne og forestrede hyaluronsyrederivater oppnådd på denne måte og hvor det også finnes tetrabutylammonium-karboksygrupper, dialyseres først i 1% NaCl og deretter i destillert vann ved 4°C, idet oppløsningene skiftes ut periodisk. Filmene som inneholder natriumsalter av ovennevnte tverrbundne derivater, anbringes deretter mellom to cellofanmembraner og vakuumtørres ved 37°C i en platetørker.

De farmasøytiske preparater som inneholder de tverrbundne derivatene fremstilt ifølge den foreliggende oppfinnelse og deres salter som aktivt prinsipp, både når det gjelder tverrbundne derivater eventuelt ytterligere forestret og/eller dannet til salt med terapeutisk aktive alkoholer og påtenkt for de samme indikasjoner som HY selv, og når det gjelder estere med terapeutisk aktive alkoholer påtenkt for anvendelse

ved indikasjoner svarende til slike alkoholer, inneholder de vanlige eksipienser og kan anvendes oralt, rektalt, parenteralt, subkutan, lokalt, intradermalt eller topisk. De er derfor i fast eller halvfast form, for eksempel som piller, tabletter, gelatinkapsler, kapsler, stikkpiller eller bløte gelatinkapsler. For parenteral og subkutan anvendelse er det mulig å anvende former påtenkt for intramuskulær eller intradermal administrering eller egnet for infusjon eller intravenøse injeksjoner. Det er derfor mulig å presentere aktive forbindelser som oppløsninger eller i form av frysetørrede pulvere for blanding med én eller flere eksipienser eller fortynningsmidler som er farmasøytisk tilfredsstillende og hensiktsmessige for ovennevnte anvendelser og med en type osmolaritet som er egnet for fysiologiske væsker. For lokal anvendelse bør man overveie preparater i sprayform, for eksempel nesespray, krem eller salver for topisk anvendelse av plaster passende fremstilt for intradermal administrering.

Forbindelsene fremstilt ifølge oppfinnelsen kan administreres til mennesker eller dyr. De inneholder fortrinnsvis 0,01-10% aktiv komponent for oppløsninger, spray, salver og krem og 1-100% og fortrinnsvis 5-50% aktiv forbindelse for preparater i fast form. Den dosering som skal administreres, avhenger av indikasjonen, av den ønskede effekt og av den valgte administreringsmåte. Den daglige dosering av slike preparater kan utledes fra den som er under anvendelse for de tilsvarende kjente preparater både av hyaluronsyre for de tilsvarende kurer, for eksempel for artritt-kur, for eksempel når det gjelder mennesker eller hester, og av terapeutisk aktiv alkohol hvis virkning skal utnyttes. Således kan doseringen av en hyaluronsyreester med kortison utledes fra dens innhold i denne ester og fra dens vanlige dosering i de kjente farmasøytiske preparater.

I kosmetiske artikler blandes de tverrbundne derivater fremstilt ifølge den foreliggende oppfinnelse og deres salter, med de eksipienser som vanligvis anvendes på dette område og er for eksempel slike som allerede er oppregnet ovenfor for

farmasøytiske preparater. Fremfor alt anvendes kremer, salver, og lotioner for lokal anvendelse hvor de tverrbundne derivatene fremstilt ifølge den foreliggende oppfinnelse kan utgjøre det aktive kosmetiske prinsipp eventuelt med tilsetning av andre kosmetisk aktive prinsipper, såsom steroider, for eksempel pregnenolon, eller ett av de prinsipper som er omtalt ovenfor. I disse preparater er de tverrbundne derivater fremstilt ifølge den foreliggende oppfinnelse fortrinnsvis estere med en alkohol uten noen kosmetisk virkning, såsom en lavere alifatisk alkohol, for eksempel én av dem som allerede er nevnt. I disse preparater skyldes effekten de iboende kosmetiske egenskaper hos polysakkaridkomponenten, såsom når det gjelder fri hyaluronsyre eller dens salter.

De kosmetiske artikler kan imidlertid baseres på substanser med spesifikke virkninger som er forskjellige fra hyaluronsyrens, for eksempel desinfeksjonsmidler, solbeskyttelsesmidler, vannbeskyttelses- eller regenererings-substanser, eller anti-rynke- eller velluktende substanser, særlig parfymer. I dette tilfelle kan de tverrbundne derivater fremstilt ifølge den foreliggende oppfinnelse igjen selv være den aktive bestanddel og stamme fra alkoholer med disse egenskaper, for eksempel fra høyere alifatiske alkoholer og terpenalkoholer når det gjelder parfymer eller de kan fremfor alt fungere som bærermaterialer for substanser med slike egenskaper som de er forbundet med. Spesielt viktige er derfor kosmetiske produkter lik de medikamenter som er beskrevet ovenfor og hvor den farmasøytisk aktive komponent er substituert med en kosmetologisk faktor og de respektive salter.

Anvendelsen av ovennevnte estere som stammer fra alkoholene anvendt i parfymeindustrien, representerer et viktig teknisk skritt fremover, siden det muliggjør en langsom, stadig og langvarig frigjøring av de duftende prinsipper.

