

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

Zveřejněná podle §31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

2015-574

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.:

C08B 37/08 (2006.01)
A61K 9/10 (2006.01)
A61K 47/36 (2006.01)
A61K 9/51 (2006.01)
B82Y 5/00 (2011.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

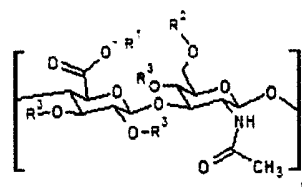
(22) Přihlášeno: **26.08.2015**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **08.03.2017**
(Věstník č. 10/2017)

(71) Přihlašovatel:
Contipro Pharma a.s., Dolní Dobrouč, CZ

(72) Původce:
Ing. Alena Matelová, Vsetín, CZ
Gloria Huerta-Angeles, Ph.D., Česká Třebová, CZ
Mgr. Zdislava Brůnová, Nekoř, CZ
Ing. Daniela Šmejkalová, Ph.D., Ústí nad Orlicí, CZ
Mgr. Markéta Dalecká, Dolní Dobrouč, CZ
doc. RNDr. Vladimír Velebný, CSc., Žamberk, CZ

(74) Zástupce:
KANIA*SEDLÁK*SMOLA, Mgr. Martina
Dvořáková, Mendlovo náměstí 1a, 603 00 Brno



(54) Název přihlášky vynálezu:
Hydrofobizované esterové deriváty kyseliny hyaluronové nebo jejich soli, způsob jejich přípravy, nanomicelární kompozice, způsob jejich přípravy a použití

(57) Anotace:
Řešení se týká hydrofobizovaných esterových derivátů kyseliny hyaluronové obsahující alkylarylové nebo alkylheteroarylové substituenty obecného vzorce I, kde R^1 je H nebo její stůl, R^2 je H nebo $-CO(CH_2)_6C_6H_4R^5$ nebo $-CO-C_6H_4-pO(CH_2)_yCH_3$, nebo $-CO-(CH_2)_zNC_{12}H_8$, kde R^5 je H nebo CH_3 ; x je celé číslo v rozmezí 4 až 21, s výhodou 4 až 15 nebo y je celé číslo v rozmezí 8 až 21, s výhodou 8 až 15 nebo z je celé číslo v rozmezí 3 až 16, s výhodou 7 až 11, nejlépe 10; a nebo $-(CH_2)_x$ nebo $-(CH_2)_y$ nebo $-(CH_2)_z$ je lineární nasycená nebo nenasycená část řetězce, přičemž alespoň v jedné opakující se jednotce je jeden nebo více nebo $-CO(CH_2)_xC_6H_4-pR^5$ nebo $-CO-C_6H_4-pO(CH_2)_yCH_3$, nebo $-CO-(CH_2)_zNC_{12}H_8$; R^3 je H nebo R^2 ; a kde n je celé číslo v rozmezí 1 až 495 dimerů. Dále se řešení týká způsobu jejich přípravy a jejich použití pro enkapsulaci biologicky aktivních aromatických látek nerozpustných ve vodě za vzniku nanomicelární kompozice, která se pak použije pro farmaceutické a kosmetické aplikace.

CZ 2015 - 574 A3

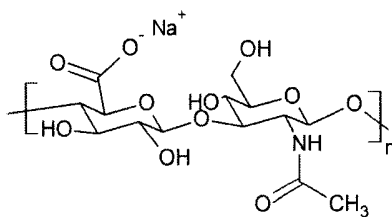
Hydrofobizované esterové deriváty kyseliny hyaluronové nebo jejich soli, způsob jejich přípravy, nanomicelární kompozice, způsob jejich přípravy a použití

Oblast techniky

Vynález se týká hydrofobizovaných esterových derivátů kyseliny hyaluronové nebo jejich solí obsahující alkylarylové nebo alkylheteroarylové substituenty, způsobu jejich přípravy a jejich použití pro enkapsulaci biologicky aktivních aromatických látek nerozpustných ve vodě. Hydrofobní substituenty hyaluronanu mohou ve vodných roztocích agregovat, vytvářet nepolární domény, ve kterých mohou být nekovalentně enkapsulovány kosmeticky nebo farmaceuticky aktivní látky pomocí fyzikálních π - π interakcí. Vynález se také týká nanomicelární kompozic, způsobu jejich přípravy a použití pro farmaceutické a kosmetické aplikace.

Dosavadní stav techniky

Kyselina hyaluronová (nebo také hyaluronan neboli HA vzorec 1 níže) je polysacharid tvořený opakujícími se disacharidovými jednotkami glukuronové kyseliny a *N*-acetylglukosaminu spojených β -(1,4) a β -(1,3) glykosidovými vazbami. Molekulová hmotnost se pohybuje v rozmezí 10^4 - 10^7 g/mol. HA je hlavní komponentou extracelulární matrix a je esenciální pro správný buněčný růst, strukturní stabilitu orgánů a organizaci tkání. Z farmaceutického hlediska je HA slibná látka díky svým vlastnostem, jako je biodegradabilita, biokompatibilita a netoxicitá.



vzorec 1

Modifikace kyseliny hyaluronové

Kyselina hyaluronová může být modifikována na hydroxylových či karboxylových skupinách. K modifikačním reakcím HA jsou používána různá aktivační činidla, která však mají mnohé

nevýhody. Podle US 2007/0224277 se *N,N'*-karbonyldiimidazol (CDI) jako činidlo využívá pro přípravu esterů hyaluronanu (Schéma 1).

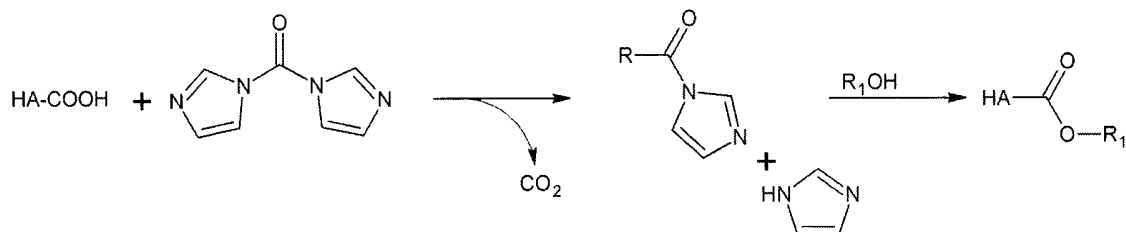


Schéma 1: Schéma tvorby esteru pomocí CDI

Nicméně i CDI má mnohé nevýhody: je náchylné k hydrolyze a s vodou reaguje bouřlivě za vzniku CO_2 a imidazolu (viz Schéma 2) [1]. Musí být proto používán v prostředí bezvodých organických rozpouštědel, jako např. CHCl_3 , THF, benzenu nebo DMF, ve kterých je však HA (kyselá i nativní forma) velmi obtížně rozpustná. Acylimidazolové deriváty jsou všeobecně relativně stabilní, a tedy i méně reaktivní, což může způsobit vznik vedlejších produktů [2]. Použití výrazného nadbytku CDI reakci urychlí, ale nadbytečný CDI zůstává v reakční směsi a brání acylaci [3].

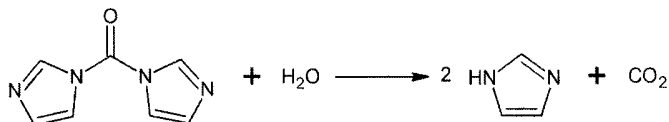


Schéma 2: Hydrolyza CDI s vodou

K urychlení reakce jsou proto běžně přidávány organokatalyzátory jako 1-hydroxy-benzotriazol (HOBt), či 1,8-diazabicyklo[5.4.0]undec-7-en (DBU) aj. Použití těchto činidel však s sebou nese mnohé nevýhody, jako je riziko exploze (HOBt) či toxicita (DBU) (Larrivee-Aboussafy et al., 2010). Podle US 2007/0224277 může být esterifikace doprovázena, při použití CDI jako aktivačního činidla, kross-linkační reakcí mezi hydroxylem a karboxylem HA. Patentový dokument US 2012/8324356 popisuje esterifikaci HA pomocí CDI ve formamidu, který je však teratogenní. CDI není použitelný ani pro reakce ve vodném prostředí, protože rychle degraduje (viz Schéma 2 výše). Podle patentového dokumentu WO 2012/013670 nebylo vyššího stupně substituce dosaženo ani při esterifikaci v THF, kde SS získaného produktu byl 2 %. Podle US 2012/0289478 byl získán produkt s SS= 7 % při hydrofobizaci kyselinou 3,4-dihydroxyskořicovou, ale také ve formamidu.

Modifikace karboxylových skupin HA není výhodná, pokud je zamýšlená aplikace derivátu HA spojena s terapií, ve které hrají důležitou roli HA receptory, protože chemická

modifikace karboxylových skupin HA mění její biologické chování v organismu. HA nebývá po takové modifikaci rozpoznávána receptory pro HA [4]. V patentovém dokumentu US 1986/4851521 je popsáno, že estery HA modifikovaných přes karboxylovou skupinu HA jsou špatně rozpustné ve vodě (v závislosti na stupni substituce a Mw). Tato vlastnost limituje využití těchto derivátů jako nosičů aktivních látek, protože při některých, zejména farmaceutických aplikacích (např. intravenózních podáních) je nezbytné, aby byly polymerní nosiče zcela dobře rozpuštěné ve vodném prostředí a neagregovaly ve větší celky.

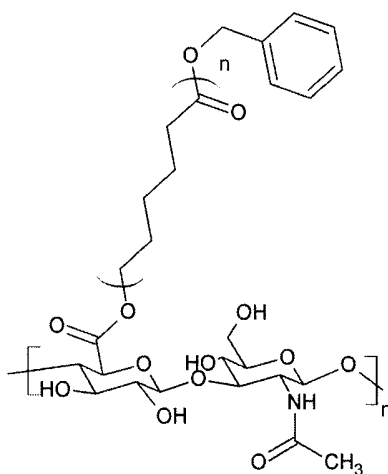
Dalším běžně používaným aktivačním činidlem pro hydrofobizace HA je 1-ethyl-3-(3-dimethylaminoisopropyl)karbodiimid (EDC). EDC je ve vodném prostředí používán spolu s organokatalyzátorem *N*-hydroxysukcinimidem (NHS) [1], ale i přesto modifikační reakce poskytují jen deriváty s nízkým stupněm substituce. Navíc při použití EDC může dojít k tvorbě nežádoucích vedlejších produktů a to intramolekulárním přesmykem vznikajícího acylu intermediátu: NHS-ester, anhydridy karboxylových kyselin, *N*-acylmočoviny, nezreagované kyseliny a hydrolyzovaný terc. butyl ester [5]. Další velkou nevýhodou použití EDC/NHS je také nezbytnost kontroly pH reakce. NHS-intermediát vzniká při kyselém pH (3,5 – 4,5), zatímco nukleofilní atak aminu žádá neutrální či zásadité pH, ve kterém je NHS-intermediát hydrolyticky labilní [6]. Tyto reakční podmínky (zejména kyselé pH) navíc způsobují degradaci HA. Kromě výše zmíněných činidel může být HA aktivována také pomocí 4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorfolinium chloridu (DMTMM). Pro modifikace HA byl popsán jako optimální nevýhodný až 4 násobný molární nadbytek DMTMM vůči HA a dlouhá reakční doba (až 5 dní), (EP 2008/1992364, D'Este, Eglin & Alini, 2014).

N,N'-Dicyklohexylkarbodiimid (DCC) je kondenzační činidlo používané při přímých kondenzacích karboxylových kyselin s aminy a alkoholy. DCC je ve vodě nerozpustný, proto reakce se provádí v polárních aprotických organických rozpouštědlech (například v DMSO nebo DMF). V tomto prostředí je sodná sůl kyseliny hyaluronové nerozpustná a musí být převedena na kyselou formu či tetrabutylamoniovou sůl. Nevýhodou tohoto postupu je, že způsobuje degradaci řetězce HA [7]. Samotný DCC vykazuje nízkou reaktivitu, a proto se používá spolu s organokatalyzátory, například 1,1,3,3-tetramethyl-4-(4-pyridyl)guanidinem [8], který je však komerčně nedostupný nebo 4-dimethylaminopyridinem (DMAP). Ve velkém molární množství DCC dochází k intra- i intermolekulárnímu kross-linku HA.

Amfifilní graft polymer HA s aromatickým řetězcem jako nosič

Příprava amfifilního graft polymeru kyseliny hyaluronové byla provedena pomocí poly(ϵ -kaprolaktonu) (PCL), který byl připraven polymerizací benzylalkoholu a ϵ -kaprolaktonu

(viz vzorec 2 níže). Tato syntéza vykazuje mnoho nevýhod: využívá kyselou formu hyaluronanu a vysokou teplotu (80 °C po dobu 4 h), což degraduje polysacharidový řetězec, dalším problémem je použití bezvodého DMSO a inertní atmosféry, což je v průmyslovém měřítku neuskutečnitelné. Poslední nevýhodou je nemožnost přesně definovat délku alifatického řetězce během polymerizace. PCL je syntetický polymer, při jeho syntéze se používá vysoce toxický katalyzátor (2-ethylhexanoát cínatý), jenž není doporučený pro biomedicínské aplikace, což je zásadní problém kvůli registrační dokumentaci [9]. Velikou nevýhodou polymerních micel je relativně vysoké CAC (0,05 g.ml⁻¹)



vzorec 2: HA modifikovaná polykaprolaktonem

Pyrenem substituovaný hyaluronan byl připraven a popsán v publikaci [10]. 1-Pyrenmethyamin je navázán na karboxylovou skupinu HA a blokuje terapeuticky významné karboxylové skupiny HA [11]. Podobné výsledky byly získány s konjugátem 1-pyrenylbutyrové kyseliny a hyaluronanu pro cílení do nádorových buněk [12]. Bohužel, deriváty pyrenu způsobují nádory u myši po dermální i podkožní expozici (Report on Carcinogens, 12. vydání, 2011, US Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Toxicology program). Micely na bázi PEG, kyseliny skořicové a HA vykazovaly pomalé uvolňování léčiva a dosahovaly malého průměru. Hlavní nevýhodou těchto polymerních micel je vysoké CAC (0,366 mg/ml), nízká stabilita v krevních proteinech, zejména albuminu, α- a β- globulinu a γ- globulinu [13], která je způsobena jejich adsorbcí na povrch micel [14].

Polymerní micely na bázi graftované HA však také mají nějaké nevýhody:

1) známé polymerní micely HA patřící do stavu techniky nejsou vhodné pro použití *in vivo*, protože mohou mít nežádoucí vlastnosti, například vysokou toxicitu díky použitému linkeru 1-pyrenmethyloaminu.

2) hodnota CAC je vysoká, například od 0,12 nebo 0,30 mg/ml a vyšší [15]

Blokové kopolymery na bázi hyaluronanu

(Di)-blokované kopolymery byly syntetizovány na redukčním konci hyaluronanu nebo jiných polysacharidů pomocí oximové vazby („click reakcí“), v dextranu, hyalurononu nebo chitosanu [16]. Bohužel, pro tuto modifikaci je nutné HA převést na její kyselou formu [17], což způsobuje degradaci řetězce. Pro tento typ ko-polymeru hodnota CAC není známá.

Amfifilní kopolymery jako nosiče

Xu et al. publikovali amfifilní kopolymery poly(ϵ -kaprolaktonu) (PCL) a poly(ethylenglykolu) (PEG), ale nevýhodou blokových kopolymerů oproti graft polymerům je vysoká kritická agregační koncentrace (CAC) [18].

Aromatické blokové kopolymery jako nosiče

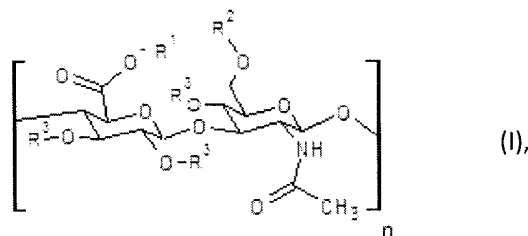
Známé jsou například polymerní micely na bázi poly(ethylenglykol)-b-poly(karbonát-ko-L-laktid) blok kopolymeru [19] či micely aromaticky esterifikovaného poly(ethylenglykol)-poly(β -benzyl L-aspartát) blok kopolymeru [20]. PEG je syntetický nebiodegradabilní polymer [21]. Nevýhodou syntetických polymerů je, že jejich charakter je tělu cizí a že může docházet k jejich nechtěné akumulaci v organismu.

Patentový dokument WO2014082609 popisuje acylované deriváty HA, které však nevykazují potřebnou míru enkapsulace biologicky aktivních látek, zvláště těch, jež obsahují aromatickou strukturu nebo obsahují vyšší počet násobných vazeb. Jejich vazebná kapacita není dostatečná pro aplikační využití.

Podstata vynálezu

Vzhledem k tomu, že HA nemůže být použita k agregaci a enkapsulaci hydrofobních léčiv ve své nativní formě, musí být k tomuto účelu provedena její modifikace. Vhodnou modifikací mohou být pro různé aplikace zlepšeny i další přirozené fyzikálně-chemické vlastnosti HA jako její rozpustnost, viskozita či amfifilita. Jak bylo popsáno výše, syntetické polymery HA stavu techniky mají značné nevýhody pro jejich použití k enkapsulaci biologicky aktivních aromatických látek nerozpustných ve vodě. Proto byly připraveny hydrofobizované

esterové deriváty kyseliny hyaluronové nebo jejich soli obecného vzorce I podle vynálezu, obsahující alespoň jeden alkylarylový nebo alkylheteroarylový substituent



kde

R^1 je H^+ nebo její sůl,

R^2 je H nebo $-\text{CO}(\text{CH}_2)_x\text{C}_6\text{H}_4-pR^5$ nebo $-\text{CO}-\text{C}_6\text{H}_4-p\text{O}(\text{CH}_2)_y\text{CH}_3$, nebo $-\text{CO}-(\text{CH}_2)_z\text{NC}_{12}\text{H}_8$, ,

kde R^5 je H nebo CH_3 ; x je celé číslo v rozmezí 4 až 21, s výhodou 4 až 15 nebo y je celé číslo v rozmezí 8 až 21 s výhodou 8 až 15, nebo z je celé číslo v rozmezí 3 až 16, s výhodou 7 až 11, nejlépe 10, a $-(\text{CH}_2)_x-$ nebo $-(\text{CH}_2)_y-$ nebo $-(\text{CH}_2)_z-$ je lineární nasycená nebo nenasycená část řetězce, přičemž alespoň v jedné opakující se jednotce je jeden nebo více $-\text{CO}(\text{CH}_2)_x\text{C}_6\text{H}_4-pR^5$ nebo $-\text{CO}-\text{C}_6\text{H}_4-p\text{O}(\text{CH}_2)_y\text{CH}_3$, nebo $-\text{CO}-(\text{CH}_2)_z\text{NC}_{12}\text{H}_8$;

R^3 je H nebo R^2 ;

a kde n je celé číslo v rozmezí 1 až 495 dimerů.

Výhodným provedením vynálezu je derivát kyseliny hyaluronové nebo jeho sůl obecného vzorce I výše, kde R^2 je $-\text{CO}(\text{CH}_2)_x\text{C}_6\text{H}_4-pR^5$ nebo $-\text{CO}-\text{C}_6\text{H}_4-p\text{O}(\text{CH}_2)_y\text{CH}_3$, nebo $-\text{CO}-(\text{CH}_2)_z\text{NC}_{12}\text{H}_8$ alespoň v jedné opakující se jednotce, přičemž R^3 je H. Výhodná je tedy substituce primární hydroxylové skupiny v pozici 6 glukosaminové části HA.

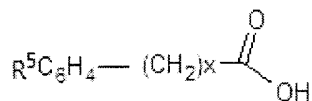
Dalším provedením vynálezu je derivát kyseliny hyaluronové obecného vzorce I výše, který je ve formě soli, kde R^1 je vybrán ze skupiny obsahující některý z iontů alkalických kovů nebo iontů kovů alkalických zemin, s výhodou Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} nebo Li^+ .

Ještě dalším provedením vynálezu je derivát kyseliny hyaluronové nebo jeho sůl obecného vzorce I výše, kde množství $-\text{CO}(\text{CH}_2)_x\text{C}_6\text{H}_4-pR^5$ nebo $-\text{CO}-\text{C}_6\text{H}_4-p\text{O}(\text{CH}_2)_y\text{CH}_3$, nebo $-\text{CO}-(\text{CH}_2)_z\text{NC}_{12}\text{H}_8$ v hydrofobizovaném esterovém derivátu HA obecného vzorce I je od 0,1 do 50% na 100 dimerů hyaluronové kyseliny nebo její soli, s výhodou 2 až 18 %, výhodněji 8 až 15 %. Deriváty HA podle vynálezu s tímto stupněm substituce vykazují výbornou rozpustnost ve vodě. Chemická struktura je ukázána na Obr. 1 až 5.

