

ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

ÚŽITKOVÝ VZOR

- (21) Číslo prihlášky: **50027-2022**
 (22) Dátum podania prihlášky: **3. 9. 2020**
 (30) Údaje o prioritě: **PUV 2019-36602, 6. 9. 2019, CZ**
 (43) Dátum zverejnenia prihlášky: **27. 7. 2022**
 Vestník ÚPV SR č.: **14/2022**
 (45) Dátum oznámenia o sprístupnení dokumentu: **24. 11. 2022**
 Vestník ÚPV SR č.: **22/2022**
 (62) Číslo pôvodnej prihlášky v prípade vylúčenej prihlášky:
 (67) Číslo pôvodnej patentovej prihlášky v prípade odbočenia:
 (86) Číslo podania medzinárodnej prihlášky podľa PCT: **PCT/CZ2020/050065**
 (87) Číslo zverejnenia medzinárodnej prihlášky podľa PCT: **WO2021/043349**
 (96) Číslo podania európskej patentovej prihlášky:

(11) Číslo dokumentu:

9649

(13) Druh dokumentu: **Y1**

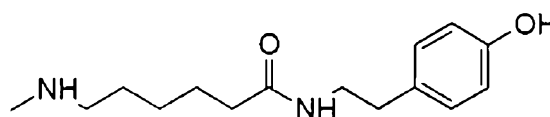
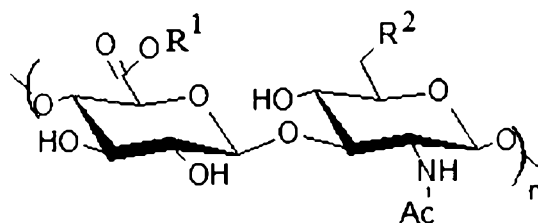
(51) Int. Cl.:

C08L 5/08 (2006.01)
A61K 47/36 (2006.01)
A61K 31/728 (2006.01)
A61K 31/737 (2006.01)
C08L 101/14 (2006.01)
C08B 37/08 (2006.01)
C08J 3/075 (2006.01)
C08J 3/24 (2006.01)

- (73) Majiteľ: **Contipro a.s., Dolní Dobrouč, CZ;**
 (72) Pôvodca: **Toropitsyn Evgeniy, Ing., Praha, CZ;**
Pravda Martin, PharmDr., PhD., Sruby, CZ;
Kovářová Lenka, Ing., Frýdek-Místek, CZ;
Bystroňová Julie, Ing., Karviná, CZ;
Velebný Vladimír, doc. RNDr., CSc., Žamberk, CZ;
 (74) Zástupca: **MAJLINGOVÁ & PARTNERS, s. r. o., Bratislava, SK;**

(54) Názov: **Hydrogél na báze zosieťovaného hydroxyfenylového derivátu kyseliny hyalurónovej**

- (57) Anotácia:
 Hydrogél na báze zosieťovaného hydroxyfenylového derivátu kyseliny hyalurónovej obsahuje molekuly hydroxyfenylového derivátu hyalurónovej kyseliny, HA-TA, alebo jeho farmaceuticky prijateľnú soľ podľa všeobecného vzorca (I), kde n je v rozmedzí 2 až 7 500 a kde R^1 je H^+ alebo ión alkalickéj soli, alebo soli alkalických zemín a R^2 je OH alebo tyramínový substituent podľa všeobecného vzorca (II), pričom v rámci jednej molekuly hydroxyfenylového derivátu hyalurónovej kyseliny alebo jeho farmaceuticky prijateľnej soli podľa všeobecného vzorca (I) je aspoň jeden R^2 tyramínový substituent podľa všeobecného vzorca (II), a pričom aspoň dva tyramínové substituenty podľa všeobecného vzorca (II) sú spojené prostredníctvom kovalentnej väzby v ktorejkoľvek ortopolohe fenylových skupín, a ďalej obsahuje chondroitín sulfát alebo jeho farmaceuticky prijateľnú soľ vybranú zo skupiny obsahujúcej alkalické soli alebo soli alkalických zemín.



