

# PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(19)  
ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **17.03.2009**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **21.07.2010**  
(Věstník č. 29/2010)

(21) Číslo dokumentu:

**2009-168**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.:

**C08B 37/08** (2006.01)

**A61K 31/728** (2006.01)

**A61K 31/715** (2006.01)

(71) Přihlašovatel:

Contipro C, a.s., Dolní Dobrouč, CZ

(72) Původce:

Buffa Radovan Mgr. Ph.D., Humenné, SK  
Velebný Vladimír RNDr. CSc., Žamberk, CZ  
Pospíšilová Lucie, Svitavy, CZ  
Příkopová Eva, Kunvald, CZ  
Pravda Martin Mgr., Kočí, okr. Chrudim, CZ  
Nikodým Pavel Ing., Ústí nad Labem, CZ  
Palek Lukáš Mgr., Plzeň, CZ

(74) Zástupce:

KANIA, SEDLÁK, SMOLA Patentová a známková  
kancelář, Ing. František Kania, Mendlovo nám. 1a, Brno,  
60300

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Způsob přípravy derivátů kyseliny  
hyaluronové pomocí O-acyl-O'-  
alkylkarbonátu v přítomnosti  
substituovaného pyridinu**

(57) Anotace:

Řešení se týká způsobu přípravy derivátů kyseliny hyaluronové reakcí kyseliny hyaluronové s O-acyl-O'-alkylkarbonátem obecného vzorce  $R-CO-O-CO-O-R^1$  v přítomnosti substituovaného pyridinu obecného vzorce  $R^2$ ,  $C_5N$ . Reakce probíhá v DMSO v přítomnosti externí báze za vzniku O-acylovaných produktů. Navrhovaný postup vede oproti známým analogům k vyšším stupňům substituce a kratším reakčním časům. Pokud činidlo obsahuje dvě nebo více funkčních skupin  $R(CO-O-CO-O-R^1)_p$ , vznikají síťované deriváty kyseliny hyaluronové.

Způsob přípravy derivátů kyseliny hyaluronové pomocí O-acyl-O'-alkylkarbonátu v přítomnosti substituovaného pyridinu

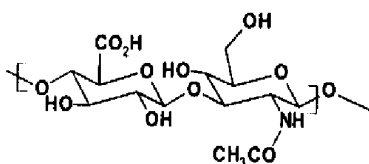
### Oblast techniky

Vynález se týká nového způsobu modifikace kyseliny hyaluronové za vzniku derivátů, kde dochází k substituci -OH skupiny polysacharidu skupinou -O-CO-R. Modifikace kyseliny hyaluronové je provedena pomocí O-acyl-O'-alkylkarbonátu v přítomnosti substituovaného pyridinu, které spolu tvoří komplex (O-acyl-O'-alkylkarbonát – substituovaný pyridin), v polárním aprotickém prostředí za přítomnosti organické báze. V případě, že činidlo obsahuje dvě nebo víc acylalkylkarbonátových skupin, vznikají síťované deriváty kyseliny hyaluronové s molekulovou hmotností řádově vyšší v porovnání s výchozím polysacharidem.

### Dosavadní stav techniky

Polysacharidy jsou polymery složené z jednoduchých monosacharidů (monomerních jednotek) spojených glykosidickou vazbou. Podle počtu opakujících se jednotek rozlišujeme oligosacharidy (2 až 10 jednotek) a polysacharidy (10 a více jednotek). Význam polysacharidů je značný. Polysacharidy plní funkci nutriční, ochrannou, stavební (celulóza, chitin) nebo zásobní (škrob). Polymery obecně jsou charakterizovány průměrnou molekulovou hmotností, která se běžně pohybuje okolo  $16 \cdot 10^3 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$  až  $16 \cdot 10^6 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ . Počet opakujících se jednotek je dán stupněm polymerizace.

Významným polysacharidem je kyselina hyaluronová:



komponovaná z opakujících se jednotek  $\beta$ -(1,3)-D-glukuronové kyseliny a  $\beta$ -(1,4)-N-acetyl-D-glukosaminu. Vyznačuje se velkou molekulovou hmotností  $5 \cdot 10^4$  až  $5 \cdot 10^6 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ , která závisí na způsobu izolace a výchozím materiálu. Kyselina hyaluronová, respektive její sůl hyaluronan, je nezbytnou součástí pojivových tkání, synoviální tekutiny kloubů, hraje významnou roli v řadě biologických procesů jako je hydratace, organizace proteoglykanů, diferenciací buněk, proliferace a angiogeneze. Tento značně hydrofilní polysacharid je ve vodě rozpustný ve formě soli v celé šíři pH.

Kyselina hyaluronová je zástupcem skupiny glykosaminoglykanů, která dále zahrnuje chondroitin sulfát, dermatan sulfát, keratan sulfát a heparan sulfát.

#### *Acylace kyseliny hyaluronové*

Acylace polysacharidů je nejčastěji využívaná metoda k zavedení alkylového řetězce, který mění vlastnosti převážně hydrofilních látek na látky hydrofobní. Reakce se nejčastěji provádí působením anhydridů příslušných kyselin, chloridů kyselin nebo samotnou kyselinou za přídavku katalyzátorů.

Příprava acyl-derivátů oligomerů kyseliny hyaluronové je patentována Couchmannem a kol. (US patent 4761401; 1988), kde acylace probíhá jak na hydroxylové, tak na amino skupině deacetylovaného hyaluronanu. *O*-acylace zahrnuje reakci s organickou kyselinou za přídavku kyselého katalyzátoru (minerální kyseliny, organické nebo Lewisovy kyseliny) a aktivačního činidla (*N,N'*-dicyklohexylcarbodiimid, 2-chlor-1-methyl pyridiniumiodid a *N,N*-karbonyl diimidazol), nebo používá anhydridů a chloridů kyselin v přítomnosti báze. Michinori a kol. (JP patent 7309902, 1995) připravili acylovanou kyselinu hyaluronovou reakcí s anhydridy karboxylových kyselin nebo jejich acylhalogenidy ve vodném prostředí obsahujícím s vodou mísitelné organické rozpouštědlo v přítomnosti katalyzátoru. Saponifikací acylových skupin kyseliny hyaluronové bylo docíleno derivátů s libovolným počtem acylových skupin. Chlorid kyseliny retinové a anhydrid kyseliny máselné použil k přípravě specifických derivátů hyaluronové kyseliny i Perbellini a kol. (WO 2004/056877 A1). Pro syntézu v prostředí *N,N*-dimethylformamidu byla použita kyselina hyaluronová ve formě tetrabutylamonných solí.