Hydrofobizované esterové deriváty kyseliny hyaluronové nebo jejich soli podle vynálezu jsou vůči buňkám necytotoxické a to ani při delším působení, jak je i doloženo v příkladech a na Obr. 6, 7 a 8 dále. Další výhodou hydrofobizovaných esterových derivátů HA nebo jejich solí podle vynálezu je, že si zachovávají i po modifikaci HA volné karboxylové skupiny, které jsou zodpovědné za rozpoznání vazebných míst pro HA receptory. Tím, že si zachovávají biologické vlastnosti, jsou s výhodou použitelné jako nanomicelární polymerní nosiče biologicky aktivních hydrofobních látek ve vodném prostředí pro cílení léčivé látky do požadovaných míst, protože mohou být například rozpoznávány CD44 receptory, které jsou přítomny u řady nádorů.

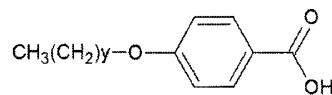
Hydrofobizované deriváty HA podle vynálezu kombinují vlastnosti tohoto polysacharidu a biokompatibilních substituentů. Polymerní nosiče z nich vzniklé mohou rozšířit terapeutické aplikace na trhu.

Dalším provedením vynálezu je způsob syntézy derivátu HA obecného vzorce I podle vynálezu, jehož podstata spočívá v tom, že aromatická kyselina obecného vzorce II nebo obecného vzorce III nebo obecného vzorce IV

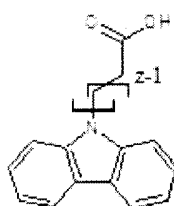


(II),

nebo



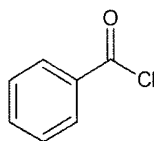
(III), nebo



(IV),

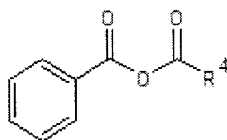
kde R^5 , x , y a z jsou, jak definovány výše,

je aktivována pomocí benzoylchloridu vzorce V



(V),

v přítomnosti organické báze, s výhodou v přítomnosti terciálního aminu, výhodněji *N,N*-diisopropylethylaminu (DIPEA); směsi vody a vodou mísitelného polárního nebo nepolárního rozpouštědla za vzniku reaktivního anhydridu obecného vzorce VI,



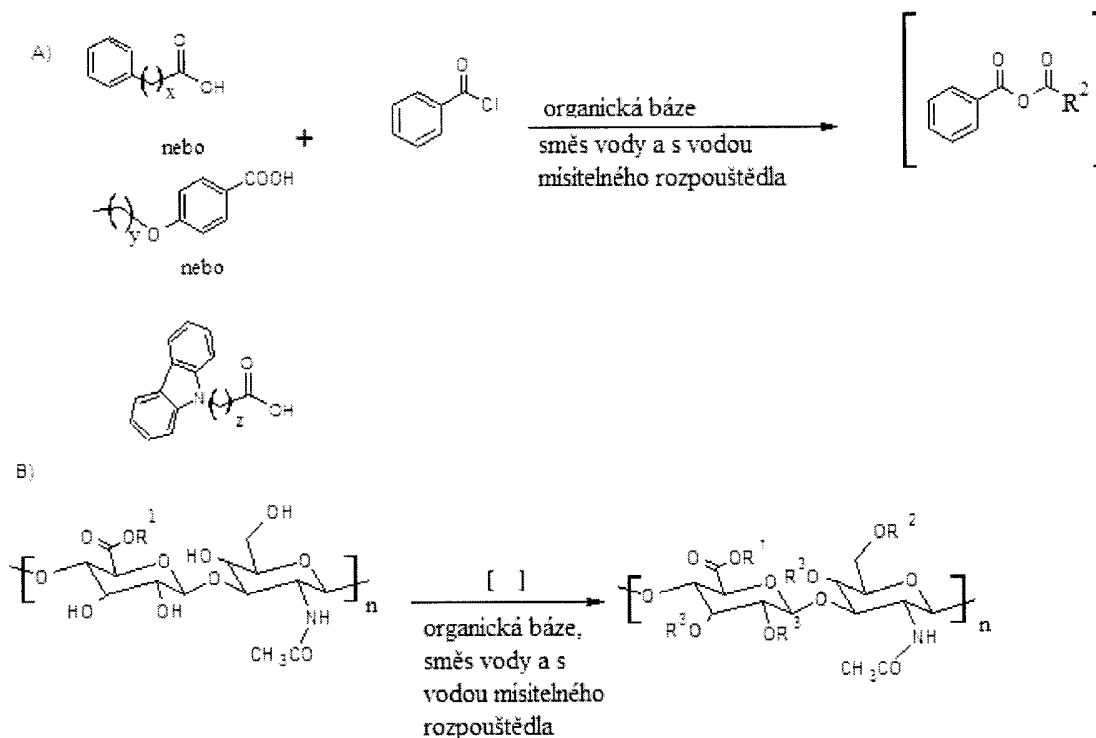
(VI),

kde R^4 je $-(CH_2)_x C_6H_4-pR^5$, nebo $-C_6H_4-pO(CH_2)_yCH_3$, nebo $-(CH_2)_zNC_{12}H_8$, kde R^5 , x , y a z jsou, jak definovány výše,

který reaguje s kyselinou hyaluronovou nebo její soli v přítomnosti organické báze, s výhodou v přítomnosti terciálního aminu vybraného ze skupiny obsahující triethylamin (TEA), *N,N*-diisopropylethylaminu (DIPEA) nebo 1,4-diazabicyklo[2.2.2]oktanu (DABCO); s výhodou *N,N*-diisopropylethylaminu (DIPEA), výhodněji triethylamin (TEA), směsi vody a vodou mísitelného polárního rozpouštědla.

Aktivace aromatické nebo heteroaromatické kyseliny benzoylchloridem (A) s následnou aplikací na esterifikaci kyseliny hyaluronové nebo její soli je znázorněno na schématu 1 (B) níže:

Schéma 1



R^1, R^2, R^3 jsou, jak definováno výše.

S výhodou se aktivace aromatické kyseliny obecného vzorce II nebo III nebo IV se provádí po dobu 5 až 120 minut při teplotě v rozmezí od $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ do $40\text{ }^{\circ}\text{C}$, s výhodou po dobu 30 minut od $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ do $25\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Podle výhodného provedení způsobu podle vynálezu je množství reaktivního anhydridu obecného vzorce V výše, kde R^4 je $-(\text{CH}_2)_x-\text{C}_6\text{H}_4-p\text{R}^5$ nebo $-(\text{CH}_2)_z\text{NC}_{12}\text{H}_8$, přičemž R^5 a x nebo z jsou, jak definováno výše, odpovídá 0,01 až 3 ekvivalentům, s výhodou 0,5 až 1 ekvivalentům, výhodněji 0,7 ekvivalentů na dimer kyseliny hyaluronové nebo její soli.

Podle dalšího výhodného provedení způsobu podle vynálezu je množství reaktivního anhydridu obecného vzorce V, kde R^4 je $-\text{C}_6\text{H}_4-\text{O}(\text{CH}_2)_y\text{CH}_3$, přičemž y je jak definováno výše, odpovídá 0,01 až 3 ekvivalentům, s výhodou 1,5 až 2,5 ekvivalentům, výhodněji 2,0 ekvivalentů na dimer kyseliny hyaluronové nebo její soli.

Podle ještě dalšího výhodného provedení způsobu podle vynálezu tvorba hydrofobizovaného esterového derivátu kyseliny hyaluronové nebo jeho soli je prováděna po

dobu 1 až 48 hodin při teplotě v rozsahu od 0 do 60 °C, s výhodou 2 až 20 hodin při 25 °C, výhodněji 2 hodiny při 25°C.

Výhodou způsobu přípravy derivátů HA podle tohoto vynálezu je jeho jednoduchost, použití účinných reakčních činidel, která nezpůsobují vedlejší reakce. Nepoužívají se ani toxická rozpouštědla nebo karcinogenní látky. Také reakční časy jsou krátké a reakční podmínky mírné, proto nedochází k degradaci řetězce HA.

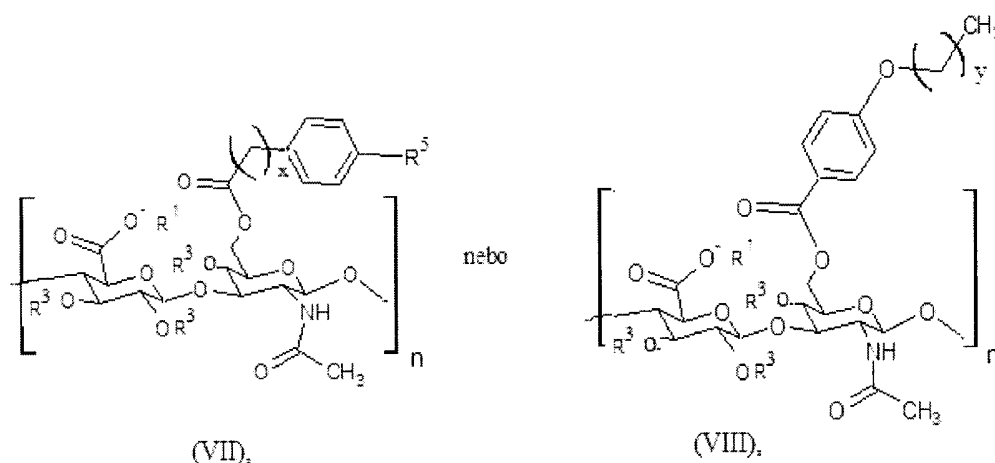
Aktivace karboxylové skupiny alkylového řetězce s aromatickým substituentem v příkladech probíhá ve směsi voda a s vodou mísitelném protickém nebo aprotickém polárním rozpouštědle, například propan-2-olu (IPA), dimethylsulfoxidu (DMSO) nebo tetrahydrofuranu (THF), s výhodou propan-2-olu. Obsah rozpouštědla je v rozsahu 45 až 55 obj.%, a obsah vody v roztoku je v rozsahu 45 až 55 obj.%. V roztoku je množství HA pro chemickou modifikaci v rozsahu 1 až 5 hmot.% s výhodou 2,5 hmot.%.

Aktivace aromatické nebo heteroaromatické kyseliny probíhá po 0,5 do 6 h s výhodou 3 hod. 15 min při 0 °C až 60 °C, výhodněji při 10 °C pro 11-(4-methylfenyl)undekanovou kyselinu a deriváty kyseliny 3-alkyl-hydroxybenzoové.

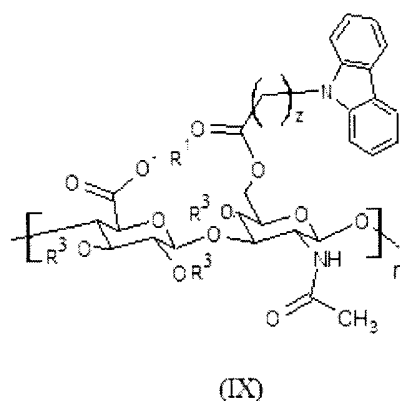
Vhodná molekulová hmotnost kyseliny hyaluronové pro danou reakci je v rozmezí 6×10^3 až $2,50 \times 10^5$ g/mol, s výhodou $1,5 \times 10^4$ až $1,9 \times 10^5$ g/mol nebo 495 dimers. Jiná molekulová hmotnost nebo HA sůl není pro reakci překážkou. Výhodou způsobu podle vynálezu oproti známým chemickým modifikacím kyseliny hyaluronové je velmi malá degradace polysacharidu vzhledem k mírným reakčním podmínkám.

Esterifikace hyaluronanu je dále uskutečněna přidáním organické báze, jako je terciární amin vybraný ze skupiny obsahující *N,N'*-diisopropylethylamin (DIPEA), 1,4-diazabicyklo[2.2.2]oktan (DABCO) nebo triethylamin (TEA), s výhodou DIPEA. Esterifikace fungují s 0,01 až 6 ekvivalenty báze, výhodněji 4,0 ekvivalenty. Bližším studiem reakce bylo zjištěno, že stupeň substituce je závislý na ekvivalentním množství aktivovaného alkylového řetězce s arylovým nebo heteroarylovým substituentem. Chemické modifikace kyseliny hyaluronové fungují s 0,01 až 3 ekvivalenty aktivované aromatické nebo heteroaromatické kyseliny, výhodněji 0,7 do 1,5 ekvivalentu na dimer hyaluronanu.

Pro názornost jsou zde uvedeny hydrofobizované esterové deriváty HA mající alespoň jeden alkylarylový nebo alkylheteroarylový substituent obecných vzorců VII, VIII a IX, kde R^1 , R^3 , R^5 , x, y a z jsou, jak definovány výše.



nebo



Ještě dalším provedením vynálezu jsou nanomicelární kompozice na bázi hydrofobizovaného esterového derivátu kyseliny hyaluronové nebo jeho soli podle obecného vzorce (I), jak je definován výše, přičemž obsahuje nanomicely, které obsahují hydrofobní jádro tvořené $-\text{CO}(\text{CH}_2)_x\text{C}_6\text{H}_4-p\text{R}^5$ nebo $-\text{COC}_6\text{H}_4-p\text{O}(\text{CH}_2)_y\text{CH}_3$ nebo $-(\text{CH}_2)_z\text{NC}_{12}\text{H}_8$ skupinami, kde x je celé číslo v rozmezí 4 až 21, s výhodou 4 až 15 a R^5 je H nebo CH_3 , nebo y je celé číslo v rozmezí 8 až 21, s výhodou 8 až 15, nebo z je celé číslo v rozmezí 3 až 16, s výhodou 7 až 11, nejlépe 10, navázanými na kyselinu hyaluronovou a hydrofilní obal tvořený hydrofilními funkčními skupinami kyseliny hyaluronové a jednu nebo více biologicky aktivních aromatických látek fyzikálně vázaných v nanomicele.

Dalším výhodným provedením nanomicelární kompozice podle vynálezu je kompozice obsahující 0,3 až 8,0 hmotn. %, s výhodou 2,5 až 8,0 hmotn. %, výhodněji 5,0 až 8,0 hmotn. % biologicky aktivních aromatických látek vzhledem k hmotnostnímu obsahu hydrofobizovaného esterového derivátu kyseliny hyaluronové nebo jeho soli, přičemž

biologicky aktivní aromatická látka je vybrána ze skupiny zahrnující farmaceuticky a kosmeticky aktivní látky, zejména vitamíny, léčiva, s výhodou cytostatika, steroidy, dále fytoextrakty, fytokomplexy nebo fytoaktivní látky apod.

S výhodou se jedná o resveratrol, koenzym Q10, retinyl palmitát. Nanomicelární kompozice podle vynálezu se použijí pro farmaceutické a kosmetické aplikace.

Ještě dalším výhodným provedením vynálezu je nanomicelární kompozice, která obsahuje vyšší koncentraci hydrofobizovaného esterového derivátu kyseliny hyaluronové než je jeho kritická agregační koncentrace. Jeho koncentrace v kompozici podle vynálezu ve vodném roztoku je v rozmezí $0,003 \text{ mg.ml}^{-1}$ až 20 mg.ml^{-1} , s výhodou 1 až 10 mg.ml^{-1} . Nanomicely obsahující hydrofobizované esterové deriváty kyseliny hyaluronové podle vynálezu zůstávají i při koncentraci $0,003 \text{ mg.ml}^{-1}$ ve vodném roztoku intaktní, tedy neagregují se.

Ještě dalším provedením vynálezu je způsob přípravy nanomicelární kompozice, který spočívá v tom, že se hydrofobizovaný esterový derivát kyseliny hyaluronové nebo jeho sůl podle obecného vzorce (I) rozpustí ve vodě a biologicky aktivní aromatická látka se rozpustí v organickém rozpouštědle vybraném ze skupiny obsahující trichlormethan, methanol nebo propan-2-ol, přičemž oba roztoky se smíchají, poté se organické rozpouštědlo odstraní. Organické rozpouštědlo se s výhodou odstraní vakuovou evaporací, následně se vodná fáze rehydratuje, získané nanomicelární útvary se zfiltrují a nakonec lyofilizují.

Hydrofobizované esterové deriváty HA podle vynálezu, například deriváty 11-(4-methylfenyl)undekanoyl hyaluronátu (UNFEHA) (viz Příklady 39,42,49) nebo 4-oktyloxybenzoyl hyaluronátu (OBEHA) (viz Příklady 43, 44), vykazují až dvakrát vyšší enkapsulaci aktivní látky (Obr. 9), ve srovnání s deriváty s alifatickým řetězcem HA-C18:1 (viz Příklady 45,46 a 50), HA-C16 (viz Příklad 47) nebo HA-C6 (viz Příklad 48), které jsou uvedeny v dokumentu WO2014082609. Hydrodynamická velikost (cca 40 až 200 nm, Obr. 10) a rozpustnost vzniklých agregátů ve vodném nebo fyziologickém prostředí je vhodná pro topickou i parenterální aplikaci nosičů loadovaných aktivními látkami. Nosiče jsou necytotoxické a mohou podporovat aktivitu vázané látky. Stabilita nosičů v přítomnosti bílkovin krevního séra se s výhodou zvyšuje s délkou substituentu (Obr. 11).

Deriváty HA s alkylarylovými nebo alkylheteroarylovými substituenty podle vynálezu mohou enkapsulovat biologicky aktivní aromatické látky, léčiva a další komponenty, přičemž biologicky aktivní aromatická látka je vybrána ze skupiny zahrnující farmaceuticky a

kosmeticky aktivní látky, s výhodou vitamíny, léčiva s výhodou cytostatika, steroidy, dále fytoextrakty, fytokomplexy nebo fytoaktivní látky apod.

Definice pojmů:

Část substituentu „C₆H₄p-“, znamená fenylový zbytek nebo Ph, přičemž části substituentu jsou k němu navázány v pozici para.

Část substituentu „NC₁₂H₈“ znamená karbazylový zbytek, který je ke zbytku substituentu navázán před heteroatom N.

Termín „aktivovaná kyselina“ je produkt reakce mezi benzoylchloridem a substituovanou kyselinou benzoovou nebo feny(tolyl)alkylovou kyselinou, anebo směsného anhydridu kyseliny benzoové a kyseliny feny-alkylové, kyseliny alkyl-oxo-benzoové nebo karbazol N-alkylové kyseliny.

Termín „organická báze“ je alifatický amin, s výhodou terciální amin mající rozvětvenou, nasycenou nebo nenasyčenou, substituovanou nebo nesubstituovanou C₃-C₃₀ alkylovou skupinu.

Termín „kritická agregační koncentrace“ (CAC) je koncentrace polymeru, při níž se v roztoku polymeru začínají tvořit hydrofobní domény agregací nepolárních funkčních skupin. Pod touto koncentrací jsou jednotlivé polymerní řetězce v systému ve formě neagregovaných řetězců.

Termín „laboratorní teplota“ odpovídá 20 až 25°C.

Termín „biologicky aktivní aromatická látka“ znamená látku, která vykazuje biologickou aktivitu při kosmetické nebo farmaceutické aplikaci a obsahuje delokalizovaný systém π elektronů v planární molekule.

Stupeň substituce (SS) znamená (průměrný) počet substituentů –CO(CH₂)_x C₆H₄-p-CH₃, nebo –COC₆H₄-pO(CH₂)_yCH₃ nebo CO-(CH₂)_zNC₁₂H₈ na 100 dimerů HA nebo její soli.

Polymerní nanomicely jsou agregáty koloidních rozměrů tvořené polymerními řetězci amfifilních polymerů ve vodném prostředí, kdy jádro micely tvoří nepolární funkční skupiny polymeru, zatímco obal micely tvoří polární část polymeru.

Ekvivalent (ekv) se vztahuje na dimer kyseliny hyaluronové, není-li uvedeno jinak. Procenta se uvádějí jako hmotnostní procenta, pokud není uvedeno jinak.

Přehled obrázků na výkresech

Obr. 1. HSQC 6-fenylhexanoyl hyaluronátu

Obr. 2. DOSY 8- fenyloktanoyl hyaluronátu

Obr. 3. ^1H NMR 11-(4-methylfenyl)undekanoyl hyaluronátu (UNFEHA)

Obr. 4. HSQC 11-(4-methylfenyl)undekanoyl hyaluronátu (UNFEHA)

Obr. 5. ^1H NMR 4-oktyloxybenzoyl hyaluronátu (OBEHA)

Obr.6. Vliv 4-fenylbutanoyl derivátu kyseliny hyaluronové na viabilitu Swiss 3T3 buněčné linie

Obr. 7. Vliv 11-(4-methylfenyl)undekanoyl derivátu kyseliny hyaluronové na viabilitu Swiss 3T3 buněčné linie

Obr. 8. Vliv 4-oktyloxybenzoyl derivátu (OBEHA) kyseliny hyaluronové na viabilitu Swiss 3T3 buněčné linie

Obr. 9. Porovnání UV/Vis spekter stanovení resveratrolu v $\text{HA-O-CO}(\text{CH})_{10}\text{C}_6\text{H}_4\text{-}p\text{-CH}_3$ (UNFEHA) a derivátu HA-C18:1 podle WO2014082609.

