



УДК 547.995.15:491.6.057

МОДИФИКАЦИЯ ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ АРОМАТИЧЕСКИМИ АМИНОКИСЛОТАМИ

© 2005 г. И. Ю. Понеделькина[#], В. Н. Одинокоев, Е. С. Вахрушева, М. Т. Голикова,
Л. М. Халилов, У. М. Джемилев

Институт нефтехимии и катализа АН Республики Башкортостан
и Уфимского научного центра РАН, 450075, Уфа, просп. Октября, 141

Поступила в редакцию 03.11.2003 г. Принята к печати 12.04.2004 г.

Проведена модификация гиалуроновой кислоты ароматическими аминокислотами (5-аминосалициловой, 4-аминосалициловой, антралиловой и *n*-аминобензойной) в присутствии 1-этил-3-[3-(диметиламино)пропил]карбодимид. В зависимости от природы аминокислоты получены модифицированные гликаны, содержащие 9–43% ариламидных и 10–33% изоуреидокарбонильных групп. Последующим восстановлением боргидридом натрия изоуреидокарбонильные группы трансформированы в гидроксиметильные.

Ключевые слова: гиалуроновая кислота, химическая модификация; 1-этил-3-[3-(диметиламино)пропил]карбодимид; ароматические аминокислоты.

ВВЕДЕНИЕ

Гиалуроновая кислота (НА), природный гетерополисахарид линейного строения из класса кислых гликозаминогликанов, выполняет важные биологические функции в организме человека и животных, на ее основе создан ряд перспективных лекарственных средств [1]. В последние годы особое внимание исследователей привлекает химически модифицированная НА в качестве неиммунного биосовместимого материала для создания пролонгированных форм лекарственных препаратов. Одним из наиболее известных методов модификации НА является ее конъюгация с первичными аминами в присутствии водорастворимых карбодимидов [2–7].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследовано взаимодействие НА ((I), звено А, см. схему) с фармакологически значимыми ароматическими аминокислотами: 5-аминосалициловой (IIa), 4-аминосалициловой (IIб), антралиловой (IIв) и *n*-аминобензойной (IIг) кислотами в водной среде в присутствии EDC (III). При обычно применяемой методике с предварительным активированием карбоксильных групп НА карбодимидом и последующим введением в реакцию аминокислоты не удается достичь более 5% кон-

версии CO₂H-групп НА в ариламидные, что согласуется с литературными данными [2, 3]. Нами установлено, что при добавлении 0.75-эквивалентного количества карбодимид (III) к смеси НА и соответствующей аминокислоты в воде и поддержании pH среды в пределах 4.7–4.8 превращение CO₂H-групп НА в ариламидные может достигать 30% при суммарной конверсии CO₂H-групп НА вплоть до 46%. Более высокая суммарная конверсия CO₂H-групп НА по сравнению с их трансформацией в ариламидные обусловлена образованием изоуреидокарбонильных групп. В спектрах ¹H-ЯМР и ¹³C-ЯМР конъюгатов (IVa-г) [НА, модифицированной аминокислотами] зафиксированы сигналы ароматических протонов в области δ 6.9–8.5 м. д. (H_{Ar}) и соответственно атомов углерода ариламидных групп в области δ 110–163 м. д. (C_{Ar}), а сигналы с δ_H ~ 3.0 м. д. и δ_C ~ 45 м. д. свидетельствуют о присутствии групп Me₂N изоуреидного остатка (звенья С).