Oblasť techniky

Technické riešenie sa týka hydrogélu na báze zosieťovaného hydroxyfenylového derivátu kyseliny hyaluronovej v zmesi s chondroitín sulfátom so zlepšenou mierou degradácie.

5

Doterajší stav techniky

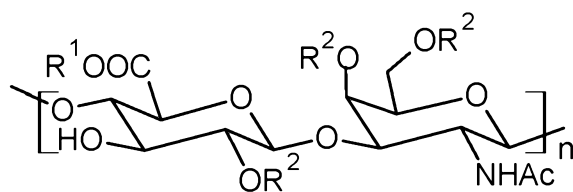
Kyselina hyaluronová (tiež hyaluronan, HA) je polysacharid zo skupiny glykozaminoglykánov, ktorý sa skladá z disacharidických jednotiek zložených z kyseliny D-glukurónovej a *N*-acetyl-D-glukozamínu. Ide o polysacharid, ktorý je ľahko rozpustný vo vodnom prostredí, kde v závislosti od molekulovej hmotnosti a koncentrácie vytvára viskózne roztoky až viskoelastické hydrogély. HA je prirodzenou zložkou medzibunkovej hmoty tkanív. Väzbou na špecifické povrchové bunkové receptory je molekula hyaluronanu schopná interagovať s bunkami vo svojom okolí a regulovať ich metabolické procesy (Xu, Jha a kol. 2012). Z týchto dôvodov sú materiály obsahujúce hyaluronan, prípadne jeho deriváty často využívané na výrobu prípravkov používaných v biomedicínskych aplikáciách. Hydrogély na báze hyaluronanu v organizme podstupujú prirodzenú degradáciu pôsobením špecifických enzýmov (hyaluronidáz), prípadne pôsobením reaktívnych foriem kyslíka (ROS), vďaka čomu dochádza po ich implantácii do organizmu k ich postupnému vstrebaniu (Stern, Kogan a kol. 2007).

Na dosiahnutie mechanicky odolnejších materiálov a z dôvodu spomalenia ich biodegradácie bol vyvinutý rad typov hydrogelov obsahujúcich kovalentne zosietený hyaluronan. Takéto hydrogély sú využívané ako materiály na viskosuplementáciu synoviálnej tekutiny, augmentáciu mäkkých tkanív, slúžia ako podporné štruktúry na kultiváciu a implantáciu buniek a pod. (Tognana, Borrióna a kol. 2007, Buck li, Alam a kol. 2009, Li, Raitcheva a kol. 2012, Salwowska, Bebenek a kol. 2016).

V minulosti boli taktiež vyvinuté rôzne typy derivátov hyaluronanu, ktoré sú schopné podstupovať prechod sol-gel za fyziologických podmienok *in situ* (Burdick and Prestwich 2011, Prestwich 2011). Na tieto účely je možné využiť napr. fenolické deriváty hyaluronanu. Calabro *a kol.* (Calabro, Akst a kol. 2008, Lee, Chung a kol. 2008, Kurisawa, Lee a kol. 2009) opisujú v spisoch EP1587945B1 a EP1773943B1 postup prípravy fenolických derivátov hyaluronanu reakciou karboxylov prítomných v štruktúre D-glukurónovej kyseliny hyaluronanu s aminoalkyl-derivátmi fenolu, napr. tyramínom. Produktom tejto reakcie sú amidy hyaluronanu (Darr a Calabro 2009).