Obr. 10. DLS analýza a SEM s polymerními micelami z derivátu UNFEHA. Enkapsulován je resveratrol.

Obr. 11. Grafický výsledek stability micel tvořených jednotlivě deriváty kyseliny hyaluronové nebo jejich solemi podle obecného vzorce I, kde $\text{HA-O-CO}(\text{CH})_x\text{C}_6\text{H}_4\text{-}p\text{-CH}_3$ a $x=3, 5, 7$ a 10 v roztoku bovinního sérového albuminu (v koncentraci 40 mg/ml).

Literatura

1. Schanté CE, Zuber G, Herlin C, Vandamme TF. Chemical modifications of hyaluronic acid for the synthesis of derivatives for a broad range of biomedical applications. *Carbohydrate Polymers* 2011;85(3):469-489.
2. Larrivee-Aboussafy C, Jones BP, Price KE, Hardink MA, McLaughlin RW, Lillie BM, et al. DBU Catalysis of N,N'-Carbonyldiimidazole-Mediated Amidations. *Org Lett* 2010;12(2):324-327.
3. Morton RC, Mangroo D, Gerber GE. A novel method of complete activation by carbonyldiimidazole: application to ester synthesis. *Canadian Journal of Chemistry* 1988 2015/07/15;66(7):1701-1705.
4. Jiang G, Park K, Kim J, Kim KS, Hahn SK. Target Specific Intracellular Delivery of siRNA/PEI-HA Complex by Receptor Mediated Endocytosis. *Mol Pharm* 2009;6(3):727-737.
5. Wang C, Yan Q, Liu H-B, Zhou X-H, Xiao S-J. Different EDC/NHS Activation Mechanisms between PAA and PMAA Brushes and the Following Amidation Reactions. *Langmuir* 2011;27(19):12058-12068.
6. D'Este M, Eglín D, Alini M. A systematic analysis of DMTMM vs EDC/NHS for ligation of amines to hyaluronan in water. *Carbohydr Polym* 2014 Aug 8;108:239-246.
7. Šmejkalová D, Hermannová M, Buffa R, Čožiková D, Višejnová L, Matulková Z, et al. Structural characterization and biological properties of degradation byproducts from hyaluronan after acid hydrolysis. *Carbohydrate Polymers* 2012;88(4):1425-1434.
8. Wang YM, Ikeda A, Hori N, Takemura A, Ono H, Yamada T, et al. N,N-dicyclohexylcarbodiimide assisted synthesis and characterization of poly(vinyl alcohol-co-vinyl levulinate). *Polymer* 2005;46(23):9793-9802.
9. Huang P, Yang C, Liu J, Wang W, Guo S, Li J, et al. Improving the oral delivery efficiency of anticancer drugs by chitosan coated polycaprolactone-grafted hyaluronic acid nanoparticles. *Journal of Materials Chemistry B* 2014;2(25):4021-4033.
10. Jang E, Lim E-K, Choi Y, Kim E, Kim H-O, Kim D-J, et al. pi-Hyaluronan nanocarriers for CD44-targeted and pH-boosted aromatic drug delivery. *Journal of Materials Chemistry B* 2014;1(41):5686-5693.
11. Choi KY, Saravanakumar G, Park JH, Park K. Hyaluronic acid-based nanocarriers for intracellular targeting: interfacial interactions with proteins in cancer. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2012 Nov 1;99:82-94.
12. Lim E-K, Kim H-O, Jang E, Park J, Lee K, Suh J-S, et al. Hyaluronan-modified magnetic nanoclusters for detection of CD44-overexpressing breast cancer by MR imaging. *Biomaterials* 2011;32(31):7941-7950.
13. Lai Y, Lei Y, Xu X, Li Y, He B, Gu Z. Polymeric micelles with [small pi]-[small pi] conjugated cinnamic acid as lipophilic moieties for doxorubicin delivery. *Journal of Materials Chemistry B* 2013;1(34):4289-4296.
14. Sosnik A, Menaker Raskin M. 2015Polymeric micelles in mucosal drug delivery: Challenges towards clinical translation. *Biotechnol Adv* Jan 15.
15. Calce E, Ringhieri P, Mercurio FA, Leone M, Bugatti V, Saviano M, et al. A biocompatible process to prepare hyaluronan-based material able to self-assemble into stable nano-particles. *RSC Advances* 2015;5(37):29573-29576.
16. Novoa-Carballal R, Muller AHE. Synthesis of polysaccharide-b-PEG block copolymers by oxime click. *Chem Commun* 2012;48(31):3781-3783.
17. Novoa-Carballal R, Silva C, Moller S, Schnabelrauch M, Reis RL, Pashkuleva I. Tunable nano-carriers from clicked glycosaminoglycan block copolymers. *Journal of Materials Chemistry B* 2014;2(26):4177-4184.
18. Xu P, Tang H, Li S, Ren J, Van Kirk E, Murdoch WJ, et al. Enhanced Stability of Core-Surface Cross-Linked Micelles Fabricated from Amphiphilic Brush Copolymers. *Biomacromolecules* 2004;5(5):1736-1744.

19. Danquah M, Fujiwara T, Mahato RI. Self-assembling methoxypoly(ethylene glycol)-b-poly(carbonate-co-L-lactide) block copolymers for drug delivery. *Biomaterials* 2010 Mar;31(8):2358-2370.
20. Watanabe M, Kawano K, Yokoyama M, Opanasopit P, Okano T, Maitani Y. Preparation of camptothecin-loaded polymeric micelles and evaluation of their incorporation and circulation stability. *Int J Pharm* 2006 Feb 3;308(1-2):183-189.
21. Jones M-C, Leroux J-C. Polymeric micelles: a new generation of colloidal drug carriers. *Eur J Pharm Biopharm* 1999;48(2):101-111.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1: Syntéza 4-fenylbutanoyl derivátu kyseliny hyaluronové pomocí báze DIPEA

0,5064 g (1,25 mmol, 6×10^3 g/mol) hyaluronanu sodného bylo rozpuštěno v 8 ml demineralizované vody. Po úplném rozpuštění HA bylo k roztoku přidáno 0,435 ml (DIPEA; 2,5 mmol, 2 ekv. dimeru HA), absolutní propan-2-ol (4 ml) a 2 mg (0,0125 mmol) 4-dimethylaminopyridinu (DMAP) (0,01 ekv.). Zároveň byla rozpuštěna 0,4105 g 4- kyselina fenylbutanová (2,5 mmol, 2 ekv) v absolutním propan-2-olu (4 ml), poté byla do roztoku přidána báze 0,435 ml (DIPEA; 2 ekv) a 0,29 ml benzoylchloridu (2,5 mmol, 2 ekv). Po přidavku benzoylchloridu byla reakční směs míchána právě 30 min za laboratorní teploty. Směsný anhydrid kyseliny benzoové a kyseliny 4-fenyl-butanové (2 ekv) byl přidán k roztoku hyaluronanu. Reakce probíhala při laboratorní teplotě po dobu 2 hod.. Poté bylo k reakční směsi přidáno 100 ml absolutního propan-2-olu a nasycený roztok NaCl (cca 0,5 ml), aby došlo k vysrážení produktu. Tato směs byla ponechána dekantovat. Po dekantaci byla většina tekutiny slita a sraženina byla promyta vodným roztokem propan-2-olu (85% obj., 4 x 25 ml), a poté absolutním propan-2-olem (4 x 25 ml) pro odstranění vody. Sraženina byla sušena 15 hod. při 40 °C.

^1H NMR (D_2O) signály acylu: δ 1,9 ppm (bs, 2H, CH_2), δ 2,35 – 2,5 ppm (bs, 2H, CH_2), δ 2,6 – 2,73 ppm (bs, 2H, CH_2), δ 7,1 – 8,2 ppm (m, 5H, C_6H_5). Signály HA: δ 2,1 ppm (s, 3H, NHCH_3), (m, 10H, skeletal HA), δ 4,5 ppm (d, 2H, diasterotopicky, HA)

SS 34 % (^1H NMR)

Příklad 2: Syntéza 4-fenylbutanoyl derivátu kyseliny hyaluronové pomocí báze DABCO

0,507 g (1,25 mmol, 6×10^3 g/mol) hyaluronanu sodného bylo rozpuštěno v 8 ml demineralizované vody. Po úplném rozpuštění HA bylo k roztoku přidáno 0,28 g (2,5 mmol, 2 ekv dimeru HA) 1,4-diazabicyklo[2.2.2]oktanu (DABCO); absolutní propan-2-ol (4 ml) a 2 mg

4-dimethylaminopyridinu (DMAP) (0,0125 mmol, 0,01 ekv.). Zároveň byla rozpuštěna 0,4105 g kyselina 4-fenylbutanová (2,5 mmol, 2 ekv.) v absolutním propan-2-olu (4 ml), poté bylo do roztoku přidáno 0,28 g (2,5 mmol) 1,4-diazabicyklo[2.2.2]oktanu (DABCO; 2 ekv) a 0,29 ml benzoylchloridu (2,5 mmol, 2 ekv). Po přidavku benzoylchloridu byla reakční směs míchána právě 30 min. za laboratorní teploty. Takto aktivovaná kyselina 4-fenylbutanová (2 ekv) byla přidána k roztoku hyaluronanu. Reakce probíhala při 25°C, po dobu 2 hod. Poté bylo k reakční směsi přidáno 100 ml absolutního propan-2-olu a nasycený roztok NaCl (cca 0,5 ml), aby došlo k vysrážení produktu. Tato směs byla nechána dekantovat. Po dekantaci byla většina tekutiny slita a sraženina byla promyta vodným roztokem propan-2-olu (85% obj., 4 x 25 ml), a poté absolutním propan-2-olem (4 x 25 ml) pro odstranění vody. Sraženina byla sušena 15 hod. při 40 °C.

¹H NMR (D₂O) signály acylu: δ 1,9 ppm (bs, 2H, CH₂), δ 2,35 – 2,5 ppm (bs, 2H, CH₂), δ 2,6 – 2,73 ppm (bs, 2H, CH₂), δ 7,1 – 8,2 ppm (m, 5H, C₆H₅). Signály HA: δ 2,1 ppm (s, 3H, NHCH₃), (m, 10H, skeletal HA), δ 4,5 ppm (d, 2H, diasterotopicky, HA)

SS 2% (¹H NMR)

Příklad 3: Syntéza 4-fenylbutanoyl derivátu kyseliny hyaluronové pomocí báze TEA

0,50 g (1,25 mmol, 18×10^4 g/mol) hyaluronanu sodného bylo rozpuštěno v 8 ml demineralizované vody. Po úplném rozpuštění byla přidána 0,35 ml triethylamin (TEA, 3,75 mmol nebo 3,0 ekv.), absolutní propan-2-ol (6 ml) a 0,0015 g 4-dimethylaminopyridinu (DMAP, 0,0125 mmol, 0,01 ekv.). Zároveň byla rozpuštěna kyselina 4-fenylbutyrová (0,3 g, 1,8 mmol, 1,5 ekv.) v absolutním propan-2-olu (4 ml), poté byly do roztoku přidány (TEA, 3,75 mmol nebo 3,0 ekv.) a 0,22 ml benzoylchloridu (1,8 mmol, 1,5 ekv.). Po přidavku benzoylchloridu byla reakční směs míchána právě 30 min. za laboratorní teploty. Takto aktivovaná 4-fenylbutyrová kyselina (1,5 ekv) byla přidána k roztoku hyaluronanu. Reakce probíhala při laboratorní teplotě 2 hod. Poté bylo k reakční směsi přidáno 100 ml absolutního propan-2-olu a nasycený roztok NaCl (cca 0,5 ml), k vysrážení produktu. Tato směs byla ponechána dekantovat. Po dekantaci byla většina tekutiny slita a sraženina byla promyta vodným roztokem propan-2-olu (85% obj., 4 x 25 ml), a poté absolutním propan-2-olem (4 x 25 ml) pro odstranění vody. Sraženina byla sušena 15 hod. při 40 °C.

^1H NMR (D_2O) signály acylu: δ 1,9 ppm (bs, 2H, CH_2), δ 2,35 – 2,5 ppm (bs, 2H, CH_2), δ 2,6 – 2,73 ppm (bs, 2H, CH_2), δ 7,1 – 8,2 ppm (m, 5H, C_6H_5). Signály HA: δ 2,1 ppm (s, 3H, NHCH_3), (m, 10H, skeletal HA), δ 4,5 ppm (d, 2H, diasterotopicky, HA)

SS 43 % (^1H NMR)

Příklad 4: Syntéza 4-fenylbutanoyl derivátu kyseliny hyaluronové pomocí báze TEA

0,501 g (1,25 mmol, $1,8 \times 10^4$ g/mol) hyaluronanu sodného bylo rozpuštěno v 8 ml demineralizované vody. Po úplném rozpuštění byl přidán izopropanol (4 ml), 0,29 ml triethylaminu (TEA, 2,5 mmol, 2 ekv) a 0,0015 g dimethylaminopyridinu (DMAP, 0,0125 mmol, 0,01 ekv). Zároveň byla rozpuštěna kyselina 4-fenylmásečná (0,4105 g, 2,5 mmol, 2 ekv) v izopropanolu (4 ml), poté byly do roztoku přidány TEA (0,29 ml, 2,5 mmol, 2 ekv) a benzoylchlorid (2,5 mmol, 2,0 ekv). Po přidavku benzoylchloridu byla reakční směs míchána právě 30 min za laboratorní teploty. Takto aktivovaná kyselina 4-fenylmásečná (2 ekv.) byla přidána k roztoku hyaluronanu a reakce probíhala při laboratorní teplotě 2 h. Poté bylo k reakční směsi přidáno 100 ml absolutního isopropanolu a nasycený roztok NaCl (cca 0,5 ml), aby došlo k vysrážení produktu. Tato směs byla nechána dekantovat. Po dekantaci byla většina tekutiny slita a sraženina byla promyta vodným roztokem isopropanolu (85% obj., 4 x 25 ml) a poté absolutním isopropanolem (4 x 25 ml) pro odstranění vody. Sraženina byla sušena 15 h při 40 °C.

SS 29 % (^1H NMR).

^1H NMR (D_2O) signály acylu: δ 1,9 ppm (bs, 2H, CH_2), δ 2,35 – 2,5 ppm (bs, 2H, CH_2), δ 2,6 – 2,73 ppm (bs, 2H, CH_2), δ 7,1 – 8,2 ppm (m, 5H, C_6H_5).

Příklad 5: Syntéza 4-fenylbutanoyl derivátu kyseliny hyaluronové pomocí báze TEA

0,5040 g (1,25 mmol, $1,8 \times 10^4$ g/mol) hyaluronanu sodného bylo rozpuštěno v 8 ml demineralizované vody. Po úplném rozpuštění byly přidány izopropanol (4 ml), 0,35 ml triethylaminu (TEA, 2,5 mmol, 2 ekv) a 0,0015 g dimethylaminopyridinu (DMAP, 0,0125 mmol, 0,01 ekv). Zároveň byla rozpuštěna kyselina 4-fenylmásečná (0,532 g, 3,15 mmol, 2,5 ekv) v izopropanolu (4 ml), poté byly do roztoku přidány TEA (0,35 ml, 2,5 mmol, 2 ekv) a benzoylchlorid (3,12 mmol, 2,5 ekv). Po přidavku benzoylchloridu byla reakční směs míchána právě 30 min za laboratorní teploty. Takto aktivovaná kyselina 4-fenylmásečná (2,5 ekv.) byla

přidána k roztoku hyaluronanu a reakce probíhala při laboratorní teplotě 2 h. Poté bylo k reakční směsi přidáno 100 ml absolutního isopropanolu a nasycený roztok NaCl (cca 0,5 ml), aby došlo k vysrážení produktu. Tato směs byla ponechána dekantovat. Po dekantaci byla většina tekutiny slita a sraženina byla promyta vodným roztokem isopropanolu (85% obj., 4 x 25 ml) a poté absolutním isopropanolem (4 x 25 ml) pro odstranění vody. Sraženina byla sušena 15 h při 40 °C.

SS 20 % (^1H NMR).

^1H NMR (D_2O) signály acylu: δ 1,9 ppm (bs, 2H, CH_2), δ 2,35 – 2,5 ppm (bs, 2H, CH_2), δ 2,6 – 2,73 ppm (bs, 2H, CH_2), δ 7,1 – 8,2 ppm (m, 5H, C_6H_5).

Příklad 6: Syntéza 6-fenylhexanoyl derivátu kyseliny hyaluronové pomocí báze DIPEA

0,503 g (1,25 mmol, $1,5 \times 10^4$ g/mol) hyaluronanu sodného bylo rozpuštěno v 8 ml demineralizované vody. Po úplném rozpuštění byla přidána báze 0,5 ml (DIPEA, 2,5 mmol, 2,0 ekv.), absolutní propan-2-ol (4 ml) a 0,0015 g 4-dimethylaminopyridinu (DMAP, 0,0125 mmol, 0,01 ekv.). Zároveň byla rozpuštěna 0,16 g kyselina 6-fenylhexanová (0,87 mmol, 0,7 ekv.) v absolutním propan-2-olu (4 ml), poté byly do roztoku přidány 0,5 ml DIPEA (2,5 mmol, 2,0 ekv.) a 0,29 ml benzoylchlorid (0,87 mmol, 0,7 ekv.). Po přidavku benzoylchloridu byla reakční směs míchána právě 30 min. za laboratorní teploty. Takto aktivovaná 6- kyselina fenylhexanová (0,2 ekv) byla přidána k roztoku hyaluronanu. Reakce probíhala při laboratorní teplotě 2 hod. Poté bylo k reakční směsi přidáno 100 ml absolutního propan-2-olu a nasycený roztok NaCl (cca 0,5 ml), aby došlo k vysrážení produktu. Tato směs byla nechána dekantovat. Po dekantaci byla většina tekutiny slita a sraženina byla promyta vodným roztokem propan-2-olu (85% obj., 4 x 25 ml) a poté absolutním propan-2-olem (4 x 25 ml) pro odstranění vody. Sraženina byla sušena 15 hod. při 40 °C.

SS: 32 % (^1H NMR) HSQC je ukázáno v Obr. 1.

^1H NMR (D_2O) signály acylu: δ 1,2 – 1,4 ppm (bs, 2H, CH_2), δ 1,5 – 1,72 ppm (bs, 2H, CH_2), δ 2,25 – 2,5 ppm (bs, 4H, CH_2), δ 2,55 – 2,7 ppm (bs, 2H, CH_2), δ 7,1 – 8,2 ppm (m, 5H, C_6H_5).

Příklad 7: Syntéza 6-fenylhexanoyl derivátu kyseliny hyaluronové pomocí báze DIPEA

0,5 g (1,25 mmol, 6×10^3 g/mol) hyaluronanu sodného bylo rozpuštěno v 8 ml demineralizované vody. Po úplném rozpuštění byla přidána báze 0,44 ml (DIPEA, 2,5 mmol, 2 ekv.), absolutní propan-2-ol (4 ml) a 0,0015 mg 4-dimethylaminopyridinu (DMAP, 0,0125 mmol, 0,01 ekv.). Zároveň byla rozpuštěna kyselina 6-fenylhexanová (0,481 g, 2,5 mmol, 2 ekv.) v absolutním propan-2-olu (4 ml), poté byly do roztoku přidány 0,44 ml DIPEA (2,5 mmol, 2 ekv.) a 0,29 ml benzoylchloridu (2,5 mmol, 2 ekv.). Po přidavku benzoylchloridu byla reakční směs míchána právě 30 min. za laboratorní teploty. Takto aktivovaná 6- kyselina fenylhexanová (2,0 ekv.) byla přidána k roztoku hyaluronanu. Reakce probíhala při laboratorní teplotě 2 hod.. Poté bylo k reakční směsi přidáno 100 ml absolutního propan-2-olu a nasycený roztok NaCl (cca 0,5 ml), aby došlo k vysrážení produktu. Tato směs byla nechána dekantovat. Po dekantaci byla většina tekutiny slita a sraženina byla promyta vodným roztokem propan-2-olu (85% obj., 4 x 25 ml) a poté absolutním propan-2-olem (4 x 25 ml) pro odstranění vody. Sraženina byla sušena 15 hod. při 40 °C.

SS 52 % ($^1\text{H NMR}$)

$^1\text{H NMR}$ (D_2O) signály acylu: δ 1,2 – 1,4 ppm (bs, 2H, CH_2), δ 1,5 – 1,72 ppm (bs, 2H, CH_2), δ 2,25 – 2,5 ppm (bs, 4H, CH_2), δ 2,55 – 2,7 ppm (bs, 2H, CH_2), δ 7,1 – 8,2 ppm (m, 5H, C_6H_5).