Отмечено, что реакция образования ариламидов (IVa-г) при действии карбодимид (III) на смесь НА и соответствующей аминокислоты (IIa-г) в основном завершается в течение первых 15 мин (рис. 1). Используемая нами последовательность добавления реагентов позволяет частично избежать нецелевого расходования карбодимид (III) и увеличить выход ариламидов. С другой стороны, при взаимодействии НА с карбодимидом (III) (в отсутствие аминокислоты) наряду с образованием *O*-ацилизомочевин (VI) (схема) происходит гидролиз карбодимид, о чем свидетельствует его повышенный расход по сравнению со скоростью расходования на синтез аддукта (VI) (рис. 2, кри-

Сокращения: НА – гиалуроновая кислота; EDC – 1-этил-3-[3-(диметиламино)пропил]карбодимид; TCA – трихлоруксусная кислота; ТВАН – тетрабутиламонийгидроксид; DEAE-целлюлоза – диэтиламиноэтилцеллюлоза.

[#] Автор для переписки (тел./факс: (3472) 31-27-50; эл. почта: ink@anrb.ru).

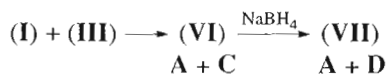
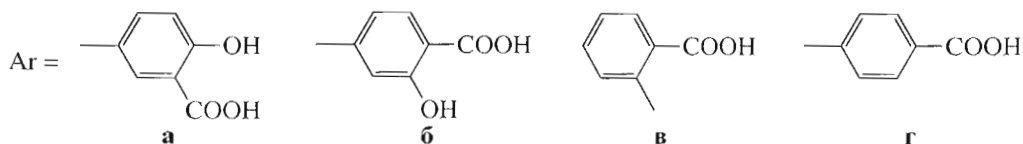
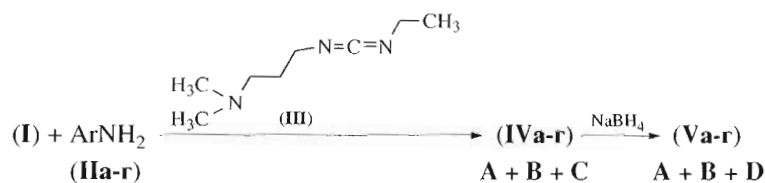
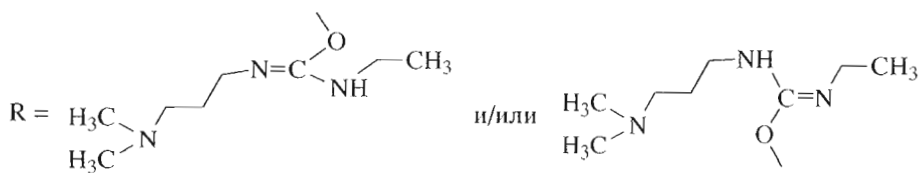
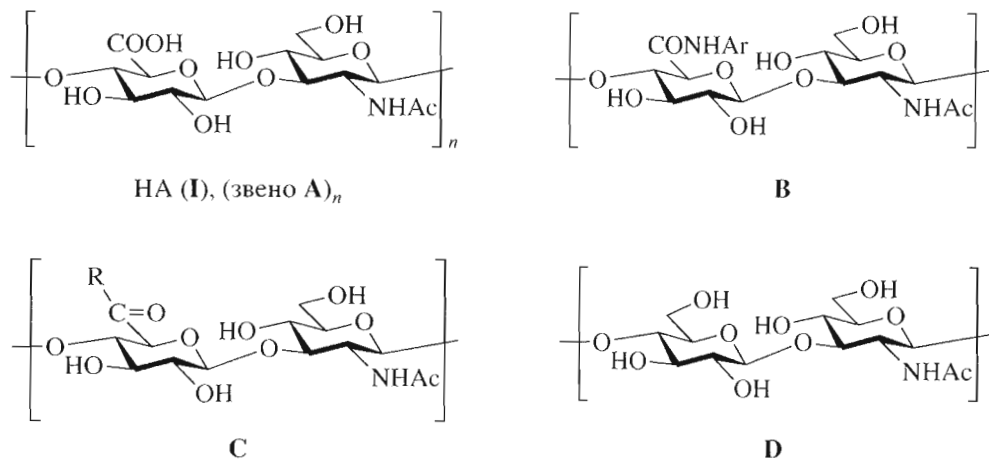


Схема. Структура гиалуроновой кислоты и звеньев, образующихся в НА при ее взаимодействии с ароматическими аминокислотами в присутствии EDC. Показаны схемы реакций образования ариламидных производных НА (IVa-r) и продуктов их боргидридного восстановления (Va-r), а также образования O-ациллизомочевия (VI) при взаимодействии НА (I) с карбодиимидом (III) и восстановления аддукта (VI) в соединение (VII). Показан качественный моносахаридный состав продуктов (IV)-(VII) (звенья А-D). Количественный состав приведен в таблице.