#### *Síťování kyseliny hyaluronové*

Síťování neboli „crosslinking“ kyseliny hyaluronové bylo popsáno několika způsoby. Mezi nejjednodušší způsoby patří síťování pomocí  $\text{POCl}_3$  (US 5 783 691). Balasz a kol. síťovali kyselinu hyaluronovou pomocí divinylsulfonu (US 4 582 865). Dalšími reaktivními elektrofilními vhodnými pro síťování jsou aldehydy (US 4 713 448). Velmi rozšířenými činidly schopnými reagovat se dvěma polymery jsou epoxidy nebo bisepoxidy (WO 86/00912, WO 2007/129828), kde nejznámějším zástupcem této skupiny je epichlorhydrin.

Použitím EDC je možné zvýšit reaktivitu karboxylové skupiny kyseliny hyaluronové, která je pak schopna síťovacích reakcí s polyanionickými sloučeninami (US 4 937 270). Jiným zástupcem polynukleofilních reaktantů jsou polyhydrazidy (WO 2006/001046). Způsob síťování kyseliny hyaluronové pomocí polyanhydridu, poly(alkyloylchloridu),

polyepoxidu, polykarbodiimidu byl shrnut v patentu (WO 00/46252). Při reakci bis karbodiimidu s kyselinou hyaluronovou (WO 2005/067994) dochází k síťování pomocí reaktivního elektrofilního činidla. Možnosti síťovat pomocí redox reakcí je zachycena v patentu (EP 1683812 A1), kde vzniká disulfidické přemostění z thiolových derivátů kyseliny hyaluronové. Zvláštní skupinu síťování tvoří fotochemické reakce. Je známo, že vinylenová skupina skořicové kyseliny nebo její aryl-substituovaný analog je schopný fotochemicky cyklizovat na cyklobutan. Tuto skutečnost využili autoři patentu (EP 1217008 A1), kteří N-deacylovaný derivát hyaluronové kyseliny acylovali na dusíku glucosaminové části polysacharidu s chloridem kyseliny skořicové. Samotné síťování proběhlo ozařováním světlem vlnové délky 280 nm. Kromě skořicové kyseliny je taky možné použít jiné fotoreaktivní skupiny navázané na kyselinu hyaluronovou (WO 97/18224, EP 0763754 A2), které ozářením světlem vhodné vlnové délky dávají síťované deriváty. Patenty, které se věnovaly acylaci a síťování kyseliny hyaluronové v přítomnosti báze nebo v bazickém rozpouštědle, byly publikovány Yui a kol (US 6 673 919), resp. Nguyenem a kol. (US 5690961).

#### *Příprava O-acyl-O'-alkylkarbonátů*

Klasickou metodou přípravy acylalkylkarbonátů je reakce karboxylových kyselin s alkylchlorformiáty v přítomnosti báze (nejčastěji terciárního aminu – triethylamin (TEA), pyridin, N-methylmorfolin, N-methylpyridin, diazabicykloundecen (J. Org. Chem. 26(7), 1961; 2161) v prostředí polárního aprotického rozpouštědla (J. Org. Chem.; 1958; 23(8); 1149-1152. Nejčastěji používanými rozpouštědly jsou diethylether (J. Org. Chem.; 1959; 24(6); 774-778), toluen (J. Org. Chem.; 1958; 23(8); 1149-1152.), tetrahydrofuran (J. Org. Chem.; 1960; 25(10); 1703-1707., J. Am. Chem. Soc. 1967, 89(19), 5012-5017), chloroform, dimethylaminoformamid (European Patent 0700973, J. Am. Chem. Soc. 1952, 74, 676), N-methylpyrrolidin a N,N'-dimethylacetamid (US Patent 5,550,225; Aug 27, 1996). Reakce je často prováděna při snížené teplotě 0 °C až -10 °C. Důvodem je nebezpečí rozkladu vznikajících acylalkylkarbonátů.

Tarbell v sérii studií prokázal, že se vesměs jedná o stabilní sloučeniny, které lze v mnoha případech izolovat v čisté formě (J. Org. Chem.; 1957; 22(3); 245-250). V případě izolace acylalkylkarbonátů zahrnuje proces i promytí reakční směsi roztokem NaHCO<sub>3</sub>, destilovanou vodou a roztokem HCl. To ukazuje na velice dobrou odolnost některých acylalkylkarbonátů vůči působeníází a kyselin při laboratorní teplotě. Tarbell ve svých studiích také prokázal, že přípravu acylalkylkarbonátů reakcí alkylchlorformiátu s karboxylovou kyselinou lze provádět za laboratorní teploty, popř. ve vřoucím diethyletheru.

Tento tradiční způsob přípravy byl modifikován i pro provedení ve vodném prostředí (patent DE 1,133,727). Příslušná kyselina je rozpuštěna ve vodě a je neutralizována roztokem hydroxidu sodného. K roztoku je přidána báze (N,N-dimethylcyklohexylamin, N,N-dimethylaminopyridin, methylamin,  $\text{NH}_3$ ) a alkylchloroformiát. Reakce probíhá při  $0^\circ\text{C}$  a reakční pH je udržováno mezi 6 až 7. Nevýhodou tohoto postupu je konkurenční reakce acylalkylkarbonátů se vznikajícím alkoholem. Jako reakční prostředí je výhodné použít inertní rozpouštědlo například chloroform (J. Org. Chem. 1995, 60, 7072-7074).