Příklad 8: Syntéza 6-fenylhexanoyl derivátu kyseliny hyaluronové pomocí pomocí báze DIPEA

0,5 g (1,25 mmol, $1,5 \times 10^4$ g/mol) hyaluronanu sodného bylo rozpuštěno v 8 ml demineralizované vody. Po úplném rozpuštění byly přidány tetrahydrofuran (4 ml), *N,N*-diisopropylethylamin 0,44 ml (DIPEA, 2,5 mmol, 2 ekv) a 0,0015 g dimethylaminopyridinu (DMAP, 0,0125 mmol, 0,01 ekv). Zároveň byla rozpuštěna kyselina 6-fenylhexanová (0,4105 g, 2,5 mmol, 2 ekv.) v tetrahydrofuranu (4 ml), poté byly do roztoku přidány 0,44 ml DIPEA (2,5 mmol, 2 ekv.) a benzoylchlorid (2,5 mmol, 2 ekv.). Po přidavku benzoylchloridu byla reakční směs míchána právě 30 min za laboratorní teploty. Takto aktivovaná kyselina 6-fenylhexanová (2,0 ekv.) byla přidána k roztoku hyaluronanu. Reakce probíhala při laboratorní teplotě 2 h. Poté bylo k reakční směsi přidáno 100 ml absolutního isopropanolu a nasycený roztok NaCl (cca 0,5 ml), aby došlo k vysrážení produktu. Tato směs byla ponechána dekantovat. Po dekantaci byla většina tekutiny slita a sraženina byla promyta vodným roztokem isopropanolu (85% obj., 4 x 25 ml) a poté absolutním isopropanolem (4 x 25 ml) pro odstranění vody. Sraženina byla sušena 15 h při 40 °C.

SS 45 % (^1H NMR)

^1H NMR (D_2O) signály acylu: δ 1,2 – 1,4 ppm (bs, 2H, CH_2), δ 1,5 – 1,72 ppm (bs, 2H, CH_2), δ 2,25 – 2,5 ppm (bs, 4H, CH_2), δ 2,55 – 2,7 ppm (bs, 2H, CH_2), δ 7,1 – 8,2 ppm (m, 5H, C_6H_5).

Příklad 9: Syntéza 8-fenyloktanoyl derivátu kyseliny hyaluronové pomocí báze DIPEA

0,5 g (1,25 mmol, $1,5 \times 10^4$ g/mol) hyaluronanu sodného bylo rozpuštěno v 8 ml demineralizované vody. Po úplném rozpuštění byla přidána báze 0,43 ml (DIPEA, 2 ekv.), absolutní propan-2-ol (4 ml) a 0,0015 g 4-dimethylaminopyridinu (DMAP, 0,0125 mmol, 0,01 ekv.). Zároveň byla rozpuštěna kyselina 8-fenyloktanová (0,048 g, 0,25 mmol, 0,2 ekv.) v absolutním propan-2-olu (4 ml), poté byly do roztoku přidány DIPEA (0,2 ekv.) a 0,029 ml benzoylchloridu (0,25 mmol, 0,2 ekv.). Po přidavku benzoylchloridu byla reakční směs míchána právě 30 min za laboratorní teploty. Aktivovaná kyselina 8-fenyloktanová (0,2 ekv) byla přidána k roztoku hyaluronanu. Reakce probíhala 2 hod při laboratorní teplotě. Poté bylo k reakční směsi přidáno 100 ml absolutního propan-2-olu a nasycený roztok NaCl (cca 0,5 ml), aby došlo k vysrážení produktu. Tato směs byla nechána dekantovat. Po dekantaci byla většina tekutiny slita a sraženina byla promyta vodným roztokem propan-2-olu (85% obj., 4 x 25 ml) a poté absolutním propan-2-olem (4 x 25 ml) pro odstranění vody. Sraženina byla sušena 15 hod. při 40 °C.

SS 14 % (^1H NMR)

^1H NMR (D_2O) signály acylu: δ 1,2 – 1,4 ppm (bs, 6H, CH_2), 1,48 – 1,67 ppm (bs, 4H, CH_2), δ 2,25 – 2,48 ppm (bs, 2H, CH_2), δ 2,54 – 2,68 ppm (bs, 2H, CH_2), δ 7,1 – 8,1 ppm (m, 5H, C_6H_5).

Příklad 10: Syntéza 8-fenyloktanoyl derivátu kyseliny hyaluronové pomocí báze DIPEA

0,5 g (1,25 mmol, $1,5 \times 10^4$ g/mol) hyaluronanu sodného bylo rozpuštěno v 8 ml demineralizované vody. Po úplném rozpuštění byla přidána báze 0,43 ml (DIPEA, 2 ekv.), absolutní propan-2-ol (4 ml) a 0,0015 g 4-dimethylaminopyridinu (DMAP, 0,0125 mmol, 0,01 ekv.). Zároveň byla rozpuštěna kyselina 8-fenyloktanová (0,08 g, 0,25 mmol, 0,3 ekv.) v absolutním propan-2-olu (4 ml), poté byly do roztoku přidány DIPEA (0,43 ml, 2 ekv.) a 0,041 ml benzoylchloridu (0,37 mmol, 0,3 ekv.). Po přidavku benzoylchloridu byla reakční směs

míchána právě 30 min za laboratorní teploty. Aktivovaná kyselina 8-fenyloktanová (0.3 ekv) byla přidána k roztoku hyaluronanu. Reakce probíhala 2 hod při laboratorní teplotě. Poté bylo k reakční směsi přidáno 100 ml absolutního propan-2-olu a nasycený roztok NaCl (cca 0,5 ml), aby došlo k vysrážení produktu. Tato směs byla nechána dekantovat. Po dekantaci byla většina tekutiny slita a sraženina byla promyta vodným roztokem propan-2-olu (85% obj., 4 x 25 ml) a poté absolutním propan-2-olem (4 x 25 ml) pro odstranění vody. Sraženina byla sušena 15 hod. při 40 °C.

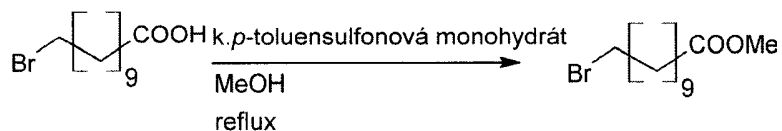
SS 11 % (^1H NMR) DOSY je ukázáno v Obr. 2.

^1H NMR (D_2O) signály acylu: δ 1,2 – 1,4 ppm (bs, 6H, CH_2), 1,48 – 1,67 ppm (bs, 4H, CH_2), δ 2,25 – 2,48 ppm (bs, 2H, CH_2), δ 2,54 – 2,68 ppm (bs, 2H, CH_2), δ 7,1 – 8,1 ppm (m, 5H, C_6H_5).

Příklad 11: Syntéza linkeru: kyseliny 11-(4-methylfenyl)undekanové

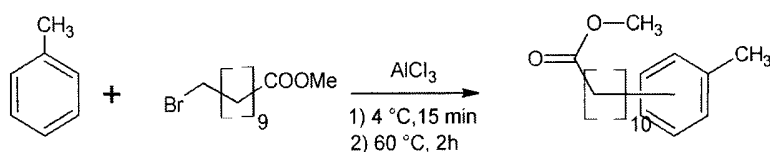
krok 1) protekce

Syntéza methyl-(11-bromundekanoátu): 7,173 g (37,71 mmol, 2 ekv.) monohydrátu kyseliny *p*-toluensulfonové bylo rozpuštěno v 20 ml methanolu. K tomuto roztoku bylo přidáno 5 g (18,86 mmol kyseliny) 11-bromundekanové. Výsledný roztok byl refluxován 5 hod.. Po ochlazení reakční směsi byl methanol odpařen na RVO, získaný olej byl naředěn vodou (20 ml) a extrahován diethyletherem (DEE) (3 x 20 ml). Spojené organické podíly byly extrahovány vodou (2 x 40 ml) a solankou (1 x 30 ml). Organická fáze byla sušena nad Na_2SO_4 a odpařena na RVO. Produktem byl žlutý olej. Výtěžek byl 94 %.



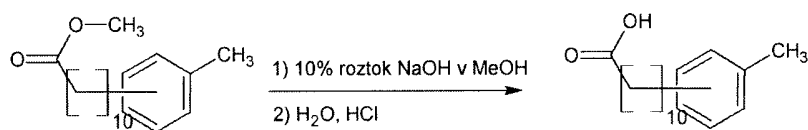
^1H NMR (CDCl_3): δ 1,25 – 1,34 ppm (m, 10H, CH_2), δ 1,42 ppm (kv, 2H, CH_2), δ 1,62 ppm (kv, 2H, CH_2), δ 1,85 ppm (kv, 2H, CH_2), δ 2,30 ppm (t, 2H, CH_2), δ 3,40 ppm (t, 2H, CH_2), δ 3,67 ppm (s, 3H, CH_3).

krok 2) Friedel-Craftsova alkylace: syntéza methyl-(11-(4-methylfenyl)undekanoátu): 2,4 g (18 mmol) bezvodého AlCl_3 bylo rozsuspensováno v 25 ml bezvodého toluenu a vzniklá suspenze byla vychlazena na 4 °C. Do míchané suspenze byl v pětiminutových intervalech ve třech dávkách přidán methyl-(11-bromundekanoát) (2,9 ml, 12 mmol). Směs byla zahřáta na 60 °C a při této teplotě byla míchána 2 hod. Po ochlazení byla reakční směs nalita na led. Vodná fáze byla extrahována diethyletherem (3 x 25 ml), spojené organické podíly byly extrahovány 10% vodným roztokem NaHCO_3 (1 x 50 ml). Organická fáze byla sušena nad Na_2SO_4 a odpařena na RVO. Produkt je nažloutlý olej. Výtěžek byl 95 %.



^1H NMR (CDCl_3): δ 1,05 – 1,35 ppm (m, 12 H, CH_2), δ 1,45 – 1,65 ppm (m, 4H, CH_2), δ 2,2 – 2,3 ppm (m, 5H, CH_2 , CH_3), 2,55 ppm (t, 2H, CH_2), 3,65 ppm (m, 3H, CH_2), δ 6,9 – 7,2 ppm (m, CH).

krok 3) deprotektce, syntéza 11-(4-methylfenyl)undekanové kyseliny: methyl-(11-(4-methylfenyl)undekanoát) (3,328 g, 11,36 mmol) byl emulgován v 10% roztoku NaOH v MeOH (30 ml). Reakční směs byla refluxována 1 hod.. Po 10 min zahřívání vznikla bílá sraženina. Po ukončení zahřívání byl z reakční směsi odpařen MeOH. Sraženina byla zalita 20 ml H_2O a pomocí koncentrované HCl bylo pH upraveno na hodnotu 2 až 3. Produkt byl extrahován diethyletherem (3 x 30 ml). Spojené organické podíly byly promyty 10% NaHCO_3 (1 x 20 ml), H_2O (1 x 20 ml) a sušeny nad Na_2SO_4 . Organická fáze byla sušena nad Na_2SO_4 a odpařena na RVO. Produkt je nažloutlý olej. Výtěžek byl 87 %.



^1H NMR (CDCl_3): δ 1,05 – 1,35 ppm (m, 12 H, CH_2), δ 1,45 – 1,65 ppm (m, 4H, CH_2), δ 2,25 – 2,38 (m, 5H, CH_2 , CH_3), δ 2,55 ppm (t, 2H, CH_2), δ 6,9 – 7,2 ppm (m, CH).

Příklad 12: Syntéza 11-(4-methylfenyl)undekanoyl derivátu kyseliny hyaluronové (UNFEHA), pomocí báze DIPEA

1,8 g (4,50 mmol, 15×10^3 g/mol) hyaluronanu sodného bylo rozpuštěno v 18 ml demineralizované vody. Po úplném rozpuštění byla přidána báze DIPEA (2 ekv.), absolutní propan-2-ol (9 ml) a 0,006 g DMAP (0,045 mmol, 0,01 ekv.). Zároveň byla rozpuštěna kyselina 11-(4-methylfenyl)undekanová (0,871 g, 3,15 mmol, 0,7 ekv.) v absolutním propan-2-olu (9 ml), poté byly do roztoku přidány DIPEA (2 ekv.) a benzoylchlorid (3,15 mmol, 0,7 ekv.). Po přidavku benzoylchloridu byla reakční směs míchána právě 30 min při teplotě cca 0 °C. Takto aktivovaná 11-(4-methylfenyl)undekanová kyselina (0,7 ekv.) byla přidána k roztoku hyaluronanu. Reakce probíhala při laboratorní teplotě 2 hod. Poté bylo k reakční směsi přidáno 150 ml absolutního propan-2-olu a nasycený roztok NaCl (cca 2 ml), aby došlo k vysrážení produktu. Tato směs byla nechána dekantovat. Po dekantaci byla většina tekutiny slita a sraženina byla promyta vodným roztokem propan-2-olu (85% obj., 4 x 50 ml) a poté absolutním propan-2-olem (4 x 50 ml) pro odstranění vody. Sraženina byla sušena 24 hod. při 40 °C.

SS 13 % (^1H NMR)

^1H NMR (D_2O) signály acylu: δ 0,95 – 1,4 ppm (bs, 12H, CH_2), δ 1,4 – 1,7 ppm (bs, 4H, CH_2), δ 2,3 ppm (bs, 3H, CH_3), δ 2,35 – 2,48 ppm (bs, 2H, CH_2), δ 2,5 – 2,67 ppm (bs, 2H, CH_2), δ 7,4 – 8,2 ppm (m, C_6H_5).

Příklad 13: Syntéza 11-(4-methylfenyl)undekanoyl derivátu kyseliny hyaluronové (UNFEHA), pomocí báze DIPEA

1,8 g (4,50 mmol, 15×10^3 g/mol) hyaluronanu sodného bylo rozpuštěno v 18 ml demineralizované vody. Po úplném rozpuštění byla přidána báze DIPEA (2 ekv), v dimethylsulfoxidu (9 ml) a DMAP (0,045 mmol, 0,01 ekv.). Zároveň byla rozpuštěna kyselina 11-(4-methylfenyl)undekanová (0,871 g, 3,15 mmol, 0,7 ekv) v dimethylsulfoxidu (9 ml), poté byly do roztoku přidány 1,16 g DIPEA (9 mmol, 2 ekv.) a 0,37 ml benzoylchlorid (3,15 mmol, 0,7 ekv.). Po přidavku benzoylchloridu byla reakční směs míchána právě 30 min. při laboratorní teplotě (25 °C). Takto aktivovaná kyselina 11-(4-methylfenyl)undekanová (0,7 ekv) byla přidána k roztoku hyaluronanu. Reakce probíhala při laboratorní teplotě 2 hod. Poté bylo k reakční směsi přidáno 150 ml absolutního propan-2-olu a nasycený roztok NaCl (cca 2 ml), aby došlo k vysrážení produktu. Tato směs byla ponechána dekantovat. Po dekantaci byla většina tekutiny slita a sraženina byla promyta vodným roztokem propan-2-olu (85% obj., 4 x 50 ml) a poté absolutním propan-2-olem (4 x 50 ml) pro odstranění vody. Sraženina byla sušena 15 hod. při 40 °C.

SS 8 % (^1H NMR)

^1H NMR (D_2O) signály acylu: δ 0,95 – 1,4 ppm (bs, 12H, CH_2), δ 1,4 – 1,7 ppm (bs, 4H, CH_2), δ 2,3 ppm (bs, 3H, CH_3), δ 2,35 – 2,48 ppm (bs, 2H, CH_2), δ 2,5 – 2,67 ppm (bs, 2H, CH_2), δ 7,4 – 8,2 ppm (m, C_6H_5).

Příklad 14: Syntéza 11-(4-methylfenyl)undekanoyl derivátu kyseliny hyaluronové (UNFEHA), pomocí báze DIPEA

1,8 g (4,50 mmol, 15×10^3 g/mol) hyaluronanu sodného bylo rozpuštěno v 18 ml demineralizované vody. Po úplném rozpuštění byla přidána báze 1,17 g DIPEA (9 mmol, 2 ekv.) v tetrahydrofuranu (9 ml) a DMAP (0,045 mmol, 0,01 ekv.). Zároveň byla rozpuštěna kyselina 11-(4-methylfenyl)undekanová (0,871 g, 3,15 mmol, 0,7 ekv.) v tetrahydrofuranu (9 ml), poté byly do roztoku přidány DIPEA (2 ekv) a benzoylchlorid (3,15 mmol, 0,7 ekv.). Po přidavku benzoylchloridu byla reakční směs míchána právě 30 min při teplotě cca 0 °C. Takto aktivovaná kyselina 11-(4-methylfenyl)undekanová (0,7 ekv.) byla přidána k roztoku hyaluronanu. Reakce probíhala při laboratorní teplotě 2 hod. Poté bylo k reakční směsi přidáno 150 ml absolutního propan-2-olu a nasycený roztok NaCl (cca 2 ml), aby došlo k vysrážení produktu. Tato směs byla nechána dekantovat. Po dekantaci byla většina tekutiny slita a sraženina byla promyta vodným roztokem propan-2-olu (85% obj., 4 x 50 ml) a poté absolutním propan-2-olem (4 x 50 ml) pro odstranění vody. Sraženina byla sušena 15 hod. při 40 °C.

SS 17 % (^1H NMR)

^1H NMR (D_2O) signály acylu: δ 0,95 – 1,4 ppm (bs, 12H, CH_2), δ 1,4 – 1,7 ppm (bs, 4H, CH_2), δ 2,3 ppm (bs, 3H, CH_3), δ 2,35 – 2,48 ppm (bs, 2H, CH_2), δ 2,5 – 2,67 ppm (bs, 2H, CH_2), δ 7,4 – 8,2 ppm (m, C_6H_5).

Příklad 15: Syntéza 11-(4-methylfenyl)undekanoyl derivátu kyseliny hyaluronové (UNFEHA)

2,00 g (5,0 mmol, $1,5 \times 10^4$ g/mol) hyaluronanu sodného bylo rozpuštěno v 20 ml demineralizované vody. Po úplném rozpuštění byl do roztoku HA přidán isopropanol (10 ml), 1,25 g nebo 1,74 ml DIPEA (10 mmol, 2 ekv) a 6,1 mg DMAPu (0,5 mmol, 0,01 ekv.). V 10 ml IPA bylo rozpuštěno 0,96 g kyseliny 11-(4-methylfenyl)undekanové (3,5 mmol, 0,7 ekv), poté bylo do roztoku přidáno 1,74 ml N,N-diisopropylethylaminu (10 mmol, 2 ekv.) a 0,40 ml benzoylchloridu (3,50 mmol, 0,7 ekv.). Při aktivaci byla reakční směs míchána při 10 °C po 30 min. Roztok aktivované kyseliny 11-(4-methylfenyl)undekanová (0,7 ekv), byl přimíchan do

roztoku hyaluronanu. Reakce probíhala při laboratorní teplotě 2 hod. Poté byl k reakční směsi přidán nasycený roztok chloridu sodného (cca 2 ml) a dále 150 ml 100% isopropanolu, aby došlo k vysrážení produktu. Tato směs byla nechána dekantovat. Po dekantaci byla většina tekutiny slita a sraženina byla promyta vodným roztokem propan-2-olu (85% obj., 4 x 50 ml) a poté absolutním propan-2-olem (4 x 50 ml) pro odstranění vody. Sraženina byla sušena 15 h při 40 °C.

SS 10 % (^1H NMR na Obr. 3 a HSQC na Obr. 4).

^1H NMR (D_2O) signály acylu: δ 0,95 – 1,4 ppm (bs, 12H, CH_2), δ 1,4 – 1,7 ppm (bs, 4H, CH_2), δ 2,3 ppm (bs, 3H, CH_3), δ 2,35 – 2,48 ppm (bs, 2H, CH_2), δ 2,5 – 2,67 ppm (bs, 2H, CH_2), δ 7,4 – 8,2 ppm (m, C_6H_5).

Příklad 16: Syntéza 11-(4-methylfenyl)undekanoyl derivátu kyseliny hyaluronové (UNFEHA)

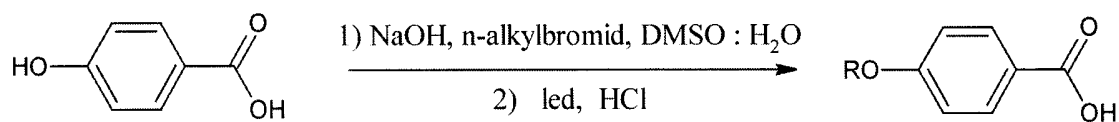
0,43 g (1,075 mmol, $1,5 \times 10^4$ g/mol) hyaluronanu sodného bylo rozpuštěno v 18 ml demineralizované vody. Po úplném rozpuštění byla přidána báze 0,37 ml (DIPEA, 2,15 mmol, 2 ekv.), absolutní propan-2-ol (9 ml) a 0,006 g DMAP (0,045 mmol, 0,01 ekv.). Zároveň byla rozpuštěna kyselina 11-(4-methylfenyl)undekanová (0,29 g, 1,07 mmol, 1,0 ekv.) v absolutním propan-2-olu (9 ml), poté bylo do roztoku přidáno 0,37 ml DIPEA (2,15 mmol, 2 ekv.), a 0,12 ml benzoylchloridu (3,15 mmol, 1,0 ekv.). Po přidavku benzoylchloridu byla reakční směs míchána právě 30 min při teplotě cca 0 °C. Takto aktivovaná kyselina 11-(4-methylfenyl)undekanová (1,0 ekv.) byla přidána k roztoku hyaluronanu. Reakce probíhala při laboratorní teplotě 2 hod. Poté bylo k reakční směsi přidáno 150 ml absolutního propan-2-olu a nasycený roztok NaCl (cca 2 ml), aby došlo k vysrážení produktu. Tato směs byla nechána dekantovat. Po dekantaci byla většina tekutiny slita a sraženina byla promyta vodným roztokem propan-2-olu (85% obj., 4 x 50 ml) a poté absolutním propan-2-olem (4 x 50 ml) pro odstranění vody. Sraženina byla sušena 15 hod. při 40 °C.