вые 1, 2). Кислотнокатализируемый гидролиз карбодиимида (III) [8] наблюдался также в присутствии аминокислот (IIa-r) (рис. 2, кривые 3-6), концентрация которых при этом не изменялась, и, следовательно, возможного синтеза гомополиамидов из аминокислот (IIa-r) не происходило. Установлено также, что при действии карбодиимида (III) на эквимольную смесь конъюгата (IVa-r) и соответствующей аминокислоты (IIa-r) концентрация последней не уменьшалась, и, следователь-

но, конъюгация аминокислот по карбоксигруппам ариламидных звеньев В не имела места. Таким образом, аминокислоты (IIa-r) в условиях реакции модификации НА расходуется только на образование конъюгатов (IVa-r), и содержание ариламидных звеньев В в них правомочно рассчитывать по разности между начальной и конечной концентрациями аминокислот (IIa-r) в реакционной смеси, которые определяли методами нитритометрии и ион-парной ВЭЖХ. Содержа-

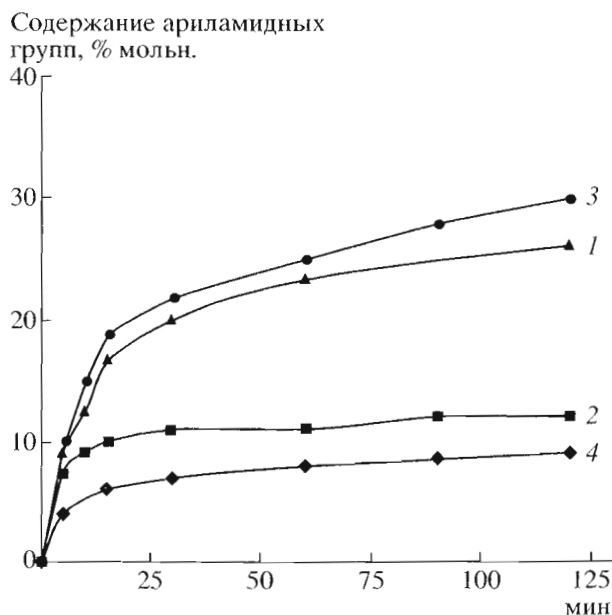


Рис. 1. Динамика образования ариламидных групп в продуктах (IVa) (1), (IVб) (2), (IVв) (3) и (IVг) (4) при взаимодействии НА (I) с соответствующими аминокислотами (IIa-г) в присутствии карбодимида (III) (при соотношении реагентов (I) : (II) : (III) = 1 : 1 : 0.75).

ние изоуреидных звеньев **C** рассчитывали по количеству 0.1 н. раствора HCl, расходуемого на титрование реакционной смеси для поддержания pH 4.7–4.8*. Содержание отдельно звеньев **B**, **C** и **A**, определенные этими методами (таблица), подтверждено данными спектроскопии ¹H-ЯМР – относительными интенсивностями сигналов протонов метильных групп с $\delta \sim 3.0$ м. д. (Me₂N в изоуреидокарбонильных звеньях **C**), $\delta \sim 2.1$ м. д. (MeCON в звеньях **A** и **C**) и $\delta \sim 1.7$ м. д. (MeCON в *N*-ацетилглюкозаминопиранозильных звеньях, находящихся под экранирующим влиянием пространственно близко расположенных [9] магнитно-анизотропных ароматических колец [10] ариламидных групп и, следовательно, соответствующих содержанию звеньев **B**). В согласии с отнесением сигнала с $\delta \sim 1.7$ м. д. к звеньям **B** находятся данные ¹H-ЯМР-спектроскопии для конъюгатов (IVa-г), полученных при использовании 1.5-мольного эквивалента конденсирующего реагента (III) и содержащих повышенное число звеньев **B** и **C** (таблица). С возрастанием конверсии CO₂H-групп НА адекватно возрастает относительная интенсивность сигналов с $\delta \sim 1.7$ м. д. (звенья **B**) и ~ 3.0 м. д. (звенья **C**).