#### *Acylace hydroxysloučenin pomocí O-acyl-O'-alkylkarbonátů*

Acylalkylkarbonáty byly využívány jako acylační činidla při tvorbě amidů od počátku 50. let dvacátého století (J. Am. Chem. Soc.; 1951; 73(7); 3547-3547). Protože byly původně považovány za nestabilní sloučeniny, byly generovány *in situ* během reakce. Podrobnější studium tohoto typu látek ovšem naznačilo, že se může jednat o stabilní sloučeniny, a to zejména v případech, kdy jsou acylalkylkarbonáty odvozeny od karboxylových kyselin s vysokým bodem tání (J. Org. Chem.; 1958; 23(8); 1149-1152.). Později byla připravena a izolována celá řada acylalkylkarbonátů s různým typem substituce jak v acylové, tak karbonátové části molekuly. Dále bylo prokázáno, že se v mnoha případech může jednat o velice stabilní sloučeniny. Například k dosažení jejich termického rozkladu často dochází až při teplotách výrazně přesahujících  $100^\circ\text{C}$ . Toto ovšem platí pouze za předpokladu, že vyloučíme katalytický efekt bází, popřípadě rozpouštědel (J. Org. Chem.; 1959; 24(6); 774-778).

Obecně lze říci, že stabilita acylalkylkarbonátů vykazuje závislost na  $\text{pK}_a$  karboxylové kyseliny. Stabilitě acylalkylkarbonátů byla věnována značná pozornost a na základě mnoha studií byl vypracován model, jímž je popsán mechanismus jejich rozkladu (J. Org. Chem. Volume 26, Number 7, 1961; 2161, J. Org. Chem.; 1958; 23(8); 1149-1152., J. Org. Chem.; 1959; 24(6); 774-778, J. Org. Chem.; 1960; 25(10); 1703-1707., J. Org. Chem.; 1964; 29(5); 1168-1169, J. Org. Chem.; 1967; 32; 2188-2193, J. Org. Chem. Volume 26, Number 7, 1961; 2161, J. Org. Chem.; 1958, vol. 23, p. 1152, J. Am. Chem. Soc.; 1962; 84(21); 4113-4115, J. Org. Chem.; 1958; 23(12); 2044., J. Org. Chem.; 1964; 29(11); 3422-3423.). K rozkladu acylalkylkarbonátů může docházet dvěma cestami, jež si navzájem konkurují. Přesmyk vede ke vzniku esteru za uvolnění  $\text{CO}_2$ , zatímco disproportionační reakce dává vzniknout kromě  $\text{CO}_2$  i symetrickému anhydridu a diakylkarbonátu.

Ze struktury acylalkylkarbonátů vyplývá, že v jejich molekule se nacházejí dvě centra, která mohou podléhat nukleofilnímu ataku – karbonyl karboxylový a karbonyl karbonátový.

Poměr rychlostí průběhu obou konkurenčních reakcí, a tím i poměr, v jakém budou vznikat rozkladné produkty, je určen typem substituce obou center (J. Org. Chem.; 1959; 24(6); 774-778, J. Org. Chem.; 1960; 25(10); 1703-1707., J. Org. Chem. Volume 26, Number 7, 1961; 2161). Bylo prokázáno, že tento poměr není ovlivněn zředěním, teplotou ani přítomností báze. Tyto faktory mohou mít vliv jen na rychlost procesu jako celku (J. Org. Chem.; 1960; 25(10); 1703-1707., J. Org. Chem. Volume 26, Number 7, 1961; 2161).

Naproti tomu na využití acylalkylkarbonátů jako klasických *O*-acylačních činidel panují rozporuplné názory. Výraznou nevýhodou pro použití směsných anhydridů v tomto typu reakcí jsou vedlejší reakce probíhající mezi nezreagovaným acylalkylkarbonátem a alkoholem, který je uvolněn rozpadem karbonátu (J. Org. Chem.; 1957; 22(3); 245-250). Tomuto nežádoucímu vlivu lze předcházet použitím vysokého nadbytku alkoholu, jehož ester hodláme připravit (ideální je situace, kdy jej můžeme použít jako rozpouštědlo J. Org. Chem. 1995, 60, 7072-7074), nebo použitím takového výchozího acylalkylkarbonátu, který obsahuje sekundární či terciární alkohol.

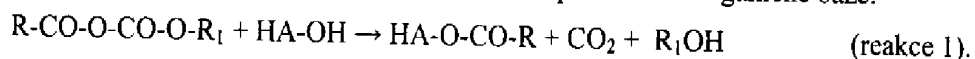
Přes výše zmíněné nevýhody se v patentové literatuře objevuje řada příkladů, kdy jsou acylalkylkarbonáty využity jako klasická *O*-acylační činidla. Philipe popisuje ve svém patentu (US Patent 5,550,225) regioselektivní acylaci D-maltózy směsnými anhydridy mastných kyselin za vzniku monoesterů D-maltózy v poloze 6'. Aktivace kyselin je prováděna nejčastěji triethylaminem, pyridinem, 4-dimethylaminopyridinem, tributylaminem nebo N-methylmorfolinem, v přítomnosti alkylchlorformiátu (např. isopropylchlorformiátu) v organickém rozpouštědle, např. v tetrahydrofuranu. Samotná acylace je prováděna v bezvodém pyridinu při laboratorní teplotě. Nevýhodou tohoto řešení je toxicita pyridinu a špatná rozpustnost kyseliny hyaluronové v pyridinu.

V patentové literatuře jsou popsány i postupy acylace polyolů, které jako reakční medium využívají vodu. Lalezari uvádí ve svých patentech (US Patent 5,498,708, WQ 91/01322) postup, kdy je reakce prováděna ve směsi led-voda, v níž je rozpuštěna příslušná kyselina, triethylamin, alkylchloroformiát a sacharid. Tato práce (US Patent 5,498,708) zahrnuje polyalkoholy s uhlíkovým řetězcem s třemi a více navázanými hydroxy skupinami, počínaje jednoduššími trioly jako glycerol a polysacharidy jako škrob, celulóza, amylóza, insulin, agar konče. Substituenty na kyslíku chlormravenčanu mohou být alkyly s počtem uhlíku 2-10 nebo aryly. V experimentální části je zmíněna příprava samotného smíšeného anhydridu za přítomnosti triethylaminu v ledové vodě. Připravené činidlo je v esterifikační reakci, která probíhá při pokojové teplotě ve vodě, ve 4 až 10-násobném nadbytku oproti esterifikovanému sacharidu.