SS 33 % (^1H NMR)

^1H NMR (D_2O) signály acylu: δ 0,95 – 1,4 ppm (bs, 12H, CH_2), δ 1,4 – 1,7 ppm (bs, 4H, CH_2), δ 2,3 ppm (bs, 3H, CH_3), δ 2,35 – 2,48 ppm (bs, 2H, CH_2), δ 2,5 – 2,67 ppm (bs, 2H, CH_2), δ 7,4 – 8,2 ppm (m, C_6H_5).

Příklad 17: Příprava 4-alkyl-oxy-benzoové kyseliny ($\text{RO-C}_6\text{H}_4\text{-COOH}$)

Stručně, 2,0 g kyseliny 4-hydroxybenzoové (14,5 mmol) bylo rozpuštěno ve 10% roztoku NaOH ve vodě (1,252 g NaOH v 12,5 ml vody). Poté bylo přidáno 50ml DMSO při teplotě 80°C . Do reakce byl přidáván n-alkyl-bromid (15,5 mmol, 1,1 ekv). Reakční směs byla míchána 4 hod. při laboratorní teplotě. Reakční směs byla vlita do ledové vody (120 ml), Pomocí koncentrované HCl bylo pH převedeno do kyselé oblasti (pH 2). Precipitát byl filtrován přes fritu pomocí sníženého tlaku. Produkt byl rekrystalizován s roztokem acetonitril: vodu (50/50 obj/obj).



a) **kyselina 4-oktyl-oxy-benzoová:** ^1H NMR (CDCl_3): δ 0,89 ppm (t, 3H, CH_3), δ 1,2 – 1,4 ppm (m, 8H, CH_2), δ 1,47 ppm (kv, 2H, CH_2), δ 1,81 ppm (kv, 2H, CH_2), δ 4,02 ppm (t, 2H, CH_2), δ 6,93 ppm (d, 2H, CH), δ 8,05 ppm (d, 2H, CH), δ 11,88 ppm (s, 1H, COOH).

Vytežek: 84%

b) **Kyselina-4-(decanoyl-oxy)benzoová:** ^1H NMR (CDCl_3): δ 0,8 ppm (t, 3H, CH_3), δ 1,2 – 1,4 ppm (m, 10H, CH_2), δ 1,47 ppm (kv, 2H, CH_2), δ 1,8 ppm (kv, 2H, CH_2), δ 4,02 ppm (t, 2H, CH_2), δ 6,93 ppm (d, 2H, CH), δ 8,05 ppm (d, 2H, CH), δ 11,88 ppm (s, 1H, COOH).

Vytežek: 60%

c) **Kyselina-4-(dodekanoyloxy)benzoová:** ^1H NMR (CDCl_3): δ 0,8 ppm (t, 3H, CH_3), δ 1,2 – 1,4 ppm (m, 12H, CH_2), δ 1,47 ppm (kv, 2H, CH_2), δ 1,8 ppm (kv, 2H, CH_2), δ 4,02 ppm (t, 2H, CH_2), δ 6,93 ppm (d, 2H, CH), δ 8,05 ppm (d, 2H, CH), δ 11,88 ppm (s, 1H, COOH).

Vytežek: 45%

Příklad 18: Syntéza 4-oktyloxybenzoyl derivátu (OBEHA) kyseliny hyaluronové pomocí báze DIPEA

0,5 g (1,25 mmol, 6×10^3 g/mol) hyaluronanu sodného bylo rozpuštěno v 8 ml demineralizované vody. Po úplném rozpuštění byla přidána báze 4,4 ml DIPEA (2,5 mmol, 2 ekv.), absolutní propan-2-ol (4 ml) a dimethylaminopyridin (DMAP, 0,0125 mmol, 0,01 ekv.). Zároveň byla rozpuštěna kyselina 4-oktyl-oxybenzoová (0,6960 g, 2,5 mmol, 2 ekv) v absolutním propan-2-olu (8 ml), poté bylo do roztoku přidáno 6,6 ml DIPEA (3,75 mmol, 3 ekv.) a 0,25 ml benzoylchloridu (2,5 mmol, 2 ekv.). Po přidavku benzoylchloridu byla reakční směs míchána právě 30 min. za laboratorní teploty. Takto aktivovaná kyselina 4-oktyl-oxybenzoová (2 ekv.) byla přidána k roztoku hyaluronanu. Reakce probíhala při 37°C, 12 hod. Poté bylo k reakční směsi přidáno 100 ml absolutního propan-2-olu a nasycený roztok NaCl (cca 0,5 ml), aby došlo k vysrážení produktu. Tato směs byla ponechána dekantovat. Po dekantaci byla většina tekutiny slita a sraženina byla promyta vodným roztokem propan-2-olu (85% obj., 4 x 25 ml) a poté absolutním propan-2-olem (4 x 25 ml) pro odstranění vody. Sraženina byla sušena 15 hod. při 40 °C.

SS 0,57 % (^1H NMR)

^1H NMR (D_2O) signály acylu: δ 0,85 ppm (s, 3H, CH_3), δ 1,19 – 1,40 ppm (m, 12H, CH_2), δ 1,45 ppm (bs, 2H, CH_2), δ 1,70 – 1,84 ppm (bs, 2H, CH_2), δ 4,09 – 4,24 (bs, 2H, CH_2), δ 7,28 – 8,21 (m, 4H, C_6H_4).

Příklad 19: Syntéza 4-oktyloxybenzoyl derivátu (OBEHA) kyseliny hyaluronové pomocí báze TEA

0,1 g (0,25 mmol, 6×10^3 g/mol) hyaluronanu sodného bylo rozpuštěno v 2 ml demineralizované vody. Po úplném rozpuštění byla přidána báze 0,102 ml (TEA, 3 ekv), absolutní propan-2-ol (4 ml) a 2 mg dimethylaminopyridinu (DMAP, 0,0125 mmol, 0,01 ekv.). Zároveň byla rozpuštěna 0,094 g kyseliny 4-oktyloxybenzoové (0,375 mmol, 1,5 ekv.) v absolutním propan-2-olu (2 ml), poté byly do roztoku přidány 0,102 ml TEA (3 ekv.) a 0,044 ml benzoylchlorid (0,375 mmol, 1,5 ekv.). Po přidavku benzoylchloridu byla reakční směs míchána 30 min. za laboratorní teploty. Takto aktivovaná kyselina 4-oktyloxybenzoová (1,5 ekv.) byla přidána k roztoku hyaluronanu. Reakce probíhala 3 hod při laboratorní teplotě. Poté bylo k reakční směsi přidáno 25 ml absolutního propan-2-olu a nasycený roztok NaCl (cca 0,5 ml), aby došlo k vysrážení produktu. Tato směs byla nechána dekantovat. Po dekantaci byla většina tekutiny slita a sraženina byla promyta vodným roztokem propan-2-olu (85% obj., 4 x

25 ml) a poté absolutním propan-2-olem (4 x 25 ml) pro odstranění vody. Sraženina byla sušena 15 hod. při 40 °C.

SS 5,7 % (^1H NMR)

^1H NMR (D_2O) signály acylu: δ 0,86 ppm (s, 3H, CH_3), δ 1,21 – 1,40 ppm (m, 8H, CH_2), δ 1,41 – 1,51 ppm (bs, 2H, CH_2), δ 1,70 – 1,85 ppm (bs, 2H, CH_2), δ 4,09 – 4,24 ppm (bs, 2H, CH_2), δ 7,35 – 8,19 ppm (m, 4H, C_6H_4).

Příklad 20: Syntéza 4-oktyloxybenzoyl derivátu (OBEHA) kyseliny hyaluronové pomocí báze TEA

1,0 g (2,5 mmol, 6×10^3 g/mol) hyaluronanu sodného bylo rozpuštěno v 2 ml demineralizované vody. Po úplném rozpuštění byla přidána báze 1,02 ml (TEA, 3 ekv.), absolutní propan-2-ol (4 ml) a 2 mg dimethylaminopyridinu (DMAP, 0,0125 mmol, 0,01 ekv.). Zároveň byla rozpuštěna 0,94 g kyseliny 4-oktyloxybenzoové (3,75 mmol, 1,5 ekv.) v absolutním propan-2-olu (2 ml), poté byly do roztoku přidány 1,02 ml (TEA, 3 ekv.), a 0,53 ml benzoylchloridu (0,375 mmol, 1,5 ekv.). Po přidavku benzoylchloridu byla reakční směs míchána 3 hod. 15 min za 5°C. Takto aktivovaná kyselina 4-oktyloxybenzoová (1,5 ekv.) byla přidána k roztoku hyaluronanu. Reakce probíhala 19 hod při laboratorní teplotě. Poté bylo k reakční směsi přidáno 25 ml absolutního propan-2-olu a nasycený roztok NaCl (cca 0,5 ml), aby došlo k vysrážení produktu. Tato směs byla nechána dekantovat. Po dekantaci byla většina tekutiny slita a sraženina byla promyta vodným roztokem propan-2-olu (85% obj., 4 x 25 ml) a poté absolutním propan-2-olem (4 x 25 ml) pro odstranění vody. Sraženina byla sušena 15 hod. při 40 °C.

SS 6,7 % (^1H NMR)

^1H NMR (D_2O) signály acylu: δ 0,86 ppm (s, 3H, CH_3), δ 1,21 – 1,40 ppm (m, 8H, CH_2), δ 1,41 – 1,51 ppm (bs, 2H, CH_2), δ 1,70 – 1,85 ppm (bs, 2H, CH_2), δ 4,09 – 4,24 ppm (bs, 2H, CH_2), δ 7,35 – 8,19 ppm (m, 4H, C_6H_4).

Příklad 21: Syntéza 4-oktyloxybenzoyl derivátu (OBEHA) kyseliny hyaluronové pomocí báze TEA

0,50 g (1,25 mmol, $1,5 \times 10^4$ g/mol) hyaluronanu sodného bylo rozpuštěno v 10 ml demineralizované vody. Po úplném rozpuštění byla přidána báze 0,170 ml (TEA, 1 ekv.), absolutní propan-2-ol (10 ml) a 8 mg dimethylaminopyridinu (DMAP, 0,0625 mmol, 0,05 ekv.). Zároveň byla rozpuštěna 0,313 g kyseliny 4-oktyloxybenzoové (1,25 mmol, 1,0 ekv.)

v absolutním propan-2-olu (2 ml), poté byly do roztoku přidány 0,170 ml TEA (1 ekv.) a 0,144 ml benzoylchloridu (1,25 mmol, 1,0 ekv.). Reakční směs byla míchána 30 min. za laboratorní teploty. Takto aktivovaná kyselina 4-oktyloxybenzoová (1,0 ekv.) byla přidána k roztoku hyaluronanu. Reakce probíhala 3 hod při laboratorní teplotě. Poté bylo k reakční směsi přidáno 25 ml absolutního propan-2-olu a nasycený roztok NaCl (cca 0,5 ml), aby došlo k vysrážení produktu. Tato směs byla nechána dekantovat. Po dekantaci byla většina tekutiny slita a sraženina byla promyta vodným roztokem propan-2-olu (85% obj., 4 x 25 ml) a poté absolutním propan-2-olem (4 x 25 ml) pro odstranění vody. Sraženina byla sušena 15 hod. při 40 °C.

SS 4,4 % (^1H NMR)

^1H NMR (D_2O) signály acylu: δ 0,86 ppm (s, 3H, CH_3), δ 1,21 – 1,40 ppm (m, 8H, CH_2), δ 1,41 – 1,51 ppm (bs, 2H, CH_2), δ 1,70 – 1,85 ppm (bs, 2H, CH_2), δ 4,09 – 4,24 ppm (bs, 2H, CH_2), δ 7,35 – 8,19 ppm (m, 4H, C_6H_4).

Příklad 22: Syntéza 4-oktyloxybenzoyl derivátu (OBEHA) kyseliny hyaluronové pomocí báze TEA

0,5 g (1,25 mmol, $1,5 \times 10^4 \text{ g/mol}$) hyaluronanu sodného bylo rozpuštěno v 10 ml demineralizované vody. Po úplném rozpuštění byla přidána báze 0,5 ml (TEA, 3 ekv.) v absolutním propan-2-olu (4 ml) a 8 mg dimethylaminopyridinu (DMAP, 0,0125 mmol, 0,05 ekv.). Zároveň byla rozpuštěna kyselina 4-oktyloxybenzoová (0,469 g, 1,87 mmol, 1,5 ekv.) v absolutním propan-2-olu (10 ml), poté byly do roztoku přidány TEA (3 ekv.) a benzoylchlorid (1,87 mmol, 1,5 ekv.). Po přidavku benzoylchloridu byla reakční směs míchána právě 4 hod při 60°C. Takto aktivovaná 4-oktyloxybenzoová kyselina (1,5 ekv.) byla přidána k roztoku hyaluronanu. Reakce probíhala při laboratorní teplotě 24 hod. Poté bylo k reakční směsi přidáno 100 ml absolutního propan-2-olu a nasycený roztok NaCl (cca 0,5 ml), aby došlo k vysrážení produktu. Tato směs byla nechána dekantovat. Po dekantaci byla většina tekutiny slita a sraženina byla promyta vodným roztokem propan-2-olu (85% obj., 4 x 25 ml) a poté absolutním propan-2-olem (4 x 25 ml) pro odstranění vody. Sraženina byla sušena 15 hod. při 40 °C.

SS 3,8 % (^1H NMR)

^1H NMR (D_2O) signály acylu: δ 0,86 ppm (s, 3H, CH_3), δ 1,21 – 1,40 ppm (m, 8H, CH_2), δ 1,41 – 1,51 ppm (bs, 2H, CH_2), δ 1,70 – 1,85 ppm (bs, 2H, CH_2), δ 4,09 – 4,24 ppm (bs, 2H, CH_2), δ 7,35 – 8,19 ppm (m, 4H, C_6H_4).

Příklad 23: Syntéza 4-oktyloxybenzoyl derivátu (OBEHA) kyseliny hyaluronové pomocí báze TEA

0,1 g (0,25 mmol, $1,5 \times 10^4$ g/mol) hyaluronanu sodného bylo rozpuštěno v 10 ml demineralizované vody. Po úplném rozpuštění byla přidána báze 0,102 ml (TEA, 2 ekv.), absolutní propan-2-ol (4 ml) a 2 mg dimethylaminopyridinu (DMAP, 0,0125 mmol, 0,05 ekv.). Zároveň byla rozpuštěna kyselina 4-oktyloxybenzoová (0,125 g, 0,5 mmol, 2 ekv.) v absolutním propan-2-olu (10 ml), poté byly do roztoku přidány TEA (2 ekv.) a 0,44 ml benzoylchloridu (0,375 mmol, 2 ekv.). Po přidavku benzoylchloridu byla reakční směs míchána právě 30 min za laboratorní teploty. Takto aktivovaná 4-oktyloxybenzoová kyselina (2 ekv.) byla přidána k roztoku hyaluronanu. Reakce probíhala při 60°C, 24 hod. Poté bylo k reakční směsi přidáno 100 ml absolutního propan-2-olu a nasycený roztok NaCl (cca 0,5 ml), aby došlo k vysrážení produktu. Tato směs byla ponechána dekantovat. Po dekantaci byla většina tekutiny slita a sraženina byla promyta vodným roztokem propan-2-olu (85% obj., 4 x 25 ml) a poté absolutním propan-2-olem (4 x 25 ml) pro odstranění vody. Sraženina byla sušena 15 hod. při 40 °C.

SS 5,0 % (^1H NMR)

^1H NMR (D_2O) signály acylu: δ 0,86 ppm (s, 3H, CH_3), δ 1,21 – 1,40 ppm (m, 8H, CH_2), δ 1,41 – 1,51 ppm (bs, 2H, CH_2), δ 1,70 – 1,85 ppm (bs, 2H, CH_2), δ 4,09 – 4,24 ppm (bs, 2H, CH_2), δ 7,35 – 8,19 ppm (m, 4H, C_6H_4).

Příklad 24: Syntéza 4-oktyloxybenzoyl derivátu (OBEHA) kyseliny hyaluronové pomocí báze TEA

0,5 g (1,25 mmol, $1,15 \times 10^5$ g/mol) hyaluronanu sodného bylo rozpuštěno v 10 ml demineralizované vody. Po úplném rozpuštění byla přidána báze 0,5 ml (TEA, 3 ekv.) v absolutním propan-2-olu (4 ml) a 8 mg dimethylaminopyridinu (DMAP, 0,0125 mmol, 0,05 ekv.). Zároveň byla rozpuštěna kyselina 4-oktyloxybenzoová (0,469 g, 1,87 mmol, 1,5 ekv.) v absolutním propan-2-olu (10ml), poté byly do roztoku přidány TEA (3 ekv.) a benzoylchlorid (1,87 mmol, 1,5 ekv.). Po přidavku benzoylchloridu byla reakční směs míchána právě 3 hod. 15 min za 10°C. Takto aktivovaná 4-oktyloxybenzoová kyselina (1,5 ekv.) byla přidána

k roztoku hyaluronanu. Reakce probíhala za laboratorní teploty po dobu 20h. Poté bylo k reakční směsi přidáno 100 ml absolutního propan-2-olu a nasycený roztok NaCl (cca 0,5 ml), aby došlo k vysrážení produktu. Tato směs byla nechána dekantovat. Po dekantaci byla většina tekutiny slita a sraženina byla promyta vodným roztokem propan-2-olu (85% obj., 4 x 25 ml) potom absolutním propan-2-olem (4 x 25 ml) pro odstranění vody. Sraženina byla sušena 15 hod. při 40 °C.

SS 22,7 % (^1H NMR)

^1H NMR (D_2O) signály acylu: δ 0,86 ppm (s, 3H, CH_3), δ 1,21 – 1,40 ppm (m, 8H, CH_2), δ 1,41 – 1,51 ppm (bs, 2H, CH_2), δ 1,70 – 1,85 ppm (bs, 2H, CH_2), δ 4,09 – 4,24 ppm (bs, 2H, CH_2), δ 7,35 – 8,19 ppm (m, 4H, C_6H_4).

Příklad 25: Syntéza 4-oktyloxybenzoyl derivátu (OBEHA) kyseliny hyaluronové pomocí báze TEA

1,0 g (2,5 mmol, $4,2 \times 10^4$ g/mol) hyaluronanu sodného bylo rozpuštěno v 8 ml demineralizované vody. Po úplném rozpuštění byla přidána báze 1,02 ml (TEA, 7,5 mmol 3 ekv.), absolutní propan-2-ol (4 ml) a 16 mg dimethylaminopyridinu (DMAP, 0,0125 mmol, 0,01 ekv.). Zároveň byla rozpuštěna kyselina 4-oktyl-oxybenzoová (0,93 g, 3,75 mmol, 1,5 ekv.) v absolutním propan-2-olu (8 ml), poté byly do roztoku přidány 1,02 ml TEA (7,5 mmol, 3 ekv.) a 0,43 ml benzoylchloridu (3,75 mmol, 1,5 ekv.). Po přidavku benzoylchloridu byla reakční směs míchána právě 3 hod. 15 min. za 10°C. Takto kyselina aktivovaná 4-oktyl-oxybenzoová (1,5 ekv.) byla přidána k roztoku hyaluronanu. Reakce probíhala při laboratorní teplotě 20 h. Poté bylo k reakční směsi přidáno 100 ml absolutního propan-2-olu a nasycený roztok NaCl (cca 0,5 ml), aby došlo k vysrážení produktu. Tato směs byla ponechána dekantovat. Po dekantaci byla většina tekutiny slita a sraženina byla promyta vodným roztokem propan-2-olu (85% obj., 4 x 25 ml) a poté absolutním propan-2-olem (4 x 25 ml) pro odstranění vody. Sraženina byla sušena 15 h při 40 °C.

SS 16 % (^1H NMR) na Obr. 5.

^1H NMR (D_2O) signály acylu: δ 0,85 ppm (s, 3H, CH_3), δ 1,19 – 1,40 ppm (m, 12H, CH_2), δ 1,45 ppm (bs, 2H, CH_2), δ 1,70 – 1,84 ppm (bs, 2H, CH_2), δ 4,09 – 4,24 (bs, 2H, CH_2), δ 7,28 – 8,21 (m, 4H, C_6H_4).