En viktig anvendelse av forbindelsene ifølge den foreliggende oppfinnelse angår de sanitær- og kirurgiske artikler som allerede er beskrevet ovenfor.

En annen anvendelse av de tverrbundne derivatene fremstilt ifølge den foreliggende oppfinnelse hvor deres bionedbrytbare egenskaper utnyttes ved esterasesene som finnes i organismen, er representert ved fremstillingen av kapsler for subkutan implantering av medikamenter eller av mikrokapsler for injeksjon, for eksempel subkutan og intramuskulært. For påføring av subkutane medikamenter for langsom frigjøring og følgelig en "forsinkelses"-virkning, er kapsler fremstilt av silisummateriale blitt anvendt inntil i dag, med den ulempe at slike kapsler har lett for å vandre i organismen og det er umulig å gjenvinne dem. Med de tverrbundne derivatene fremstilt ifølge den foreliggende oppfinnelse er det klart at denne fare ikke lenger finnes. Av stor betydning er også fremstillingen av mikrokapsler som inneholder de tverrbundne derivatene fremstilt ifølge den foreliggende oppfinnelse, idet man unngår de problemer som vanligvis er forbundet med anvendelsen av dem, inntil nå helt begrenset av de grunner som er nevnt ovenfor. Denne fremstilling åpner et helt nytt anvendelsesområde hvor en "forsinkelses"-effekt ved injeksjonen oppnås.

En videre anvendelse av de tverrbundne derivatene fremstilt ifølge den foreliggende oppfinnelse innenfor medisinen og kirurgiens område er representert ved fremstillingen av forskjellige faste innlegg såsom plater, skiver, ark o.s.v. som erstatter de metalliske og slike som inneholder syntetisk plastmateriale anvendt for tiden, i tilfeller innbefattende innlegg påtenkt for fjerning etter en viss tidslengde. Preparater inneholdende animalsk kollagen med protein-beskaffenhet utløser ofte ubehagelige reaksjoner, såsom inflammasjon eller forkastning. Når det gjelder de tverrbundne derivatene fremstilt ifølge den foreliggende oppfinnelse, eksisterer ikke denne fare, selv om de stammer fra animalsk og ikke human hyaluronsyre, siden det ikke er noen uforenlighet mellom polysakkaridene hos forskjellige dyrearter.

En annen anvendelse av forbindelsene fremstilt ifølge oppfinnelsen er for korrigering av mangler og forsterkning av

bløtt vev. Man har i en tid følt behov for sikre og effektive biomaterialer som kan erstatte bløtt vev som er blitt fjernet eller skadet. Mange alloplastiske materialer innbefattende paraffin, teflonpasta, silisium og kveg-kollagen er blitt anvendt som erstatning for tapt bløtt vev. Disse materialer var imidlertid forbundet med uønskede og permanente forandringer i hudvevene, med vandring in situ og med negative reaksjoner. Det er derfor et fortsatt behov for et allsidig biomateriale for anvendelse i medisinen. De tverrbundne derivatene fremstilt ifølge den foreliggende oppfinnelse kan sikkert og effektivt anvendes for korrigering av slike mangler i bløtt vev såsom kviser, postkirurgiske atrofiske uregelmessigheter, Mohs kjemokirurgi, oppflengede leppesår og rynker på grunn av alder.

Også innbefattet i anvendelsene av de tverrbundne derivatene fremstilt ifølge den foreliggende oppfinnelse på medisinen og kirurgiens område er preparater fremstilt av materiale som kan utvides, særlig i form av svamper, for medisinsk behandling av sår eller lesjoner av forskjellig beskaffenhet.

P a t e n t k r a v

Fremgangsmåte for fremstilling av tverrbundne partialestere av hyaluronsyre med en C_2-C_{16} -alkylengruppe eller en C_1-C_4 -alkylenfenyl- C_1-C_4 -alkylengruppe i esterdelen, som, om ønsket, dertil kan være enkelt-partial-estere av hyaluronsyre med en C_1-C_{18} -alkylgruppe, en fenyl- C_1-C_4 -alkylgruppe eller en polycyklisk $C_{18}-C_{24}$ -alifatisk-cykloalifatisk gruppe substituert med en hydroksygruppe og tre okso-grupper i esterdelen, og av jordalkali- eller alkali-metallsalter av de partielle estere,

k a r a k t e r i s e r t v e d at et kvarternært ammonium-salt av hyaluronsyre omsettes i et aprotisk løsningsmiddel med et dihalogenid med formelen $Hal-R^1-Hal$, hvori Hal er halogen og R^1 er en C_2-C_{16} -alkylen-gruppe eller en C_1-C_4 -alkylenfenyl- C_1-C_4 -alkylengruppe, og om ønsket i tillegg med et halogenid med formelen $Hal-R$, hvori Hal er halogen og R er en C_1-C_{18} -alkylgruppe, en fenyl- C_1-C_4 -alkylgruppe eller en polycyklisk $C_{18}-C_{24}$ -alifatisk-cykloalifatisk gruppe substituert med en hydroksygruppe og tre oksogrupper, og om ønsket, en erholdt partialester omsettes med et alkalimetall- eller jordalkali-metallsalt som gir det tilsvarende, partielle alkalimetall- eller jordalkalimetallsalt.