Принято считать [11], что при взаимодействии EDC с карбоновыми кислотами образуются *O*-ацилизомочевины – активные интермедиаты

* Образование ацилмочевин в реакции НА с карбодимидами сопровождается присоединением протона и, как следствие, возрастанием pH среды.

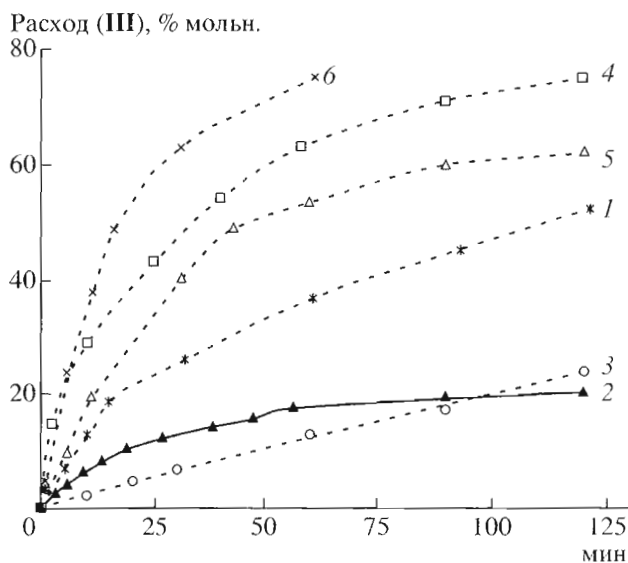


Рис. 2. Кривые расходования карбодимида (III) в присутствии кислот (I) (1), (IIa) (3), (IIб) (4), (IIв) (5) и (IIг) (6) (при соотношении кислоты : (III) = 1 : 0.75) и образования *O*-ацилизомочевин (VI) (2) в реакции (I) + (III) при соотношении (I) : (III) = 1 : 0.75.

ацилирования аминов. С другой стороны, для гликозаминогликанов известны примеры стабильных *O*-ацилизомочевин, которые при действии боргидрида натрия в водной среде нацело восстанавливаются в гидроксиметильные производные [12]. Боргидридное восстановление аддукта (VI), приведшее к соединению (VII) с гидроксиметильными группами вместо изоуреидокарбонильных остатков (звенья **D** вместо **C**), подтвердило структуру (VI) как *O*-ацилизомочевины. Аналогично, боргидридным восстановлением конъюгатов (IVa-г) получены соответственно соединения (Va-г) (схема). О полной замене звеньев **C** на звенья **D** при боргидридном восстановлении конъюгатов (IVa-г) и (VI) свидетельствует исчезновение сигнала в области $\delta \sim 3.0$ м. д., характерного для Me₂N-групп в звеньях **C**. Замена уреидных остатков на гидроксиметильные группы не изменяет УФ-спектров, которые идентичны для конъюгатов (IVa-г) и соответствующих им продуктов восстановления (Va-г). В ¹H-ЯМР-спектрах соединений (Va-г) относительные интенсивности сигналов ароматических протонов ариламидных групп (δ 6.9–8.5 м. д.) и метильных протонов *N*-ацетильных групп ($\delta \sim 2.1$ и ~ 1.7 м. д.) сохраняются в том же соотношении, что и до боргидридного восстановления. Следовательно, в соединениях (Va-г) число звеньев **A** и **B** то же, что и в конъюгатах (IVa-г), а число звеньев **D** соответствует числу звеньев **C** в конъюгатах (IVa-г) (таблица). Содержание звеньев **D** в полисахаридах (Va-г) и (VII), найденное антроновым методом, используемым для определения остатков нейтральных