Příklad 26: Syntéza 4-oktyloxybenzoyl derivátu (OBEHA) kyseliny hyaluronové pomocí báze TEA

0,5 g (1,25 mmol) $1,98 \times 10^5$ g/mol hyaluronanu sodného bylo rozpuštěno v 10 ml demineralizované vody. Po úplném rozpuštění byla přidána báze 0,5 ml TEA (3,75 mmol, 3 ekv.) v absolutní propan-2-olu (4 ml) a 8 mg dimethylaminopyridinu (DMAP, 0,0125 mmol, 0,05 ekv.). Zároveň byla rozpuštěna kyselina 4-oktyloxybenzoová (0,469 g, 1,87 mmol, 1,5 ekv.) v absolutním propan-2-olu (10 ml), poté byly do roztoku přidány TEA (3 ekv.) a benzoylchlorid (1,87 mmol, 1,5 ekv.). Po přidavku benzoylchloridu byla reakční směs míchána právě 3h 15 min za 10°C. Takto aktivovaná 4-oktyloxybenzoová kyselina (1,5 ekv.) byla přidána k roztoku hyaluronanu. Reakce probíhala za laboratorní teploty 20 h. Poté bylo k reakční směsi přidáno 100 ml absolutního propan-2-olu a nasycený roztok NaCl (cca 0,5 ml), aby došlo k vysrážení produktu. Tato směs byla nechána dekantovat. Po dekantaci byla většina tekutiny slita a sraženina byla promyta vodným roztokem propan-2-olu (85% obj., 4 x 25 ml) potom absolutním propan-2-olem (4 x 25 ml) pro odstranění vody. Sraženina byla sušena 15 hod. při 40 °C.

SS 35 % (^1H NMR)

^1H NMR (D_2O) signály acylu: δ 0,85 ppm (s, 3H, CH_3), δ 1,19 – 1,40 ppm (m, 12H, CH_2), δ 1,45 ppm (bs, 2H, CH_2), δ 1,70 – 1,84 ppm (bs, 2H, CH_2), δ 4,09 – 4,24 (bs, 2H, CH_2), δ 7,28 – 8,21 (m, 4H, C_6H_4).

Příklad 27. Syntéza 4-dekanoyloxybenzoyl derivátu kyseliny hyaluronové pomocí báze TEA

0,5 g (1,25 mmol, $1,5 \times 10^4$ g/mol) hyaluronanu sodného bylo rozpuštěno v 8 ml demineralizované vody. Po úplném rozpuštění byla přidána báze 1,2 ml TEA (6,25 mmol, 6 ekv.), absolutní propan-2-ol (4 ml) a dimethylaminopyridin (DMAP 0,065 mmol, 0,05 ekv.). Zároveň byla rozpuštěna kyselina 4-dekanoyloxybenzoová (0,8 g, 2,5 mmol, 2,0 ekv.) v absolutním propan-2-olu (8 ml), poté byly do roztoku přidány 1,2 ml TEA (6,25 mmol, 6 ekv.), a benzoylchlorid (2,5 mmol, 2,0 ekv.). Po přidavku benzoylchloridu byla reakční směs míchána právě 2h min. za 10°C. Takto aktivovaná kyselina 4-dekanoyloxybenzoová (2,0 ekv.)

byla přidána k roztoku hyaluronanu. Reakce probíhala při laboratorní teplotě 20 hod. Poté bylo k reakční směsi přidáno 100 ml absolutního propan-2-olu a nasycený roztok NaCl (cca 0,5 ml), aby došlo k vysrážení produktu. Tato směs byla nechána dekantovat. Sraženina byla promyta vodným roztokem propan-2-olu (85% obj., 4 x 25 ml) a poté absolutním propan-2-olem (4 x 25 ml) pro odstranění vody. Sraženina byla sušena 15 hod. při 40 °C.

SS 10 % (^1H NMR)

^1H NMR (D_2O) signály acylu: δ 0,83 ppm (bs, 3H, CH_3), δ 1,18 – 1,50 ppm (m, 18H, CH_2), δ 1,69 ppm (m, 2H, CH_2), δ 4,12 ppm (bs, 2H, CH_2), δ 6,82 – 8,18 ppm (m, 4H, C_6H_4).

Příklad 28. Syntéza 4-dodecyloxybenzoyl derivátu kyseliny hyaluronové pomocí báze TEA

0,5 g (1,25 mmol, $1,5 \times 10^4$ g/mol) hyaluronanu sodného bylo rozpuštěno v 8 ml demineralizované vody. Po úplném rozpuštění byla přidána báze 1,2 ml TEA (6,25mmol, 6 ekv.), absolutní propan-2-ol (4 ml) a dimethylaminopyridin (DMAP, 0,0065 mmol, 0,05 ekv.). Zároveň byla rozpuštěna kyselina 4-dodecyl-oxy-benzoová (0,9 g, 2,5 mmol, 2,0 ekv.) v absolutním propan-2-olu (8 ml), poté byly do roztoku přidány 2 ml TEA (6,25mmol, 6 ekv.), a benzoylchlorid (2,5 mmol, 2,0 ekv.). Po přidavku benzoylchloridu byla reakční směs míchána právě 30 min. za 10°C. Takto aktivovaná kyselina 4-dodecyloxybenzoová (2,5 ekv.) byla přidána k roztoku hyaluronanu. Reakce probíhala při laboratorní teplotě 20 hod. Poté bylo k reakční směsi přidáno 100 ml absolutního propan-2-olu a nasycený roztok NaCl (cca 0,5 ml), aby došlo k vysrážení produktu. Tato směs byla nechána dekantovat. Sraženina byla promyta vodným roztokem propan-2-olu (85% obj., 4 x 25 ml) a poté absolutním propan-2-olem (4 x 25 ml). Sraženina byla sušena 15 hod. při 40 °C.

SS 7 % (^1H NMR)

^1H NMR (D_2O) signály acylu: δ 0,83 ppm (bs, 3H, CH_3), δ 1,18 – 1,50 ppm (m, 18H, CH_2), δ 1,69 ppm (m, 2H, CH_2), δ 4,12 ppm (bs, 2H, CH_2), δ 6,82 – 8,18 ppm (m, 4H, C_6H_4).

Příklad 29. Příprava kyseliny 11-(9-karbazolyl)undekanové:

Krok 1: Alkylace karbazolu: 1,008 g (5,985 mmol) karbazolu a 1,8 ml (7,459 mmol) methyl 11-bromundekanoátu bylo přidáno v acetonitrilu, dále 0,4805 g K_2CO_3 (17,95 mmol) bylo rozsuspendováno v směš. Reakce byla zahřívána k refluxu 28 h, po chlazení na laboratorní

teplotu byla zfiltrována přes skládaný filtr, organická fáze byla odpařena, v baňce zůstala směs bílých a žlutých krystalů a jasně žlutá kapalina, Výtěžek: 0,70 g.

Krok 2, štěpení: 0,6820 g (17,05 mmol) NaOH bylo rozpuštěno v 6,85 ml MeOH, v tomto roztoku bylo smícháno 0,9995 g methylesteru kyseliny 11-(9-karbazolyl)undekanové; prášek byl dispergován a zahříván k refluxu 5h. Disperze byla vlita na fritu. Filtrát byl okyselen koncentrovanou HCl, potom byl filtrován přes fritu za sníženého tlaku, promyt EtOH, část krystalků prošla přes fritu. Výtěžek: 0,5651 g.

^1H NMR (CDCl_3): δ 0,83 ppm (bs, 3H, CH_3), δ 1,2 – 1,30 ppm (m, 13H, CH_2), δ 1,6 ppm (m, 2H, CH_2), δ 1,9 ppm (m, 2H, CH_2), δ 4,3 ppm (m, 2H, CH_2), δ 7,2 ppm (m, 2H, δ 7,3 ppm (m, 4H, C_6H_4), δ 8,0 ppm (m, 2H, C_6H_4)

Příklad 30. Syntéza kyseliny 11-(9-karbazolyl)undekanové derivátu kyseliny hyaluronové pomocí báze DIPEA

0,4996 g (1,25 mmol, $1,5 \times 10^4$ g/mol) hyaluronanu sodného bylo rozpouštěno v 8 ml demi H_2O , poté byly přidány 0,3231g DIPEA (2,5 mmol, 2ekv.) a AIPA (2 ml) a DMAP (1,8 mg.). 0,2 g kyseliny 11-(9-karbazolyl)undekanové (0,6242 mmol, 0,5 ekv.) bylo rozpuštěno v 8 ml AIPA po cca 5 min. bylo přidáno 0,3231g DIPEA (2,5 mmol, 2ekv.), a přídavek 0,07 ml benzoylchloridu (0,62 mmol, 0,5 ekv.). Po přidavku benzoylchloridu byla směs míchána 30 min. při laboratorní teplotě. Takto aktivovaná kyselina 11-(9-karbazolyl)undekanová (0,5 ekv) byla přidána k roztoku hyaluronanu. Reakce probíhala při laboratorní teplotě 3 hod. Poté bylo k reakční směsi přidáno 100 ml absolutního propan-2-olu a nasycený roztok NaCl (cca 0,5 ml), aby došlo k vysrážení produktu. Tato směs byla ponechána dekantovat. Po dekantaci byla většina tekutiny slita a sraženina byla promyta vodným roztokem propan-2-olu (85% obj., 4 x 25 ml) a poté absolutním propan-2-olem (4 x 25 ml) pro odstranění vody. Sraženina byla sušena 15 hod. při 40 °C.

SS = 4 % (DS určováno podle píků na 0,83 (2H) a 2,1 (3H) ppm

^1H NMR (D_2O): signály acylu: δ 0,83 ppm (bs, 3H, CH_3), δ 1,2 – 1,30 ppm (m, 13H, CH_2), δ 1,6 ppm (m, 2H, CH_2), δ 1,9 ppm (m, 2H, CH_2), δ 3,2-4,0 ppm), δ 7,2 ppm (m, 2H, δ 7,3 ppm (m, 4H, C_6H_4), δ 8,0 ppm (m, 2H, C_6H_4). Signály HA: δ 2,1 ppm (s, 3H, NHCH_3), (m, 10H, skeletal HA), δ 4,5 ppm (d, 2H, diasterotopicky, HA)

Příklad 31. Syntéza kyseliny 11-(9-karbazolyl) undekanové derivátu kyseliny hyaluronové pomocí báze DIPEA

0,51 g (1,25 mmol, $1,5 \times 10^4$ g/mol) hyaluronanu sodného bylo rozpouštěno v 8 ml demi H₂O, poté byly přidány 0,3231 g DIPEA (2,5 mmol, 2 ekv.), a AIPA (2 ml) a DMAP (1,8 mg.). 0,2 g kyseliny 11-(9-karbazolyl)undekanové (1,25 mmol, 1 ekv) bylo rozpouštěno v 8 ml AIPA. Po cca 5 min. bylo přidáno 0,3231 g DIPEA (2,5 mmol, 2 ekv.), a přidavek 0,14 ml benzoylchloridu (1,25 mmol, 1 ekv). Po přidavku benzoylchloridu byla směs míchána 30 min. při laboratorní teplotě. Takto aktivovaná kyselina 11-(9-karbazolyl)undekanová (1 ekv.) byla přidána k roztoku hyaluronanu. Reakce probíhala při laboratorní teplotě 3 hod. Poté bylo k reakční směsi přidáno 100 ml absolutního propan-2-olu a nasycený roztok NaCl (cca 0,5 ml), aby došlo k vysrážení produktu. Tato směs byla ponechána dekantovat. Po dekantaci byla většina tekutiny slita a sraženina byla promyta vodným roztokem propan-2-olu (85% obj., 4 x 25 ml) a poté absolutním propan-2-olem (4 x 25 ml) pro odstranění vody. Sraženina byla sušena 15 hod. při 40 °C.

SS = 15 % (DS určováno podle píků na 0,83 (2H) a 2,1 (3H) ppm)

¹H NMR (D₂O): signály acylu: δ 0,83 ppm (bs, 3H, CH₃), δ 1,2 – 1,30 ppm (m, 13H, CH₂), δ 1,6 ppm (m, 2H, CH₂), δ 1,9 ppm (m, 2H, CH₂), δ 3,2-4,0 ppm (δ 7,2 ppm (m, 2H, δ 7,3 ppm (m, 4H, C₆H₄), δ 8,0 ppm (m, 2H, C₆H₄). Signály HA: δ 2,1 ppm (s, 3H, NHCH₃), (m, 10H, skeletal HA), δ 4,5 ppm (d, 2H, diasterotopicky, HA)

Příklad 32: Cytotoxicita 4-fenylbutanoyl derivátu kyseliny hyaluronové

Cytotoxicita esteru kyseliny hyaluronové popsaného v Příkladu 1 byla testována na Swiss 3T3 buněčné linii. Tedy, 0,1 (hm./obj.) % roztok derivátu byl rozpuštěn v kompletním kultivačním mediu a míchán přes noc. Poté byl roztok filtrován přes sterilní filtrační zařízení (0,22 μ m), vytvářející konečné koncentrace vzorku, například 1, 0,5 a 0,1 mg/ml. 3000 buněk (Swiss 3T3) bylo nasazeno na jamku 96-ti jamkových testovacích destiček. Buňky byly pěstovány po dobu 24 hodin před přidáním testovaných roztoků. Buněčná životaschopnost byla měřena 0, 24, 48, 72 hodin po ošetření pomocí testu s 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyln tetrazolium bromidem (MTT). Stručně, 20 μ l zásobního roztoku MTT (5 mg/ml) bylo přidáno do 200 μ l media buněčné kultury v každé jamce. Destičky byly inkubovány při 37°C v inkubátoru

buněčných kultur po 2,5 hodiny. MTT roztok byl odstraněn a bylo přidáno 220 μ l lyzačního roztoku. Buňky byly lyzovány po 30 minut při laboratorní teplotě na orbitální třepačce a optická hustota byla měřena pomocí Microplate reader VERSAmax při 570 nm. Experimentální provedení bylo doplněno sadou kontrolních buněk pěstovaných v běžném mediu bez ošetření a blankovými vzorky. MTT test byl využit k získání základních informací o buněčném metabolismu a proliferaci. Test životaschopnosti buněk byl opakován minimálně třikrát a je vypočítán průměr (v procentech) ve srovnání s kontrolou a směrodatná odchylka průměrů (SEMs). Tedy, tento derivát byl nalezen tak, aby nebyl cytotoxický do koncentrace 1000 μ g/ml. Grafický důkaz viability je znázorněn na Obr. 6.

Příklad 33: Cytotoxicita 11-(4-methylfenyl)undekanoyl derivátu kyseliny hyaluronové (UNFEHA)

Cytotoxicita esteru kyseliny hyaluronové popsaného v Příkladu 12 byla testována na Swiss 3T3 buněčné linii stejným postupem a za stejných podmínek, jak je popsáno v Příkladu 32. Grafický důkaz viability je znázorněn na Obr.7.

Příklad 34: Cytotoxicita 4-oktyloxybenzoyl derivátu kyseliny hyaluronové

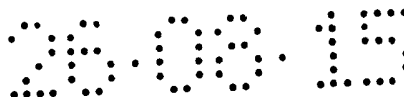
Cytotoxicita esteru kyseliny hyaluronové popsaného v Příkladu 25 byla testována na Swiss 3T3 buněčné linii stejným postupem a za stejných podmínek, jak je popsáno v Příkladu 23. Grafický důkaz viability je znázorněn na Obr. 8.

Příklad 35: Enkapsulace Koenzymu Q10 do 4-fenylbutanoyl derivátu kyseliny hyaluronové

100 mg acylového derivátu hyaluronanu připraveného v Příkladu 1 bylo přes noc rozpouštěno v 10 ml vody za stálého míchání. K připravenému roztoku byl za stálého míchání postupně přidáván roztok Koenzymu Q10 (7 mg v 5 ml isopropanolu). Propan-2-ol byl z roztoku kontinuálně odstraněn vakuovou evaporací. Po odstranění propan-2-olu byla vodná fáze vysušena do sucha, rehydratována na vodní lázni a zfiltrována přes 1 μ m skleněný filtr. Filtrát byl zlyofilizován.

Množství navázaného koenzymu Q10 (HPLC stanovení): 4,0 % (hmotn.)

Příklad 36: Enkapsulace Nílské červeně do 4-fenylbutanoyl derivátu kyseliny hyaluronové



100 mg derivátu připraveného v Příkladu 1 bylo rozpuštěno v 10 ml demineralizované vody. K připravenému roztoku byl přidán roztok Nílské červeně (3,0 mg ve 3 ml CHCl_3) a směs roztoků byla řádně promíchána. CHCl_3 byl z roztoku odstraněn vakuovou evaporací. Poté byly přidány další 2 ml CHCl_3 a CHCl_3 byl z roztoku opět odstraněn vakuovou evaporací. Po odstranění CHCl_3 byla vodná fáze vysušena do sucha, rehydratována na vodní lázni a zfiltrována přes 1 μm skleněný filtr. Filtrát byl zlyofilizován.

Množství navázané nílské červeně (fluorescenční stanovení): 0,2 % (hmotn.).

Příklad 37: Enkapsulace FRET barviv do fenyl-alkylových derivátů kyseliny hyaluronové

200 mg derivátů HA obecného vzorce I, kde R_2 je $-\text{CO}(\text{CH})_x\text{C}_6\text{H}_4\text{pR}_5$, kde $x=3,5,7$ a 10 a R_5 je $-\text{H}$ nebo $-\text{CH}_3$ bylo jednotlivě rozpuštěno v 20 ml demineralizované vody. 2 mg DiO (donor) byly rozpuštěny v 10 ml absolutního propan-2-olu. 2 mg Dil (akceptor) bylo rozpuštěno v 15 ml absolutního propan-2-olu. Oba roztoky (DiO a Dil) byly smíseny a polovina tohoto roztoku byla přilita k vodnému roztoku derivátu připraveného v Příkladech 4,6, 9 nebo 12. Propan-2-ol byl z roztoku odstraněn vakuovou evaporací. Poté byl přidán zbytek roztoku (DiO a Dil) a propan-2-ol byl z roztoku opět odstraněn evaporací. Po odstranění propan-2-olu byla vodná fáze vysušena do sucha, rehydratována na vodní lázni a zfiltrována přes 1 μm skleněný filtr. Filtrát byl zlyofilizován.

Příklad 38: Stanovení stability micel nosiče fenyl alkylových derivátů kyseliny hyaluronové s FRET barvivy fluorescenční metodou

6 mg derivátů připravených dle Příkladů 37 bylo jednotlivě rozpuštěno v 4 ml roztoku bovinního sérového albuminu (BSA) o koncentraci 40 mg/ml ve fyziologickém roztoku. Emisní spektra roztoků byla proměřována na fluorometru RF-5301 (Shimadzu) při excitaci 484 nm. Emise byla snímána v rozmezí 495-600 nm. Měření probíhalo při 37 °C a v časech 0 min, 15 min, 30 min, 45 min, 60 min, 75 min, 90 min, 105 min, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h a 24 h. Stabilita micel nosiče byla stanovena porovnáním intenzit píků akceptoru a donoru. Grafický výsledek stability je na Obr. 11.

Příklad 39: Enkapsulace Resveratrolu do 11-(4-methylfenyl)undekanoyl derivátu kyseliny hyaluronové (UNFEHA)

100 mg acylového derivátu hyaluronanu připraveného v Příkladu 10 bylo přes noc rozpouštěno v 10 ml vody za stálého míchání. K připravenému roztoku byl za stálého míchání postupně přidáván roztok resveratrolu (5 mg ve 3 ml isopropanolu). Propan-2-ol byl z roztoku kontinuálně odstraněn vakuovou evaporací. Po odstranění propan-2-olu byla vodná fáze vysušena do sucha, rehydratována na vodní lázni a zfiltrována přes 1 µm skleněný filtr. Filtrát byl zlyofilizován.

Množství navázaného resveratrolu (UV-Vis stanovení): 3,0 % (hm)

Příklad 40. Stanovení zeta potenciálu nanomicel hyaluronanu

Zeta potenciál byl stanoven na Zetasizeru Nano-ZS (Malvern Instruments) vybaveném He-Ne laserem (633 nm). V 0,9% NaCl zeta potenciál klesl na – 30 až -23 mV. Absolutní hodnota zeta potenciálu tedy indikuje vysokou stabilitu připravených nanomicel ve vodných roztocích a relativně vysokou stabilitu v solných roztocích. Velikost nanomicel hyaluronanu UNFEHA s enkapsulovaným resveratrolem (příklad 39) : 40-60 nm (DLS distribuce Obr. 10).

Příklad 41. Morfologická analýza nanomicel hyaluronanu

Mikroskopické analýzy byly provedeny na scanning elektronovým mikroskopem. Nosič s resveratrolem připraveno v příkladu 39 byl rozpuštěn na koncentraci 10 mg/ml v H₂O. Z takto připraveného roztoku bylo odebráno 10 µl vzorku do eppendorfky a přidáno 10 µl 1% roztoku kyseliny fosfowolframové. Na mřížku bylo přeneseno 10 µl roztoku, takto připravená mřížka byla inkubována 20 min při 40°C. Poté byl odsát přebytečný roztok pomocí filtračního papíru a mřížka byla připravena k měření. Snímky polymerních micel s loadovaným resveratrolem z elektronového mikroskopu jsou na Obr. 10.