Použití acylalkylkarbonátů jako esterifikačních činidel ve vodném prostředí je popsáno i jako cesta přípravy strukturně modifikovaných škrobů (US Patent 3,720,662).

Reakce je prováděna za mírných podmínek (20-40°C) a postup vyžaduje udržovat pH reakce v rozmezí 7 – 9,5. Proces může probíhat i v heterogenní fázi (suspenze škrobu) nebo i bez použití rozpouštědla.

PV 2006-605 popisuje způsob modifikace polysacharidů, zejména kyseliny hyaluronové, substitucí –OH skupiny polysacharidu skupinou –O-CO-R pomocí acylalkylkarbonátů v polárním aprotickém prostředí za přítomnosti organické báze:



Tato reakce probíhá jen velmi nepatrně, a proto nevýhodou PV 2006-605 je velmi nízký stupeň substituce, což má vliv i na vlastnosti konečného produktu, který je modifikován jen nepatrně.

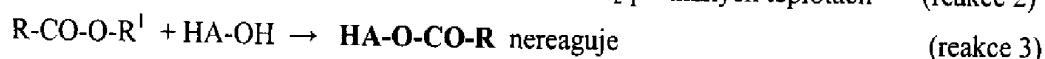
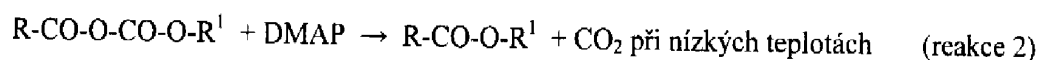
Řešení uvedená v této části popisují acylace polysacharidů, které obsahují volné hydroxy skupiny, na kterých daná reakce probíhá. Mezi nevýhody těchto řešení patří nízký stupeň substituce polymerů, který je způsoben nestabilitou použitého činidla (acylalkylkarbonátu). Také skutečnost, že některé acylace probíhají v heterogenním systému, neprospívá výraznější modifikaci. Způsob podle vynálezu se zabývá modifikací kyseliny hyaluronové, probíhá v homogenním systému a dává oproti známým analogům výrazně vyšší stupně substituce.

### **Podstata vynálezu**

Podstatou vynálezu je způsob přípravy derivátů kyseliny hyaluronové reakcí kyseliny hyaluronové pomocí O-acyl-O'-alkylkarbonátu v přítomnosti substituovaného pyridinu v aprotickém prostředí. Reakce probíhá v DMSO v přítomnosti externí báze za vzniku O-acylovaných produktů. Ve způsobu podle vynálezu je kyselina hyaluronová s výhodou ve formě volné kyseliny, má molekulovou hmotnost v rozsahu  $1 \cdot 10^4$  až  $5 \cdot 10^6$  g.mol<sup>-1</sup>, s výhodou  $10^5$  g.mol<sup>-1</sup>, a polydisperzitu v rozsahu 1,02 až 5,0. Zde uváděné molekulové hmotnosti kyseliny hyaluronové a jejích derivátů jsou hmotnostně střední molekulové hmotnosti. Kyselina hyaluronová může být i ve formě solí, např. ve formě sodné, draselné, vápenaté nebo jiné soli. Aprotické prostředí zahrnuje DMSO, jako rozpouštědlo, a bázi. Navrhovaný postup vede oproti známým analogům k vyšším stupňům substituce a kratším reakčním časům. Navázání acylového zbytku esterickou vazbou na polysacharid probíhá při 20 až 80 °C, s výhodou při 20 °C. V případě nepřítomnosti substituovaného pyridinu byly pozorovány výrazně nižší stupně substituce. Příslušná acylace probíhá buď přímo na některé hydroxy skupině, anebo na karboxylátové skupině glukoronové části polysacharidu a následně intramolekulově na hydroxy skupině – viz Schéma 1.

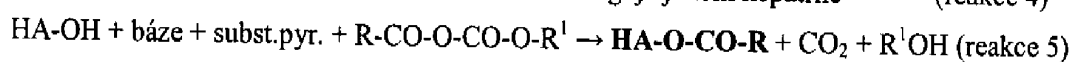


Substituovaný pyridin je znám tím, že po přidání k acylalkylkarbonátům výrazně urychluje jejich rozklad na příslušný ester a CO<sub>2</sub>, a to dokonce i při teplotách kolem 0 °C (reakce 2), přičemž vzniklý ester R-CO-O-R<sup>1</sup> už nemůže reagovat jako acylační činidlo (reakce 3):



Proto se použití substituovaného pyridinu pro acylaci acylalkylkarbonáty odborníkovi jeví jako nevhodné, protože se předpokládá rychlý rozklad činidla (acylalkylkarbonátu), které tedy nemůže acylovat.

V navrhovaném postupu se podařilo vhodným výběrem experimentálních podmínek (reakce 5) vyhnout rychlému nežádoucímu rozkladu *O*-acyl-*O'*-alkylkarbonátů se substituovaným pyridinem na nereaktivní estery, přičemž dosažený stupeň substituce je výrazně vyšší než v analogických příkladech známých v literatuře (reakce 4)



V případě, že činidlo (acylalkylkarbonát) odpovídá obecnému vzorci R(CO-O-CO-O-R<sup>1</sup>)<sub>n</sub>, kde n > 1, tj. činidlo obsahuje dvě nebo více acylalkylkarbonátových skupin, například R(CO-O-CO-O-R<sup>1</sup>)<sub>2</sub>, vznikají síťované deriváty kyseliny hyaluronové polymer-O-CO-R-CO-O-polymer.