Содержание (%) дисахаридных звеньев **A–D** в структуре модифицированных производных гиалуроновой кислоты (**I**)*

Продукт	(I) : (II) : (III) = 1 : 1 : 0.75				(I) : (II) : (III) = 1 : 1 : 1.5			
	A	B	C	D	A	B	C	D
(IVa)	64	26	10	–	50	40	10	–
(IVб)	69	12	19	–	46	21	33	–
(IVв)	54	30	16	–	30	43	27	–
(IVг)	77	9	14	–	57	18	25	–
(Va)	64	26	–	10	50	40	–	10
(Vб)	69	12	–	19	46	21	–	33
(Vв)	54	30	–	16	30	43	–	27
(Vг)	77	9	–	14	57	18	–	25
(VI)	80	–	20	–	69	–	31**	–
(VII)	80	–	–	20	–	–	–	–

* Содержание звеньев **A** в НА – 100%.

** Образец (**VI**) с содержанием звеньев **C** 31% боргидридному восстановлению не подвергался.

сахаров [13], совпадает с результатами спектрального метода анализа с помощью ¹H-ЯМР.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Спектры ¹H-ЯМР и ¹³C-ЯМР регистрировали для растворов в D₂O на спектрометре Bruker AMX-300 (рабочая частота для ¹H-ЯМР – 300.13 МГц, для ¹³C-ЯМР – 75 МГц), в качестве внутреннего стандарта использовали натриевую соль 3-(триметилсилил)-1-пропансульфоновой кислоты. УФ-спектры получали на спектрофотометре Specord M-40. Для контроля pH растворов использовали pH-метр “pH-340”. Содержание аминокислот (**IIa–г**) в реакционных смесях определяли методами нитритометрии и ион-парной ВЭЖХ (с использованием в качестве элюента 0.05 М фосфатного буфера с 20% об. метанола, содержащего 0.005 М ТВАН; pH 6–7, сорбент – Сепарон C₁₈, λ 240, 270 нм).

В работе применялись реактивы фирмы “Aldrich” (EDC, 4-аминосалициловая кислота) и российские – марки “ч. д. а.” (5-аминосалициловая, антралиновая и *n*-аминобензойная кислоты). ТВАН получали взаимодействием йодида тетрабутиламмония со свежеприготовленным гидроксидом серебра [14]. Боргидрид натрия марки “ч. д. а.” очищали перекристаллизацией из диглима.

Гиалуроновая кислота (НА). Гомогенизированные пупочные канатики новорожденных (1 кг) перемешивали при комнатной температуре с 1 л 1 н. NaOH в течение 7 сут. Гомогенат (~1 л) нейтрализовали конц. HCl, затем добавляли 50–80 г ТСА, осадок белков удаляли центрифугированием, супернатант фильтровали через слой ваты и Al₂O₃. Фильтрат нейтрализовали 5 н. NaOH, добавляли 4-кратное (по объему) количество этанола, оса-