Zosietenie fenolických derivátov hyaluronanu môže byť iniciované prídavkom peroxidázy (napr. chrenovej peroxidázy) a zriedeného roztoku peroxidu vodíka. Chrenová peroxidáza (Horseradish peroxidase, HRP, E.C.1.11.1.7) je v súčasnej dobe využívaná ako katalyzátor organických a biotransformačných reakcií (Akkara, Senecal a kol. 1991, Higashimura a Kobayashi 2002, Ghan, Shutava a kol. 2004, Shutava, Zheng a kol. 2004, Veitch 2004). Hydrogély na báze hydroxyfenylových derivátov hyaluronanu môžu byť využívané ako injekčne aplikovateľné matrice na riadené uvoľňovanie biologicky aktívnych látok alebo ako materiály vhodné na kultiváciu a implantáciu buniek (Kurisawa, Lee a kol. 2010). Wolfová a kol. opisujú v spise CZ303879 konjugát hyaluronanu a tyramínu obsahujúci alifatický linker vložený medzi reťazec polyméru a tyramín. Prítomnosť alifatického linkera umožňuje vyššiu efektivitu sieťovacej reakcie a dodáva sieti vyššiu elasticitu.

Chondroitín sulfát (ChS) je ďalším zástupcom glykozaminoglykánov, ktorý je často využívaný na prípravu materiálov určených na využitie v liečbe degeneratívnych chorôb, napr. osteoartrózy (OA). Reťazec ChS je tvorený disacharidickými jednotkami zloženými z *N*-acetylgalaktozamínu (GalNAc) a kyseliny idurónovej (IdoA). Disacharidické jednotky ChS môžu byť sulfatované v polohe 4 a 6 GalNAc a prípadne aj v polohe 2 IdoA. Chondroitín sulfát je lineárny, sulfatovaný a negatívne nabitý glykozaminoglykán zložený z opakujúcich sa monomérnych jednotiek *N*-acetyl-D-galaktozamínu a kyseliny D-glukurónovej navzájom prepojených $\beta(1\rightarrow3)$ a $\beta(1\rightarrow4)$ *O*-glykozidickými väzbami (pozri štruktúrny vzorec chondroitín sulfátu).



kde

50 R^1 je H alebo Na,

R^2 je H, $O-SO_2-OH$ alebo $O-SO_2-Ona$.

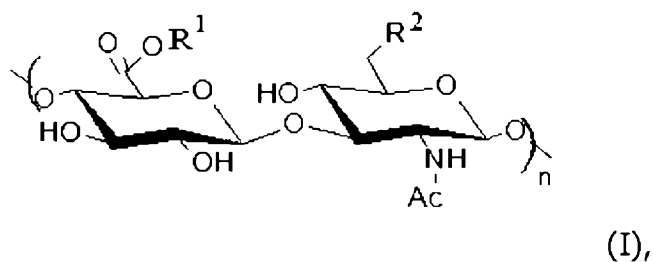
Zdrojom chondroitín sulfátu sú živočíšne spojivové tkanivá, kde sa viaže na proteíny a tvorí tak súčasť proteoglykánov. Sulfatácia chondroitínu sa uskutočňuje pomocou sulfotransferáz v rôznych polohách a rôznom zastúpení. Jedinečný vzorec sulfatácie jednotlivých polôh v polymérnom reťazci kóduje špecifickú biologickú aktivitu chondroitín sulfátu. Ten je dôležitým stavebným blokom chrupky v kĺboch, ktorým dodáva odolnosť v tlaku a obnovuje rovnováhu v zložení kĺbového maziva (Baeurle S. A., Kiselev M. G., Makarova E. S., Nogovitsin E. A. 2009. *Polymer* 50: 1805). Chondroitín sulfát sa spoločne s glukozamínom používa ako výživový doplnok na liečenie alebo tiež na prevenciu vzniku osteoartritídy u ľudí (napr. Flexor®, Advance Nutraceuticals, Ltd.) alebo zvierat (napr. Geloren^{dog}®, Contipro Pharma, Ltd.). Z farmaceutického hľadiska sa chondroitín sulfát považuje za liečivo s oneskoreným nástupom účinku tlmenia bolesti pri degeneratívnom ochorení kĺbov (Aubry-Rozier B. 2012. *Revue Médicale Suisse* 14: 571).