### Příklady provedení vynálezu

DS = stupeň substituce = 100 % . molární množství navázaného substituentu / molární množství všech dimerů polysacharidu

#### Příklad 1

##### *Příprava O-ethyl-O'-palmitoylkarbonátu*

Do roztoku kyseliny palmitové (1 g) v etheru (50 ml) byl přidán triethylamin (1,3 eq) a směs se míchala 5 minut při teplotě místnosti. Pak byla ochlazena na -15 °C a 5 minut se přidával ethylchloroformiát (1,3 eq), přičemž teplota nepřesáhla -10 °C. Vzniklá suspenze se míchala 2 h za pomalého zahřátí směsi na -5 °C, pak byla rychle odfiltrována, filtrát odpařen a skladován při -15 °C.

$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ) ( $\delta$  168 ppm  $-\text{CO}-\text{O}-\text{COOEt}$ , 148 ppm  $-\text{COO}-\text{CO}-\text{OEt}$ , 66 ppm  $-\text{COO}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ , 34 ppm  $-\text{CH}_2-\text{COO}-$ , 23-33 ppm  $-\text{C}-\text{CH}_2-\text{C}-$ , 15 ppm  $-\text{COO}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ , 14 ppm  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ ).

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  4.32 (q, 2H,  $-\text{COO}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ ), 2.46 (t, 2H,  $-\text{CH}_2-\text{COO}-$ ), 1.68 (m, 2H,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COO}-$ ), 1.63 (m, 2H,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COO}-$ ), 1.37 (t, 3H,  $-\text{COO}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ ), 1.25-1.40 (m, 22H,  $-\text{C}-\text{CH}_2-\text{C}-$ ), 0.90 (t, 3H,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ ).

#### Příklad 2

##### *Příprava O-(2-antrachinonkarbonyl)-O'-ethylkarbonátu*

Do roztoku kyseliny (1 g) 2-antrachinonkarboxylové v acetonu (50 ml) byl přidán triethylamin (1,3 eq) a směs se míchala 5 minut při teplotě místnosti. Pak byla ochlazená na  $-15^\circ\text{C}$  a 5 minut se přidával ethylchloroformiát (1,3 eq), přičemž teplota nepřesáhla  $-10^\circ\text{C}$ . Vzniklá suspenze se míchala 2 h za pomalého zahřátí směsi na  $-5^\circ\text{C}$ , pak byla rychle odfiltrována, filtrát odpařen a skladován při  $-15^\circ\text{C}$ .

$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ) ( $\delta$  182 ppm  $\text{C}_{\text{Ar}}-\text{CO}-\text{C}_{\text{Ar}}$ , 181 ppm  $\text{C}_{\text{Ar}}-\text{CO}-\text{C}_{\text{Ar}}$ , 159 ppm  $\text{C}_{\text{Ar}}-\text{COO}-\text{COOEt}$ , 148 ppm  $\text{C}_{\text{Ar}}-\text{COO}-\text{COOEt}$ , 135-125 ppm  $-\text{C}_{\text{Ar}}$ , 62 ppm  $-\text{COO}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ , 15 ppm  $-\text{COO}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ ).

#### Příklad 3

##### *Příprava O-(2-acetoxybenzoyl)-O'-ethylkarbonátu*

Do roztoku kyseliny acetylsalicylové (1 g) v etheru (50 ml) byl přidán triethylamin (1,3 eq) a směs se míchala 5 minut při teplotě místnosti. Pak byla ochlazená na  $-15^\circ\text{C}$  a 5 minut se přidával ethylchloroformiát (1,3 eq), přičemž teplota nepřesáhla  $-10^\circ\text{C}$ . Vzniklá suspenze se míchala 2 h za pomalého zahřátí směsi na  $-5^\circ\text{C}$ , pak byla rychle odfiltrována, filtrát odpařen a skladován při  $-15^\circ\text{C}$ .

$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ) ( $\delta$  169 ppm  $-\text{CO}-\text{O}-\text{COOEt}$ , 158 ppm  $\text{CH}_3-\text{CO}-$ , 151 ppm  $\text{C}_{\text{ar}}-\text{O}-\text{CO}-$ , 149 ppm  $-\text{COO}-\text{CO}-\text{OEt}$ , 135 ppm  $\text{C}_{\text{ar}}$ , 132 ppm  $\text{C}_{\text{ar}}$ , 126 ppm  $\text{C}_{\text{ar}}$ , 124 ppm  $\text{C}_{\text{ar}}$ , 120 ppm  $\text{C}_{\text{ar}}$ , 66 ppm  $-\text{COO}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ , 21 ppm  $\text{CH}_3-\text{CO}-$ , 14 ppm  $-\text{COO}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ ).

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.04 (d, 1H, ArH-6), 7.64 (t, 1H, ArH-4), 7.32 (t, 1H, ArH-5), 7.12 (d, 1H, ArH-3), 4.38 (q, 2H,  $-\text{COO}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ ), 2.35 (s, 3H,  $\text{CH}_3-\text{CO}-$ ), 1.40 (t, 3H,  $-\text{COO}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ ).

## Příklad 4

*Příprava O,O'-bis(etoxykarbonyl)adipátu*

Do roztoku kyseliny adipové (1 g) v etheru (50 ml) byl přidán triethylamin (2,6 eq) a směs se míchala 30 minut při teplotě místnosti. Pak byla ochlazená na  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$  a 5 minut se přidával ethylchloroformiát (2,6 eq), přičemž teplota nepřesáhla  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Vzniklá suspenze se míchala 2 h za pomalého zahřátí směsi na  $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ , pak rychle odfiltrována, tuhý podíl byl promyt 3 x 30 ml chladného etheru, filtrát odpařen a skladován při  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ) ( $\delta$  167ppm  $-\text{CO}-\text{O}-\text{COOEt}$ , 149ppm  $-\text{COO}-\text{CO}-\text{OEt}$ , 66ppm  $-\text{COO}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ , 34ppm  $-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ , 23ppm  $-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ , 14ppm  $-\text{COO}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ ).