док неочищенной НА отделяли центрифугированием. Для очистки от остатков белков и полисахаридов НА растворяли в буфере А (водный раствор 8 М мочевины, 0.5% Тритона X-100 и 0.05% CH₃COONa, pH 6), наносили на колонку (300 × 50 мм) с DEAE-целлюлозой, которую последовательно промывали буфером А (до минимальной интенсивности поглощения элюата при 290 нм), 1.0–1.3 л воды, 2–3 л 0.15 н. NaCl (пока интенсивность поглощения элюата при 220 нм не снижалась до минимального значения), после чего элюировали НА 1.0–1.5 л 0.6 н. NaCl. Из элюата добавлением 4-кратного (по объему) количества этанола осаждали НА, осадок центрифугировали, последовательно промывали 50 мл этанола, 50 мл эфира и сушили при температуре ≤60°C и пониженном давлении. Получили 1.0 г чистой НА, белого порошка, *M_n* ~ 40–60 кДа (определено методом гель-проникающей хроматографии на колонке с сефадексом G-150). В качестве стандартов использованы декстраны. Содержание D-глюкуроновой кислоты – 47.9% (по массе, Дише [15]), проба на белок – отрицательная (по Лоури [16]), спектры ¹H-ЯМР и ¹³C-ЯМР НА идентичны приведенным в работах [9, 17, 18].

Модификация НА аминокислотами (**IIa–г**).

К смеси 120 мг (0.3 ммоль) НА и 0.3 ммоль соответствующей аминокислоты в 30 мл H₂O добавляли 0.1 н. NaOH до pH 4.7–4.8, затем при интенсивном перемешивании и температуре 20–22°C вносили 43.1 мг (0.225 ммоль) [или 86.3 мг (0.45 ммоль)] карбодиимида (**III**), поддерживая pH реакционной смеси в пределах 4.7–4.8 титрованием 0.1 н. HCl (при взаимодействии НА с аминокислотой (**IIa**) pH среды не изменялся). Через 2 ч к реакционной смеси последовательно добавляли 0.1 н. NaOH (до

pH 7), 4–5 мл насыщенного раствора NaCl и 120–130 мл этанола, после чего охлаждали до 0°C. Осадок отделяли центрифугированием, растворяли в 10 мл 6% NaCl и добавляли 40 мл этанола. Вновь выпавший осадок центрифугировали, промывали этанолом (10 × 3 мл), затем эфиром (10 × 3 мл) и сушили при температуре ≤60°C и пониженном давлении. Получили 120–135 мг соответствующих конъюгатов (**Iva-r**) в виде белых порошков с розовым или желтым оттенком, растворимых в воде.

Конъюгат (IVa). УФ-спектр (H₂O, λ_{max}, нм): 313. ¹³C-ЯМР*: 177.3, 176.7 и 169.4 (C=O); 160.0 (C2, Ar), 131.0 (C5, Ar), 129.8 (C4, Ar), 125.8 (C6, Ar), 120.9 (C1, Ar), 119.5 (C3, Ar); 105.8 (C1, G), 103.1 (C1, N), 85.2 (C3, N), 82.6 (C4, G), 78.9 (C5, N), 78.0 (C5, G), 76.3 (C3, G), 75.1 (C2, G), 71.1 (C4, N), 63.2 (C6, N), 56.9 (C2, N), 45.4 (Me₂N), 25.1 (MeCON).

Конъюгат (IVб). УФ-спектр (H₂O, λ_{max}, нм): 267 и 304. ¹³C-ЯМР: 177.5, 176.7 и 169.7 (C=O); 163.1 (C2, Ar), 143.9 (C4, Ar), 134.0 (C6, Ar), 117.6 (C5, Ar), 114.1 (C1, Ar), 110.3 (C3, Ar); 105.7 (C1, G), 103.1 (C1, N), 85.1 (C3, N), 82.4 (C4, G), 78.9 (C5, N), 78.0 (C5, G), 76.2 (C3, G), 75.1 (C2, G), 71.0 (C4, N), 63.2 (C6, N), 57.1 (C2, N), 45.4 (Me₂N), 25.1 (MeCON).

Конъюгат (IVв). УФ-спектр (H₂O, λ_{max}, нм): 304. ¹³C-ЯМР: 177.5, 176.7 и 169.0 (C=O); 123–141 (C1, Ar)–(C6, Ar); 105.7 (C1, G), 103.1 (C1, N), 85.1 (C3, N), 82.4 (C4, G), 78.9 (C5, N), 78.0 (C5, G), 76.2 (C3, G), 75.1 (C2, G), 71.0 (C4, N), 63.2 (C6, N), 57.1 (C2, N), 45.4 (Me₂N), 25.1 (MeCON).