Příklad 42: Enkapsulace Resveratrolu do 11-(4-methylfenyl)undekanoyl derivátu kyseliny hyaluronové (UNFEHA)

100,4 mg acylového derivátu hyaluronanu připraveného v Příkladu 12 bylo přes noc rozpouštěno v 10 ml vody za stálého míchání. K připravenému roztoku byl za stálého míchání postupně přidáván roztok resveratrolu (5 mg ve 3 ml ethanolu). Ethanol byl z roztoku

kontinuálně odstraněn vakuovou evaporací. Po odstranění methanolu byla vodná fáze vysušena do sucha, rehydratována na vodní lázni a zfiltrována přes 1 µm skleněný filtr. Filtrát byl zlyofilizován.

Množství navázaného resveratrolu (UV-Vis stanovení): 2,91 % (hmotn.)

Příklad 43: Enkapsulace Resveratrolu do 4-oktyloxybenzoyl derivátu (OBEHA) kyseliny hyaluronové

100,4 mg acylového derivátu hyaluronanu připraveného v Příkladu 22 bylo přes noc rozpouštěno v 10 ml vody za stálého míchání. K připravenému roztoku byl za stálého míchání postupně přidáván roztok resveratrolu (5 mg ve 3 ml etanolu). Etanol byl z roztoku kontinuálně odstraněn vakuovou evaporací. Po odstranění metanolu byla vodná fáze vysušena do sucha, rehydratována na vodní lázni a zfiltrována přes 1 µm skleněný filtr. Filtrát byl zlyofilizován.

Množství navázaného resveratrolu (UV-Vis stanovení): 2,61 % (hmotn.)

Příklad 44: Enkapsulace Resveratrolu do 4-oktyloxybenzoyl derivátu (OBEHA) kyseliny hyaluronové

103 mg acylového derivátu hyaluronanu připraveného v Příkladu 22 bylo přes noc rozpouštěno v 10 ml vody za stálého míchání. K připravenému roztoku byl za stálého míchání postupně přidáván roztok resveratrolu (3 mg ve 3 ml isopropanolu). Propan-2-ol byl z roztoku kontinuálně odstraněn vakuovou evaporací. Po odstranění propan-2-olu byla vodná fáze vysušena do sucha, rehydratována na vodní lázni a zfiltrována přes 1 µm skleněný filtr. Filtrát byl zlyofilizován.

Množství navázaného resveratrolu (UV-Vis stanovení): 1,7 % (hm)

Srovnávací příklad 45: Enkapsulace Resveratrolu do HA-C18:1 derivátu kyseliny hyaluronové (podle WO2014082609)

100,1 mg acylového derivátu hyaluronanu připraveného podle WO2014082609 bylo přes noc rozpouštěno v 10 ml vody za stálého míchání. K připravenému roztoku byl za stálého míchání postupně přidáván roztok resveratrolu (5 mg ve 5 ml isopropanolu). Propan-2-ol byl z roztoku

kontinuálně odstraněn vakuovou evaporací. Po odstranění propan-2-olu byla vodná fáze vysušena do sucha, rehydratována na vodní lázni a zfiltrována přes 1 µm skleněný filtr. Filtrát byl zlyofilizován.

Množství navázaného resveratrolu (UV-Vis stanovení): 1,3 % (hmotn.)

Srovnávací příklad 46: Enkapsulace Resveratrolu do HA-C18:1 derivátu kyseliny hyaluronové (podle WO2014082609)

100,5 mg acylového derivátu hyaluronanu připraveného podle patentu WO2014082609A1 bylo přes noc rozpouštěno v 10 ml vody za stálého míchání. K připravenému roztoku byl za stálého míchání postupně přidáván roztok resveratrolu (5 mg ve 10 ml ethanol). Ethanol byl z roztoku kontinuálně odstraněn vakuovou evaporací. Po odstranění methanolu byla vodná fáze vysušena do sucha, rehydratována na vodní lázni a zfiltrována přes 1 µm skleněný filtr. Filtrát byl zlyofilizován.

Množství navázaného resveratrolu (UV-Vis stanovení): 1,2 % (hm)

Srovnávací příklad 47: Enkapsulace Resveratrolu do HA-C16 derivátu kyseliny hyaluronové (podle WO2014082609)

101,2 mg acylového derivátu hyaluronanu připraveného podle WO2014082609A1 bylo přes noc rozpouštěno v 10 ml vody za stálého míchání. K připravenému roztoku byl za stálého míchání postupně přidáván roztok resveratrolu (2,2 mg ve 2 ml isopropanolu). Propan-2-ol byl z roztoku kontinuálně odstraněn vakuovou evaporací. Po odstranění propanolu byla vodná fáze vysušena do sucha, rehydratována na vodní lázni a zfiltrována přes 1 µm skleněný filtr. Filtrát byl zlyofilizován.

Množství navázaného resveratrolu (UV-Vis stanovení): 1,68 % (hmotn.)

Srovnávací příklad 48: Enkapsulace Resveratrolu do HA-C6 derivátu kyseliny hyaluronové (podle WO2014082609)

99,8 mg acylového derivátu hyaluronanu připraveného podle patentu WO2014082609 bylo přes noc rozpouštěno v 10 ml vody za stálého míchání. K připravenému roztoku byl za stálého míchání postupně přidáván roztok resveratrolu (3,3 mg ve 3 ml methanolu). Methanol byl z roztoku kontinuálně odstraněn vakuovou evaporací. Po odstranění methanolu byla vodná fáze

vysušena do sucha, rehydratována na vodní lázni a zfiltrována přes 1 µm skleněný filtr. Filtrát byl zlyofilizován.

Množství navázaného resveratrolu (UV-Vis stanovení): 0,7 % (hmotn.)

Příklad 49: Enkapsulace retinyl palmitátu do 11-(4-methylfenyl)undekanoyl derivátu kyseliny hyaluronové (UNFEHA)

100,4 mg acylového derivátu hyaluronanu připraveného v Příkladu 12 bylo přes noc rozpouštěno v 10 ml vody za stálého míchání. K připravenému roztoku byl za stálého míchání postupně přidáván roztok retinyl palmitátu (12,4 mg ve 5 ml isopropanolu). Isopropanol byl z roztoku kontinuálně odstraněn vakuovou evaporací. Po odstranění metanolu byla vodná fáze vysušena do sucha, rehydratována na vodní lázni a zfiltrována přes 1 µm skleněný filtr. Filtrát byl zlyofilizován.

Množství navázaného retinyl palmitát (Superkritické fluidní chromatografie stanovení): 7,22 % (hmotn.)

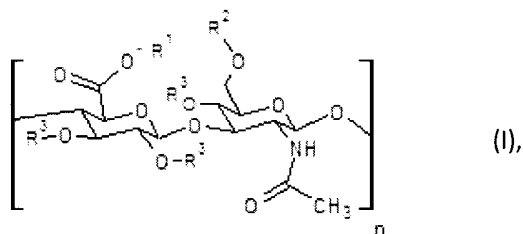
Srovnávací příklad 50: Enkapsulace retinyl palmitátu do HA-C18:1 derivátu kyseliny hyaluronové (podle WO2014082609)

101,6 mg acylového derivátu hyaluronanu připraveného podle patentu WO2014082609 bylo přes noc rozpouštěno v 10 ml vody za stálého míchání. K připravenému roztoku byl za stálého míchání postupně přidáván roztok retinyl palmitátu (6 mg ve 5 ml isopropanolu). Propan-2-ol byl z roztoku kontinuálně odstraněn vakuovou evaporací. Po odstranění isopropanolu byla vodná fáze vysušena do sucha, rehydratována na vodní lázni a zfiltrována přes 1 µm skleněný filtr. Filtrát byl zlyofilizován.

Množství navázaného retinyl palmitát (Superkritické fluidní chromatografie stanovení): 3,14 % (hmotn.).

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Hydrofobizovaný esterový derivát kyseliny hyaluronové nebo jeho soli obecného vzorce I



kde

R^1 je H^+ nebo jeho sůl,

R^2 je H nebo $-CO(CH_2)_x C_6H_4-pR^5$ nebo $-CO-C_6H_4-pO(CH_2)_y CH_3$, nebo $-CO-(CH_2)_z NC_{12}H_8$,

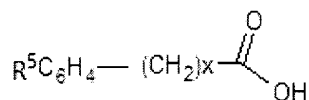
kde R^5 je H nebo CH_3 ; x je celé číslo v rozmezí 4 až 21, s výhodou 4 až 15 nebo y je celé číslo v rozmezí 8 až 21, s výhodou 8 až 15 nebo z je celé číslo v rozmezí 3 až 16, s výhodou 7 až 11, nejlépe 10; a $-(CH_2)_x-$ nebo $-(CH_2)_y-$ nebo $-(CH_2)_z-$ je lineární nasycená nebo nenasycená část řetězce, přičemž alespoň v jedné opakující se jednotce je jeden nebo více $-CO(CH_2)_x C_6H_4-pR^5$ nebo $-CO-C_6H_4-pO(CH_2)_y CH_3$, nebo $-CO-(CH_2)_{10} NC_{12}H_8$;

R^3 je H nebo R^2 ;

a kde n je celé číslo v rozmezí 1 až 495 dimerů.

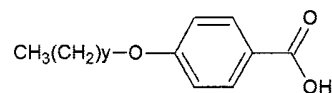
2. Derivát podle nároku 1, kde R^2 je $-CO(CH_2)_x C_6H_4-pR^5$ nebo $-CO-C_6H_4-pO(CH_2)_y CH_3$, nebo $-CO-(CH_2)_z NC_{12}H_8$ alespoň v jedné opakující se jednotce, přičemž R^3 je H.
3. Derivát podle nároku 1, kde R^1 je vybrán ze skupiny obsahující některý z iontů alkalických kovů nebo iontů kovů alkalických zemin, s výhodou Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} nebo Li^+ .
4. Derivát podle nároku 1, kde množství $-CO(CH_2)_x C_6H_4-pR^5$ nebo $-CO-C_6H_4-pO(CH_2)_y CH_3$, nebo $-CO-(CH_2)_z NC_{12}H_8$ v derivátu kyseliny hyaluronové nebo jeho soli obecného vzorce I je od 0,1 do 50% na 100 dimerů hyaluronové kyseliny nebo její soli, s výhodou 2 až 18 %, výhodněji 8 až 15 %.

5. Způsob syntézy derivátu podle kteréhokoliv z nároků 1 až 4, **vyznačující se tím, že** aromatická kyselina obecného vzorce II nebo obecného vzorce III nebo obecného vzorce IV

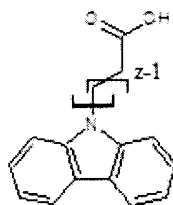


(II),

nebo

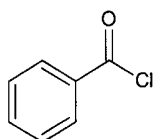


(III), nebo



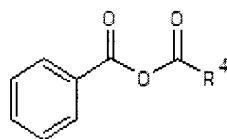
(IV),

kde R^5 , x , y a z jsou, jak definovány v nároku 1,
je aktivována pomocí benzoylchloridu vzorce V



(V),

v přítomnosti organické báze, s výhodou v přítomnosti terciálního aminu, výhodněji *N,N*-diisopropylethylaminu (DIPEA); směsi vody a vodou mísitelného polárního nebo nepolárního rozpouštědla za vzniku reaktivního anhydridu obecného vzorce VI,



(VI),

kde R^4 je $-(CH_2)_x C_6H_4-p R^5$, nebo $-C_6H_4-pO(CH_2)_yCH_3$, nebo $-(CH_2)_zNC_{12}H_8$, přičemž R^5x, y nebo z jsou definovány v nároku 1,

který reaguje s kyselinou hyaluronovou nebo její soli v přítomnosti organické báze, s výhodou v přítomnosti terciálního aminu vybraného ze skupiny obsahující triethylamin (TEA), *N,N*-diisopropylethylaminu (DIPEA) nebo 1,4-diazabicyklo[2.2.2]oktanu (DABCO); s výhodou *N,N*-diisopropylethylaminu (DIPEA); výhodněji triethylaminu (TEA), směsi vody a vodou mísitelného polárního nebo nepochárního rozpouštědla.

6. Způsob podle nároku 5, **vyznačující se tím, že** aktivace aromatické kyseliny obecného vzorce II nebo III nebo IV se provádí po dobu 5 až 120 minut při teplotě v rozmezí od -10°C do 40°C , s výhodou po dobu 30 minut od 0°C do 25°C
7. Způsob podle nároku 5 nebo nároku 6, **vyznačující se tím, že** množství reaktivního anhydridu obecného vzorce V, kde R^4 je $-(CH_2)_x-C_6H_4-p R^5$ nebo $-(CH_2)_zNC_{12}H_8$, odpovídá 0,01 až 3 ekvivalentům, s výhodou 0,5 až 1 ekvivalentům, výhodněji 0,7 ekvivalentů na dimer kyseliny hyaluronové nebo její soli.
8. Způsob podle nároku 5 nebo nároku 6, **vyznačující se tím, že** množství reaktivního anhydridu obecného vzorce V, kde R^4 je $-C_6H_4-O(CH_2)_yCH_3$, odpovídá 0,01 až 3 ekvivalentům, s výhodou 1,5 až 2,5 ekvivalentům, výhodněji 2,0 ekvivalenty na dimer kyseliny hyaluronové nebo její soli.
9. Způsob podle kteréhokoliv z nároků 5 až 8, **vyznačující se tím, že** tvorba derivátu kyseliny hyaluronové nebo její soli je prováděna po dobu 1 až 48 hodin při teplotě v rozsahu od 0 do 60°C , s výhodou 2 hodiny při 25°C .
10. Způsob podle kteréhokoliv z nároků 5 až 9, **vyznačující se tím, že** vodou mísitelné polární nebo nepochární rozpouštědlo je vybráno ze skupiny obsahující propan-2-ol, dimethylsulfoxid, tetrahydrofuran, s výhodou propan-2-ol.
11. Nanomicelární kompozice na bázi hydrofobizovaného esterového derivátu kyseliny hyaluronové podle obecného vzorce (I), **vyznačující se tím, že** obsahuje nanomicely, které obsahují hydrofobní jádro tvořené $-\text{CO}(CH_2)_x C_6H_4-p R^5$ nebo $-\text{COC}_6H_4-pO(CH_2)_yCH_3$ nebo $-(CH_2)_zNC_{12}H_8$ skupinami, kde x je celé číslo v rozmezí 4 až 21, s výhodou 4 až 15 a

R^5 je H nebo CH_3 , nebo y je celé číslo v rozmezí 8 až 21, s výhodou 8 až 15, nebo z je celé číslo v rozmezí 3 až 16, s výhodou 7 až 11, nejlépe 10, navázanými na kyselinu hyaluronovou a hydrofilní obal tvořený hydrofilními funkčními skupinami kyseliny hyaluronové a jednu nebo více biologicky aktivních aromatických látek fyzikálně vázaných v nanomicele.

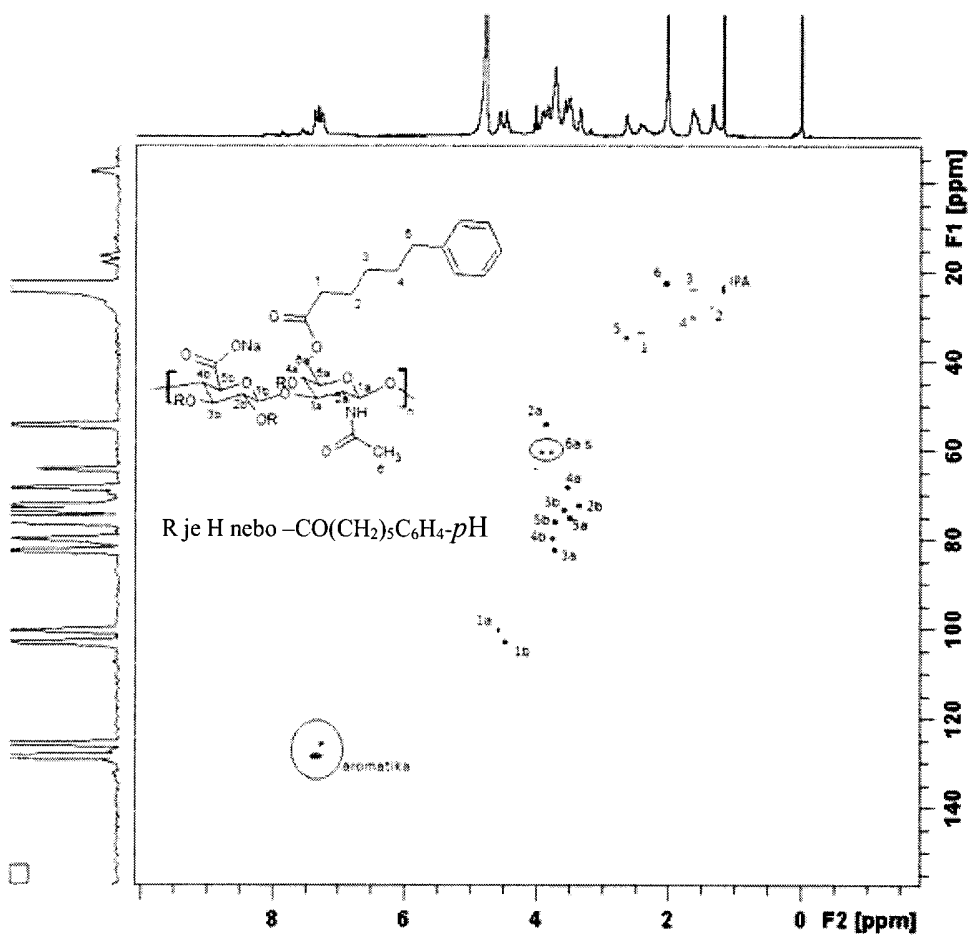
12. Nanomicelární kompozice podle nároku 11, **vyznačující se tím, že** obsahuje 0,3 až 8,0 hmotn. %, s výhodou 2,5 až 8,0 hmotn. %, výhodněji 5,0 až 8,0 hmotn. % biologicky aktivních látek vzhledem k hmotnostnímu obsahu hydrofobizovaného esterového derivátu kyseliny hyaluronové nebo jeho soli, přičemž biologicky aktivní aromatická látka je vybrána ze skupiny zahrnující farmaceuticky a kosmeticky aktivní látky, zejména vitamíny, léčiva s výhodou cytostatika, steroidy.
13. Nanomicelární kompozice podle nároku 11 nebo nároku 12, **vyznačující se tím, že** biologicky aktivní aromatická látka je vybrána ze skupiny obsahující resveratrol, koenzym Q10, retinyl palmitát.
14. Nanomicelární kompozice podle kteréhokoli z nároků 11 až 13, **vyznačující se tím, že** koncentrace derivátu kyseliny hyaluronové v kompozici ve vodném roztoku je v rozmezí $0,003 \text{ mg.ml}^{-1}$ až 20 mg.ml^{-1} , s výhodou $1 \text{ až } 10 \text{ mg.ml}^{-1}$.
15. Způsob přípravy nanomicelární kompozice definované v kterémkoli z nároků 11 až 14, **vyznačující se tím, že** derivát kyseliny hyaluronové podle obecného vzorce (I) se rozpustí ve vodě a biologicky aktivní aromatická látka se rozpustí v organickém rozpouštědle vybrané ze skupiny obsahující trichlormethan, methanol nebo propan-2-ol, přičemž oba roztoky se smíchají, poté se organické rozpouštědlo odstraní.
16. Způsob přípravy podle nároku 15, **vyznačující se tím, že** organické rozpouštědlo se odstraní vakuovou evaporací, následně se vodná fáze rehydratuje, získané nanomicelární útvary se zfiltrují a nakonec lyofilizují.
17. Použití nanomicelární kompozice definované v kterémkoliv z nároků 11 až 16 pro farmaceutické a kosmetické aplikace.