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  4.30 (q, 2H,  $-\text{COO}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ ), 2.49 (m, 2H,  $-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ ), 1.74 (m, 2H,  $-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ ), 1.40 (t, 3H,  $-\text{COO}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ )

## Příklad 5

*Acylace kyseliny hyaluronové pomocí O-ethyl-O'-palmitoylkarbonátu*

Do roztoku kyseliny hyaluronové (0,10 g, 20 kDa) v dimethylsulfoxidu (10 ml) byl přidán triethylamin (4 eq) a 4-dimethylaminopyridin (0,4 eq) a směs se míchala 1 h při teplotě místnosti. Do výsledného roztoku byl pak přidán O-ethyl-O'-palmitoylkarbonát (2 eq, příklad 1) a směs se míchala při teplotě  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$  1 h bez přístupu vzdušné vlhkosti. Roztok byl pak ochlazen na teplotu místnosti, přidal se dvacetinásobek demineralizované vody a směs byla 7-krát dialyzovaná proti 5 l demineralizované vody. Výsledný roztok byl filtrován a odpařen za vzniku 0,095 g produktu ve formě průhledného filmu.

DS 5% (stanoveno z NMR, podrobně příklad 8)

## Příklad 6

*Acylace kyseliny hyaluronové pomocí O-ethyl-O'-palmitoylkarbonátu*

Do roztoku kyseliny hyaluronové (0,10 g, 20 kDa) v dimethylsulfoxidu (10 ml) byl přidán triethylamin (4 eq) a 4-dimethylaminopyridin (2 eq) a směs se míchala 1 h při teplotě místnosti. Do výsledného roztoku byl pak přidán O-ethyl-O'-palmitoylkarbonát (2 eq, příklad 1) a směs se míchala při teplotě  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$  1 h bez přístupu vzdušné vlhkosti. Roztok byl pak ochlazen na teplotu místnosti, přidal se dvacetinásobek demineralizované vody a směs byla 7-krát dialyzovaná proti 5 l demineralizované vody. Výsledný roztok byl filtrován a odpařen za vzniku 0,098 g produktu ve formě průhledného filmu.

DS 15% (stanoveno z NMR, podrobně příklad 8)

#### Příklad 7

##### *Acylace kyseliny hyaluronové pomocí O-ethyl-O'-palmitoylkarbonátu*

Do roztoku kyseliny hyaluronové (0,10 g, 20 kDa) v dimethylsulfoxidu (10 ml) byl přidán triethylamin (4 eq) a 4-dimethylaminopyridin (2 eq) a směs se míchala 1 h při teplotě místnosti. Do výsledného roztoku byl pak přidán O-ethyl-O'-palmitoylkarbonát (2 eq, příklad 1) a směs se míchala při teplotě 60 °C 1 h bez přístupu vzdušné vlhkosti. Roztok byl pak ochlazen na teplotu místnosti, přidal se dvacetinásobek demineralizované vody a směs byla 7-krát dialyzovaná proti 5 l demineralizované vody. Výsledný roztok byl filtrován a odpařen za vzniku 0,096 g produktu ve formě průhledného filmu.

DS 10% (stanoveno z NMR, podrobně příklad 8)

#### Příklad 8

##### *Acylace kyseliny hyaluronové pomocí O-ethyl-O'-palmitoylkarbonátu*

Do roztoku kyseliny hyaluronové (0,10 g, 20 kDa) v dimethylsulfoxidu (10 ml) byl přidán triethylamin (4 eq) a 4-dimethylaminopyridin (2 eq) a směs se míchala 1 h při teplotě místnosti. Do výsledného roztoku byl pak přidán O-ethyl-O'-palmitoylkarbonát (2 eq, příklad 1) a směs se míchala při teplotě 20 °C 24h bez přístupu vzdušné vlhkosti. Roztok byl pak ochlazen na teplotu místnosti, přidal se dvacetinásobek demineralizované vody a směs byla 7-krát dialyzovaná proti 5 l demineralizované vody. Výsledný roztok byl filtrován a odpařen za vzniku 0,098 g produktu ve formě průhledného filmu.

DS 15% (stanoveno z NMR)

Analytická data hyaluronanu acylovaného kyselinou palmitovou:

<sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O) δ 4.28 (m, 2H, -COO-CH<sub>2</sub>-polymer), 2.40 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-COO-), 1.65 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-COO-), 1.60 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-COO-), 1.25-1.40 (m, 22H, -C-CH<sub>2</sub>-C-), 0.90 (m, 3H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>).

DOSY NMR (D<sub>2</sub>O) logD (2.0ppm, CH<sub>3</sub>-CO-NH-polymer) ~ -11.3m<sup>2</sup>/s

logD (1.65ppm, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-COO-) ~ -11.5m<sup>2</sup>/s

logD (1.25-1.40ppm, -C-CH<sub>2</sub>-C-) ~ -11.5m<sup>2</sup>/s,

logD (H<sub>2</sub>O) ~ -8.6m<sup>2</sup>/s,

IR(KBr)1735cm<sup>-1</sup>

#### Příklad 9

##### *Acylace kyseliny hyaluronové pomocí O,O'-bis(etoxykarbonyl)adipátu*

Do roztoku kyseliny hyaluronové (0,10 g, 30 kDa) v dimethylsulfoxidu (10 ml) byl přidán triethylamin (4 eq) a 4-dimethylaminopyridin (0,2 eq) a směs se míchala 1 h při teplotě místnosti. Do výsledného roztoku byl pak přidán O,O'-bis(etoxykarbonyl)adipát (2 eq,

příklad 4) a směs se míchala při teplotě 20 °C 1 h bez přístupu vzdušné vlhkosti. Roztok byl pak ochlazen na teplotu místnosti, přidal se dvacetinásobek demineralizované vody a směs byla 7-krát dialyzovaná proti 5 l demineralizované vody. Výsledný roztok byl filtrován a odpařen za vzniku 0,1 g produktu ve formě průhledného filmu.