Конъюгат (IVг). УФ-спектр (H₂O, λ_{max}, нм): 289. ¹³C-ЯМР: 177.5, 176.7 и 169.0 (C=O); 124–143 (C1, Ar)–(C6, Ar); 105.7 (C1, G), 103.1 (C1, N), 85.1 (C3, N), 82.4 (C4, G), 78.9 (C5, N), 78.0 (C5, G), 76.2 (C3, G), 75.1 (C2, G), 71.0 (C4, N), 63.2 (C6, N), 57.1 (C2, N), 45.4 (Me₂N), 25.1 (MeCON).

Взаимодействие НА с карбодинимидом (III). К раствору 120 мг (0.3 ммоль) НА в 30 мл H₂O добавляли 0.1 н. HCl до pH 4.7–4.8, затем при интенсивном перемешивании и температуре 20–22°C вносили 43.1 мг (0.225 ммоль) [или 86.3 мг (0.45 ммоль)] карбодинимида (**III**), поддерживая pH реакционной смеси в пределах 4.7–4.8 титрованием 0.1 н. HCl. Расход EDC определяли согласно методу, изложенному в работе [19]. Через 2 ч к реакционной смеси последовательно добавляли 0.1 н. NaOH (до pH 7), 4–5 мл насыщенного раствора NaCl и 120–130 мл этанола, после чего охлаждали до 0°C. Осадок отделяли центрифугированием, растворяли его в 10 мл 6% NaCl и добавляли 40 мл этанола. Выпавший осадок центрифугировали, последовательно промывали этанолом (10 × 3 мл), эфи-

ром (10 × 3 мл) и сушили при температуре ≤60°C и пониженном давлении. Получили 110 мг аддукта (**VI**), белого порошка, растворимого в воде. ¹H-ЯМР: 1.3 м (CH₂, CH₃), 2.1 уш.с (MeCON), 3.0 с [Me₂N]. ¹³C-ЯМР: 177.5, 176.7 и 172.1 (C=O); 158.4 (N=CO–NH), 105.7 (C1, G), 103.1 (C1, N), 85.1 (C3, N), 82.6 (C4, G), 79.0 (C5, N), 78.0 (C5, G), 76.2 (C3, G), 75.1 (C2, G), 71.1 (C4, N), 63.2 (C6, N), 56.9 (C2, N), 45.4 (Me₂N), 25.1 (MeCON).