1/8

PV 2015-574

28.08.15

48



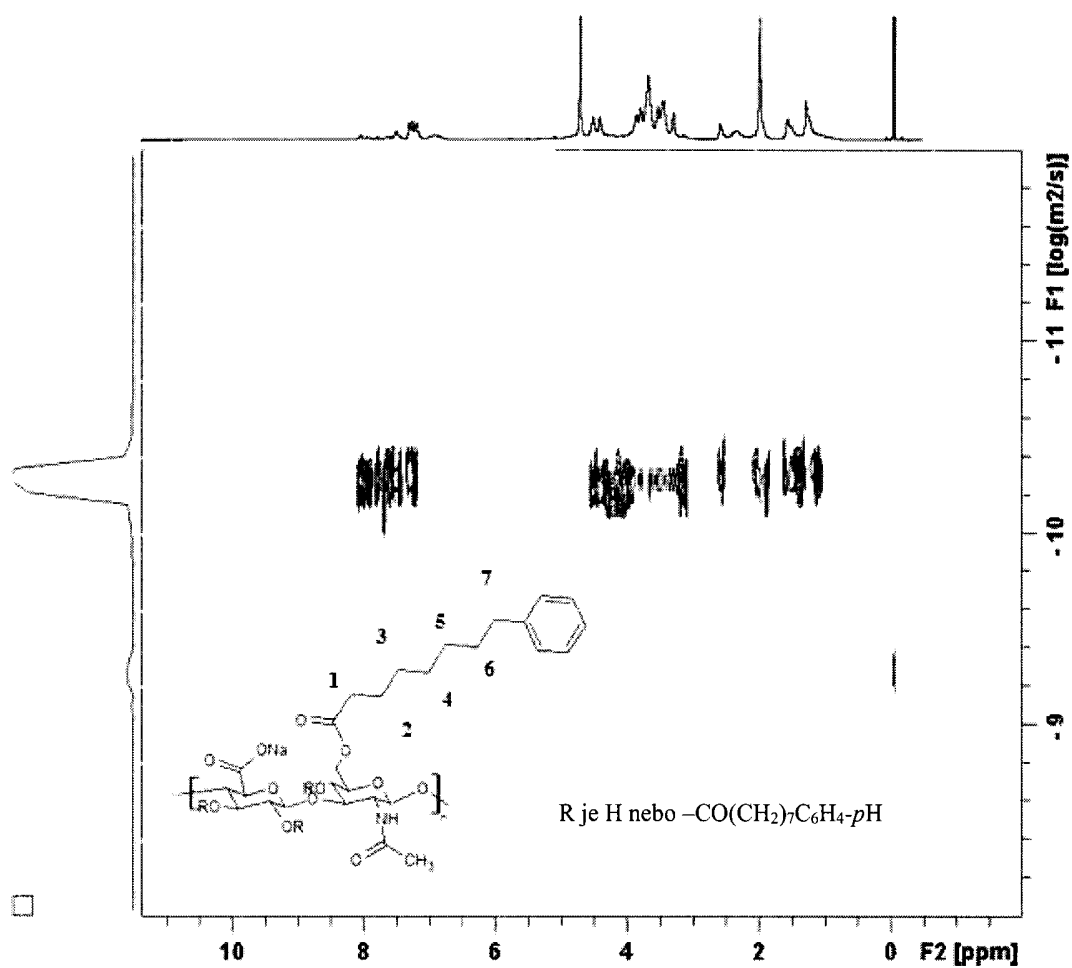
Obr. 1

2/8

50

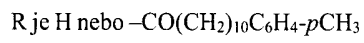
28.08.15

PV2015-574



Obr. 2

~~51~~

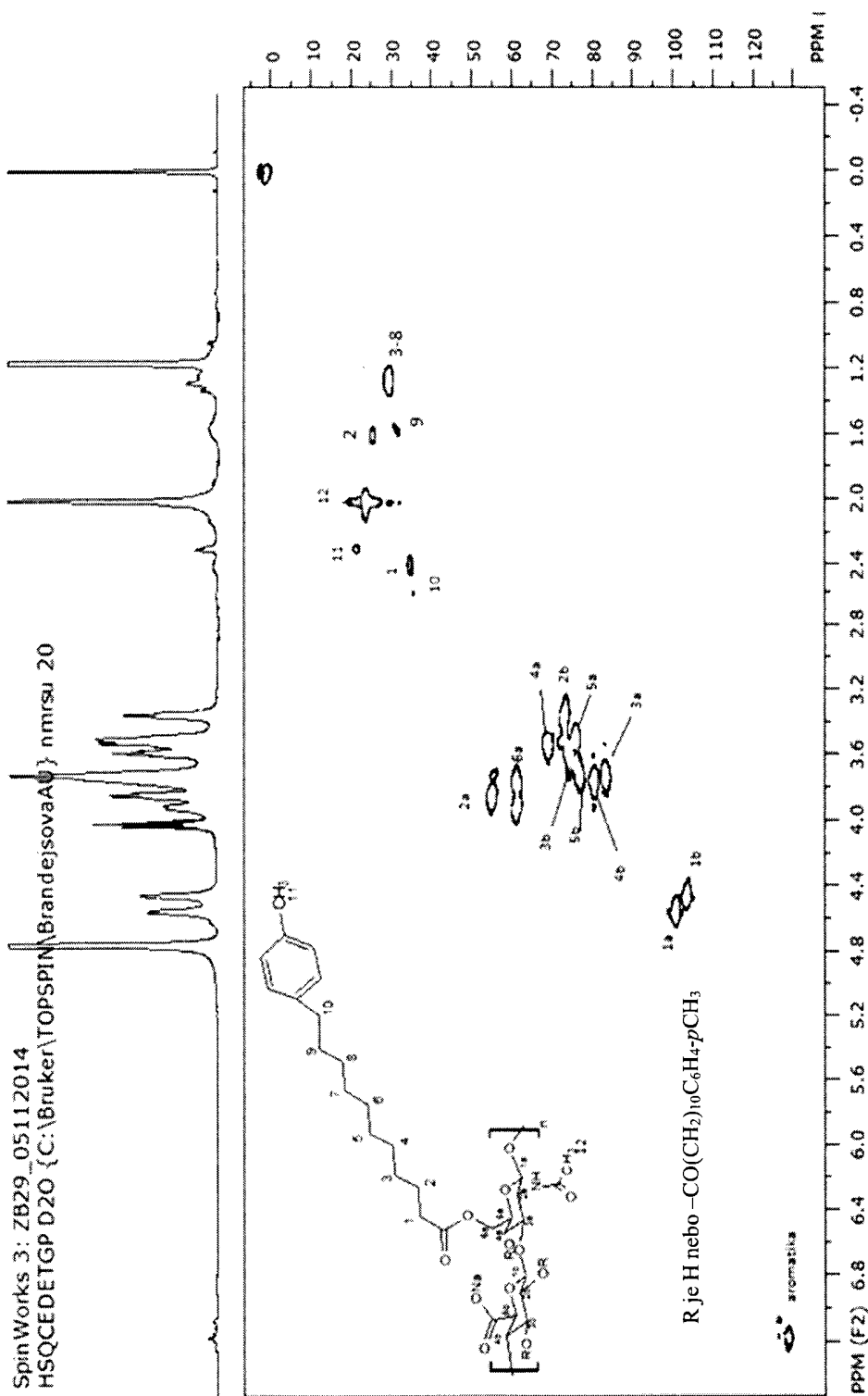


Obr. 3.

48

28.08.15

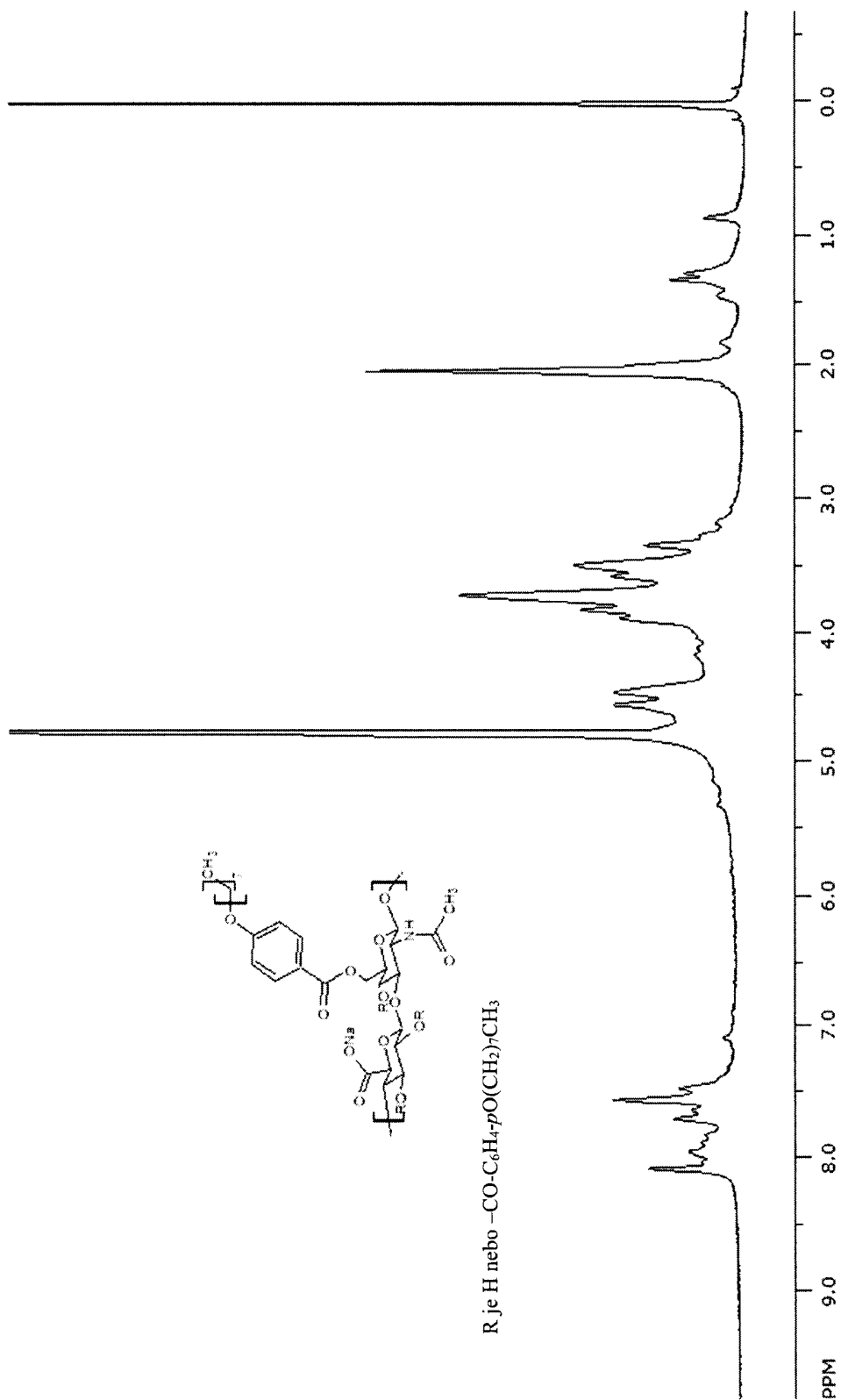
PV 2015 - 574



Obr. 4

5/8

26.08.15 PV 2015-574



Obr. 5

R je H nebo $-\text{CO}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{pO}(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$

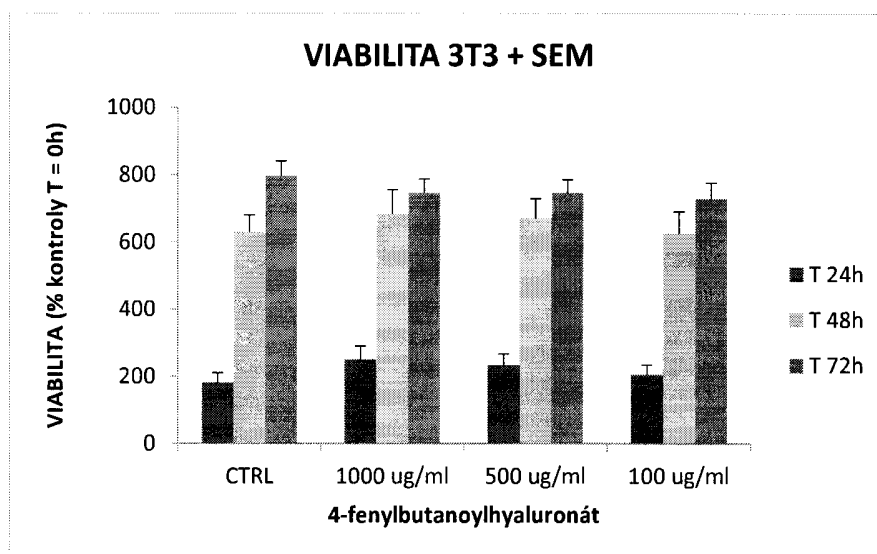
8X

6/8

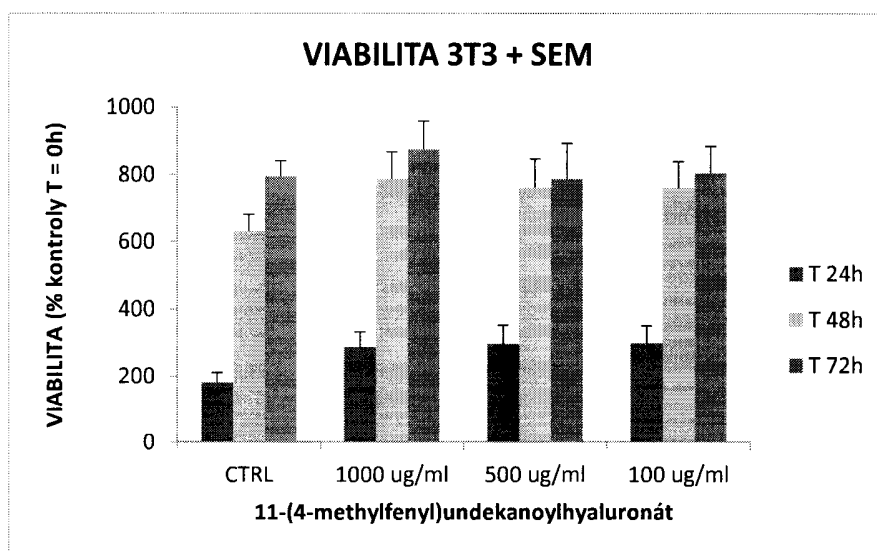
54

26.08.15

7V 2015 - 574



Obr. 6



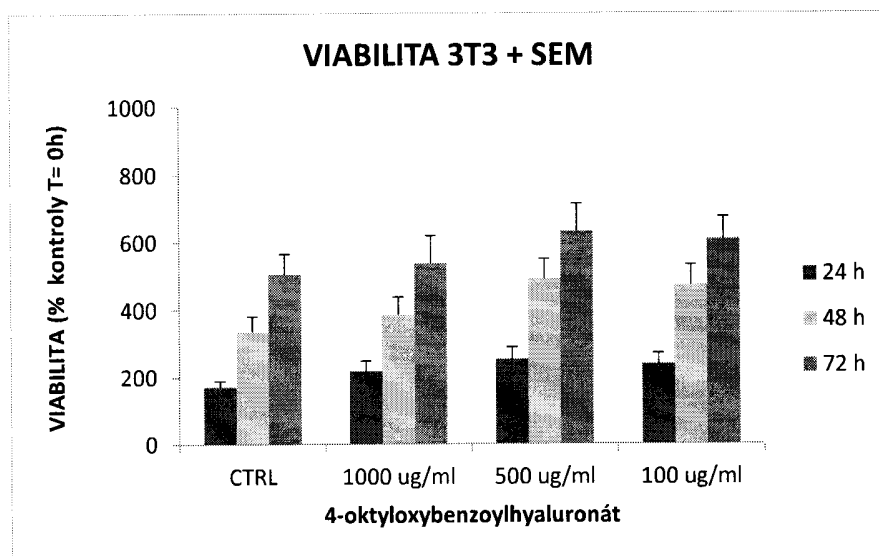
Obr. 7

7/8

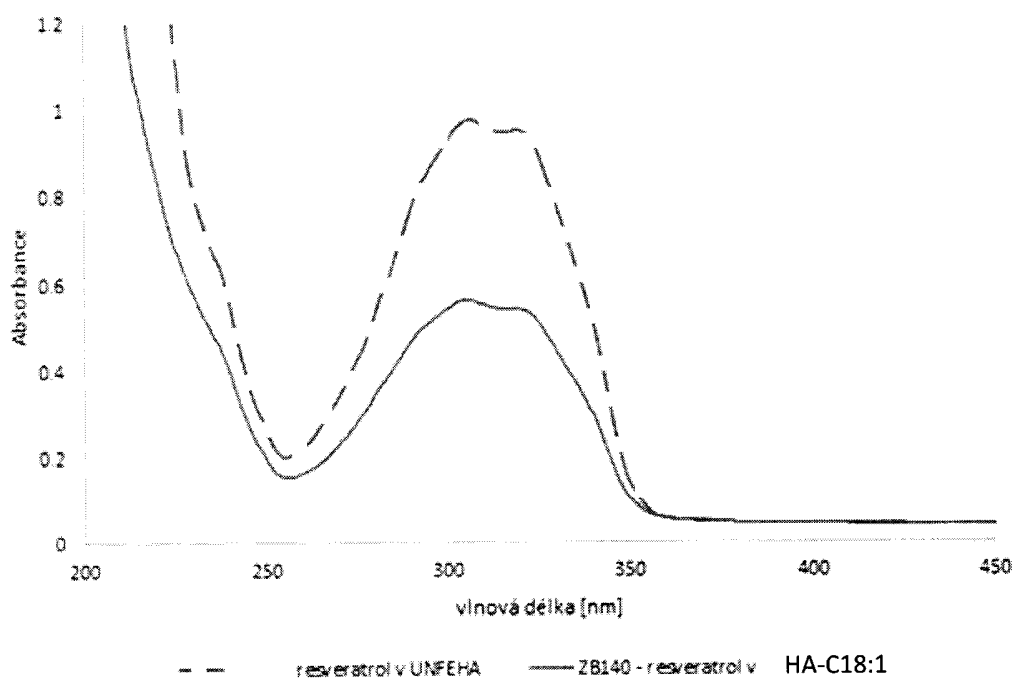
28.08.15

PV 2015 - 574

55

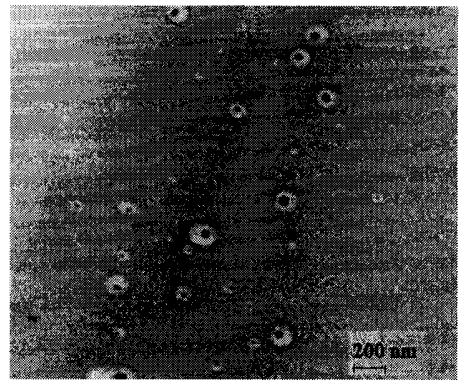
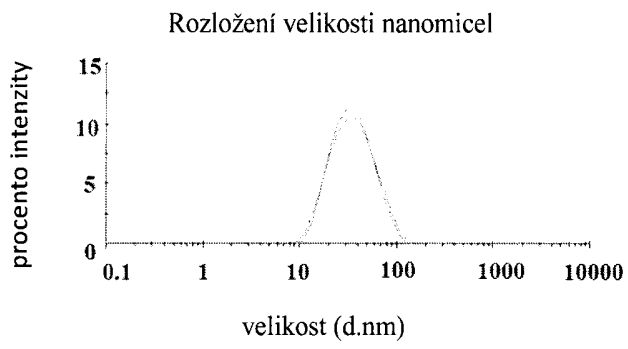


Obr. 8

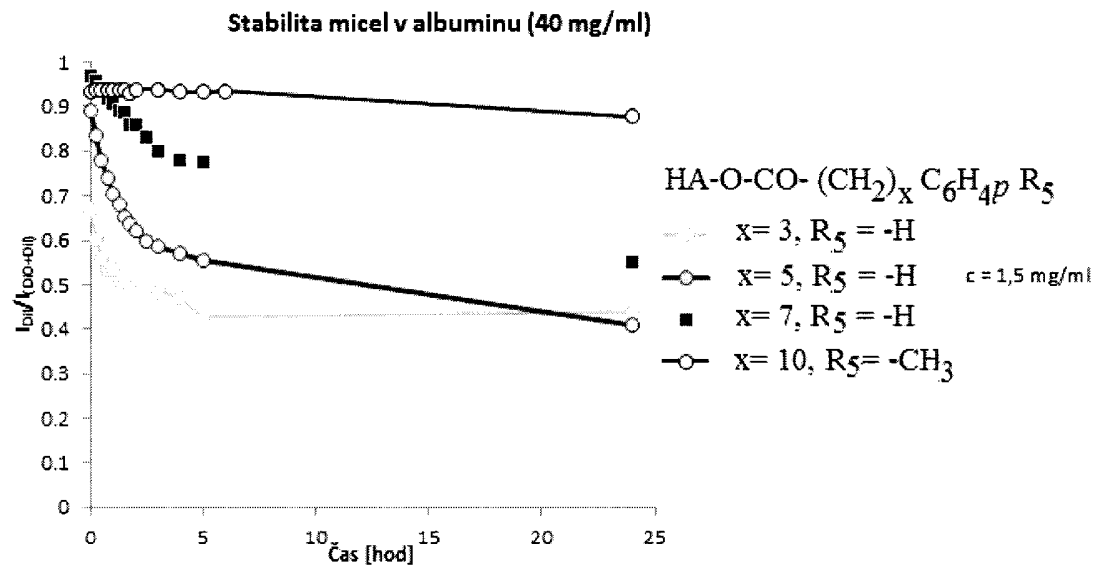


Obr. 9.

818 PV 2015-574
 28.08.15
 SK



Obr. 10



Obr. 11