DS 5% (stanoveno z NMR, podrobně příklad 11)

#### Příklad 10

##### *Acylace kyseliny hyaluronové pomocí O,O'-bis(etoxykarbonyl)adipátu*

Do roztoku kyseliny hyaluronové (0,10 g, 2000 kDa) v dimethylsulfoxidu (20 ml) byl přidán triethylamin (4 eq) a 4-dimethylaminopyridin (2 eq) a směs se míchala 1 h při teplotě místnosti. Do výsledného roztoku byl pak přidán O,O'-bis(etoxykarbonyl)adipát (2 eq, příklad 4) a směs se míchala při teplotě 60 °C 1 h bez přístupu vzdušné vlhkosti. Roztok byl pak ochlazen na teplotu místnosti, přidal se dvacetinásobek demineralizované vody a směs byla 7-krát dialyzovaná proti 5 l demineralizované vody. Výsledný roztok byl filtrován a odpařen za vzniku 0,11 g produktu ve formě průhledného filmu.

DS 20% (stanoveno z NMR, podrobně příklad 11)

#### Příklad 11

##### *Acylace kyseliny hyaluronové pomocí O,O'-bis(etoxykarbonyl)adipátu*

Do roztoku kyseliny hyaluronové (0,10 g, 30 kDa) v dimethylsulfoxidu (10 ml) byl přidán triethylamin (4 eq) a 4-dimethylaminopyridin (2 eq) a směs se míchala 1 h při teplotě místnosti. Do výsledného roztoku byl pak přidán O,O'-bis(etoxykarbonyl)adipát (2 eq, příklad 4) a směs se míchala při teplotě 20 °C 1 h bez přístupu vzdušné vlhkosti. Roztok byl pak ochlazen na teplotu místnosti, přidal se dvacetinásobek demineralizované vody a směs byla 7-krát dialyzovaná proti 5 l demineralizované vody. Výsledný roztok byl filtrován a odpařen za vzniku 0,12 g produktu ve formě průhledného filmu.

DS 50% (stanoveno z NMR)

Analytická data hyaluronanu acylovaného kyselinou adipovou:

<sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O)      δ 4.27 ( m, 2H, -COO-CH<sub>2</sub>-polymer ), 2.43 ( m, 4H, -CO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-),  
1.68 ( m, 4H, -CO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>- )

DOSY NMR (D<sub>2</sub>O)    logD (2.0ppm, CH<sub>3</sub>-CO-NH-polymer) ~ -11.0m<sup>2</sup>/s

logD (2.43, -CO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-) ~ -11.0m<sup>2</sup>/s

logD (1.68, -CO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-) ~ -11.0m<sup>2</sup>/s

logD (H<sub>2</sub>O) ~ -8.6m<sup>2</sup>/s

IR(KBr)            1738cm<sup>-1</sup>

GPC SEC-MALLS    Mw produktu 1600 kDa (1600 kg.mol<sup>-1</sup>)

## Příklad 12

*Acylace kyseliny hyaluronové pomocí O-(2-antrachinonkarbonyl)-O'-ethylkarbonátu*

Do roztoku kyseliny hyaluronové (0,10 g, 30 kDa) v dimethylsulfoxidu (10 ml) byl přidán triethylamin (4 eq) a 4-dimethylaminopyridin (2 eq) a směs se míchala 1 h při teplotě místnosti. Do výsledného roztoku byl pak přidán *O*-(2-antrachinonkarbonyl)-*O'*-ethylkarbonát (2 eq, příklad 2) a směs se míchala při teplotě 20 °C 24 h bez přístupu vzdušné vlhkosti. Roztok byl pak ochlazen na teplotu místnosti, přidal se dvacetinásobek demineralizované vody a směs byla 7-krát dialyzovaná proti 5L-demineralizované vody. Výsledný roztok byl filtrován a odpařen za vzniku 0,1g produktu ve formě průhledného filmu. DS 5% (stanoveno z NMR, podrobně příklad 13)

## Příklad 13

*Acylace kyseliny hyaluronové pomocí O-(2-antrachinonkarbonyl)-O'-ethylkarbonátu*

Do roztoku kyseliny hyaluronové (0,10g, 200kDa) v dimethylsulfoxidu (10ml) byl přidán triethylamin (4eq) a 4-dimethylaminopyridin (2eq) a směs se míchala 1h při teplotě místnosti. Do výsledného roztoku byl pak přidán *O*-(2-antrachinonkarbonyl)-*O'*-ethylkarbonátu (2 eq, příklad 2) a směs se míchala při teplotě 20 °C 24 h bez přístupu vzdušné vlhkosti. Roztok byl pak ochlazen na teplotu místnosti, přidal se dvacetinásobek demineralizované vody a směs byla 7-krát dialyzovaná proti 5 l demineralizované vody. Výsledný roztok byl filtrován a odpařen za vzniku 0,1 g produktu ve formě průhledného filmu.

DS 5% (stanoveno z NMR)

Analytická data hyaluronanu acylovaného kyselinou 2-antrachinonkarboxylovou:

<sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O)      δ 8.85 ( m, 1H, ArH-1), 8.50 ( m, 1H, ArH-3), 8.40 ( m, 1H, ArH-4),  
8.36 (m, 2H, ArH-5,8), 7.97 ( m, 2H, ArH-6,7), 4.32 ( m, 2H, -COO-CH<sub>2</sub>-polymer )

IR(KBr)              1738cm<sup>-1</sup>

GPC SEC-MALLS    UV aktivní látka navázána na polymer (UV detektor 280 nm)

## Příklad 14

*Acylace kyseliny hyaluronové pomocí O-(2-acetoxybenzoyl)-O'-ethylkarbonátu*

Do roztoku kyseliny hyaluronové (0,10 g, 30 kDa) v dimethylsulfoxidu (10 ml) byl přidán triethylamin (4 eq) a 4-dimethylaminopyridin (2 eq) a směs se míchala 1 h při teplotě místnosti. Do výsledného roztoku byl pak přidán *O*-(2-acetoxybenzoyl)-*O'*-ethylkarbonát (2 eq, příklad 3) a směs se míchala při teplotě 20 °C 24 h bez přístupu vzdušné vlhkosti. Roztok byl pak ochlazen na teplotu místnosti, přidal se dvacetinásobek demineralizované

vody a směs byla 7-krát dialyzovaná proti 5 l demineralizované vody. Výsledný roztok byl filtrován a odpařen za vzniku 0,1 g produktu ve formě průhledného filmu.