Восстановление соединений (IVa-г) и (VI) с помощью боргидрида натрия. К раствору 100 мг соответствующего соединения в 10 мл воды при комнатной температуре в течение 1 ч порциями добавляли 4.0 г NaBH₄, поддерживая pH раствора в интервале 7–8 с помощью 4 н. HCl. Через 2.5 ч реакционную смесь помещали в диализный мешок и выдерживали 24 ч в проточной дистиллированной воде, последовательно добавляли 4–5 мл насыщенного раствора NaCl, 4-кратное (по объему) количество этанола и охлаждали до 0°C. Выпавший осадок центрифугировали, растворяли в 10 мл 6% NaCl и добавляли 40 мл этанола. Осадок отделяли центрифугированием, последовательно промывали этанолом (10 × 3 мл), эфиром (10 × 3 мл) и сушили при температуре ≤60°C и пониженном давлении. Получили 60–70 мг соответствующих продуктов восстановления (**Va-г**) и (**VI**), белых порошков, растворимых в воде. УФ-спектры (H₂O, λ_{max}, нм): 313 [для соединения (**Va**)], 267 и 304 [для соединения (**Vб**)], 304 [для соединения (**Vв**)], 289 [для соединения (**Vr**)].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Verduyck K.P., Prestwich G.D. // Therapeutic Drug Carrier Systems. 1998. V. 15(5). P. 513–555.
2. Cera C., Terbojevich M., Cosani A., Palumbo M. // Int. J. Biol. Macromol. 1988. V. 10. P. 66.
3. Danishefsky I., Siscovic E. // Carbohydrate Res. 1971. V. 16. P. 199–205.
4. Pouyani T., Prestwich G.D. // Bioconjugate Chem. 1994. V. 5(4). P. 339–347.
5. Verduyck K.P., Marecak D.M., Marecak J.F., Prestwich G.D. // Bioconjugate Chem. 1997. V. 8(5). P. 686–694.
6. Kuo J., Swann D.A., Prestwich G.D. // Bioconjugate Chem. 1991. V. 2. P. 232–241.
7. Luo Yi., Prestwich G.D. // Bioconjugate Chem. 1999. V. 10. P. 755–763.
8. Williams A., Ibrahim T.I. // JACS. 1981. V. 103. P. 7090–7095.
9. Scott J.E., Heatley F. // Biomacromolecules. 2002. V. 3. P. 547–553.
10. Ионин Б.И., Еришов Б.А., Кольцов А.И. ЯМР-спектроскопия в органической химии. Л.: Химия, 1983.
11. Nakajima N., Ikada Y. // Bioconjugate Chem. 1995. V. 6. P. 123–130.
12. Inoe Y., Nagasawa K. // Carbohydrate Res. 1982. V. 111. P. 113–125.
13. Jermyn M.A. // Anal. Biochem. 1975. V. 68. P. 332–335.

* В спектрах ¹³C-ЯМР конъюгатов (**Iva-г**) и (**VI**): (C Ar), (C N) и (C G) – сигналы соответствующих атомов углерода ароматического, N-ацетилглюкозаминно- и глюкуронопиранозильного остатков.

14. Сиггиа С., Ханна Дж. Г. Количественный органический анализ по функциональным группам: Пер. с англ. М.: Химия, 1983.
15. Методы химии углеводов / Ред. Н.А. Кочетков. Пер. с англ. М.: Мир, 1967.
16. Кочетов Г.А. Практическое руководство по энзимологии. М.: Высшая школа, 1980.
17. Welti D., Rees D.A., Welsh E.J. // *Eur. J. Biochem.* 1979. V. 94. P. 505–514.
18. Cavalieri F., Chiessi E., Paci M., Paradossi G., Flabiani A., Cesaro A. // *Macromolecules.* 2001. V. 34. P. 99–109.
19. Jacobson B.S., Fairman K.R. // *Anal. Biochem.* 1980. V. 106. P. 114–117.

Modification of Hyaluronic Acid with Aromatic Amino Acids

I. Yu. Ponedel'kina[#], V. N. Odinokov, E. S. Vakhrusheva,
M. T. Golikova, L. M. Khalilov, and U. M. Dzhemilev

[#] Phone/fax: +7(3472) 31-2750; e-mail: ink@anrb.ru

*Institute of Petrochemistry and Catalysis, Academy of Sciences of Bashkortostan and Ufa Scientific Center,
Russian Academy of Sciences, pr. Oktyabrya 141, Ufa, 450075 Bashkortostan, Russia*

Hyaluronic acid was modified with aromatic amino acids (5-aminosalicylic, 4-aminosalicylic, anthranilic, and *p*-aminobenzoic) in the presence of 1-ethyl-3-[3-(dimethylamino)propyl]carbodiimide. The modified glycans contained 9–43% of arylamide groups and 10–33% of isoureidocarbonyl groups depending on the nature of the amino acid. Reduction with sodium borohydride allowed the conversion of isoureidocarbonyl groups into hydroxymethyl groups. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2005, vol. 31, no. 1; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: aromatic amino acids; 1-ethyl-3-[3-(dimethylamino)propyl]carbodiimide; hyaluronic acid, chemical modification