DS 10% (stanoveno z NMR, podrobně příklad 16)

#### Příklad 15

*Acylace kyseliny hyaluronové pomocí O-(2-acetoxybenzoyl)-O'-ethylkarbonátu*

Do roztoku kyseliny hyaluronové (0,10 g, 200 kDa) v dimethylsulfoxidu (10 ml) byl přidán triethylamin (4 eq) a 4-diethylaminopyridin (2 eq) a směs se míchala 1 h při teplotě místnosti. Do výsledného roztoku byl pak přidán O-(2-acetoxybenzoyl)-O'-ethylkarbonát (2 eq, příklad 3) a směs se míchala při teplotě 60 °C 24 h bez přístupu vzdušné vlhkosti. Roztok byl pak ochlazen na teplotu místnosti, přidal se dvacetinásobek demineralizované vody a směs byla 7-krát dialyzovaná proti 5 l demineralizované vody. Výsledný roztok byl filtrován a odpařen za vzniku 0,1 g produktu ve formě průhledného filmu.

DS 10% (stanoveno z NMR, podrobně příklad 16)

#### Příklad 16

*Acylace kyseliny hyaluronové pomocí O-(2-acetoxybenzoyl)-O'-ethylkarbonátu*

Do roztoku kyseliny hyaluronové (0,10 g, 200 kDa) v dimethylsulfoxidu (10 ml) byl přidán triethylamin (4 eq) a chinolin (2 eq) a směs se míchala 1 h při teplotě místnosti. Do výsledného roztoku byl pak přidán O-(2-acetoxybenzoyl)-O'-ethylkarbonát (2 eq, příklad 3) a směs se míchala při teplotě 60 °C 24 h bez přístupu vzdušné vlhkosti. Roztok byl pak ochlazen na teplotu místnosti, přidal se dvacetinásobek demineralizované vody a směs byla 7-krát dialyzovaná proti 5 l demineralizované vody. Výsledný roztok byl filtrován a odpařen za vzniku 0,1 g produktu ve formě průhledného filmu.

DS 10% (stanoveno z NMR)

Analytická data hyaluronanu acylovaného kyselinou acetylsalicylovou:

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{H}_2\text{O}$ )  $\delta$  8.01 (m, 1H, ArH-6), 7.55 (m, 1H, ArH-4), 7.28 (m, 1H, ArH-5), 7.05 (m, 1H, ArH-3), 4.28 (m, 2H,  $-\text{COO}-\text{CH}_2$ -polymer)

GPC SEC-MALLS UV aktivní látka navázána na polymer (UV detektor 270 nm)

## PATENTOVÉ NÁROKY

1. Způsob přípravy derivátů kyseliny hyaluronové acylací pomocí *O*-acyl-*O'*-alkylkarbonátu obecného vzorce



kde  $n$  je 1 až 7 a  $R$  a  $R^1$  představují lineární nebo rozvětvený řetězec  $C_1 - C_{30}$  volitelně s obsahem aromatických nebo heteroaromatických skupin,

**vyznačující se tím, že**

kyselina hyaluronová reaguje v aprotickém prostředí s *O*-acyl-*O'*-alkylkarbonátem v přítomnosti substituovaného pyridinu obecného vzorce



(II),

kde  $R$  zahrnuje volitelně vodík nebo skupiny alkyloxy, dialkylamino a alkyl, kde alkyl představuje alkylový, lineární nebo rozvětvený řetězec  $C_1 - C_{30}$  volitelně s obsahem aromatických nebo heteroaromatických skupin, a kde alespoň jeden  $R$  je jiný než vodík.

2. Způsob přípravy podle nároku 1, **vyznačující se tím, že** kyselina hyaluronová je ve formě volné kyseliny nebo soli.
3. Způsob přípravy podle kteréhokoli z nároků 1 nebo 2, **vyznačující se tím, že** kyselina hyaluronová má molekulovou hmotnost v rozsahu  $1 \cdot 10^4$  až  $5 \cdot 10^6 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$  a polydisperzitu v rozsahu 1,02 až 5,0.
4. Způsob přípravy podle kteréhokoli z nároků 1 až 3, **vyznačující se tím, že** aprotické prostředí zahrnuje DMSO, jako rozpouštědlo, a bázi.
5. Způsob přípravy podle nároku 4, **vyznačující se tím, že** báze zahrnuje dusíkaté organické sloučeniny obecného vzorce  $R_3N$ , kde  $R$  je alkylový lineární nebo rozvětvený řetězec  $C_1 - C_{30}$ , volitelně s obsahem aromatických nebo heteroaromatických skupin.
6. Způsob přípravy podle kteréhokoli z předchozích nároků, **vyznačující se tím, že** reakce kyseliny hyaluronové s *O*-acyl-*O'*-alkylkarbonátem v přítomnosti substituovaného pyridinu probíhá při teplotách  $20^\circ\text{C}$  až  $80^\circ\text{C}$  po dobu nejméně 1 minuty.

7. Způsob přípravy podle kteréhokoli z předchozích nároků, **vyznačující se tím, že** se nejprve připraví a izoluje *O*-acyl-*O'*-alkylkarbonát, následně se zvlášť připraví reakční směs obsahující kyselinu hyaluronovou v aprotickém prostředí obsahujícím rozpouštědlo, bázi a substituovaný pyridin, a pak se k reakční směsi přidá *O*-acyl-*O'*-alkylkarbonát v čisté formě v množství nejméně 0,1 ekvivalentů počítáno na dimer kyseliny hyaluronové.
8. Způsob přípravy podle kteréhokoli z předchozích nároků, **vyznačující se tím, že** substituovaný pyridin je zastoupen v reakční směsi v rozsahu 0,01 až 10 ekvivalentů počítáno na dimer kyseliny hyaluronové.