In vitro a *in vivo* štúdie ukázali, že ChS inhibuje účinok hyaluronidáz. Inhibičný účinok ChS na enzýmy je spôsobený tvorbou elektrostatických (iónových) interakcií. Tiež bolo preukázané, že ChS je schopný zachycovať ROS, a tým chrániť pred degradáciou zložky extracelulárnej matrice (Bali, Cousse a kol. 2001, Xiong and Jin 2007).

Využitie kombinácie hyaluronanu a chondroitín sulfátu na prípravu prostriedku na ochranu ľudských alebo živočíšnych buniek a tkanív pred traumatizáciou opisuje dokument EP0136782 (1983). Podobne dokument US6051560 (1992) opisuje využitie zmesi hyaluronanu a chondroitín sulfátu ako viskosuplementačných materiálov počas oftalmologických zákrokov. Patent WO030417024 opisuje viskóznú kompozíciu obsahujúcu terapeuticky účinné množstvo zmesi ChS a HA na výrobu liekov určených na liečbu kĺbov ľudí s poškodením chrupky spôsobeným chondromaláciou alebo OA stupňa I a II, ktorá využíva intraartikulárne podanie zmesi. V patentovej literatúre sa taktiež nájdu dokumenty, ktoré opisujú prostriedok na parenterálne podanie vhodný na prevenciu a liečbu poškodenia kĺbovej chrupky u ľudí alebo zvierat, ktorý sa skladá z terapeuticky účinného množstva chondroitín sulfátu, hyaluronanu a glukozamínu (WO2004034980, 2002). Dokument EP2219595 opisuje formuláciu na báze polysacharidov, najmä glykozaminoglykánov, a ich zmesi s flavonoidmi, ktorá tvorí hydrogély s predĺženým časom biodegradácie. Uvedený dokument opisuje aj hydrogél obsahujúci hyaluronan, derivát hyaluronanu zosietený butándiol 1,4-diglycidyléterom a ChS, ktorý vykazuje zvýšenú odolnosť proti degradácii pôsobením enzýmu hyaluronidázy.

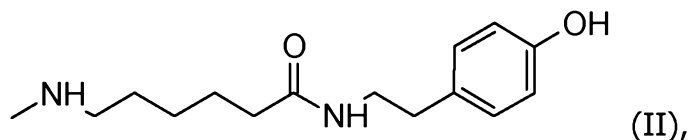
Podstata technického riešenia

Technické riešenie sa týka hydrogél na báze zosieťovaného hydroxyfenylového derivátu kyseliny hyaluronovej, ktorého podstatou je, že obsahuje molekuly hydroxyfenylového derivátu hyaluronovej kyseliny (HA-TA) alebo jeho farmaceuticky prijateľnú soľ podľa všeobecného vzorca (I)



kde n je v rozmedzí 2 až 7 500 a

kde R¹ je H⁺ alebo ión alkalickéj soli alebo soli alkalických zemín a R² je OH alebo tyramínový substituent podľa všeobecného vzorca (II):



pričom v rámci jednej molekuly hydroxyfenylového derivátu hyaluronovej kyseliny alebo jeho farmaceuticky prijateľnej soli podľa všeobecného vzorca (I) aspoň jeden R² je tyramínový substituent podľa všeobecného vzorca (II) a pričom aspoň dva tyramínové substituenty podľa všeobecného vzorca (II) sú spojené prostredníctvom kovalentnej väzby v ktorejkoľvek ortopolohe fenylových skupín, a ďalej obsahuje

chondroitín sulfát alebo jeho farmaceuticky prijateľnú soľ vybranú zo skupiny obsahujúcej alkalické soli alebo soli alkalických zemín.

Alkalické soli alebo soli alkalických zemín hydroxyfenylového derivátu hyalurónovej kyseliny podľa všeobecného vzorca (I) alebo chondroitín sulfátu sú výhodne vybrané zo skupiny obsahujúcej Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} .

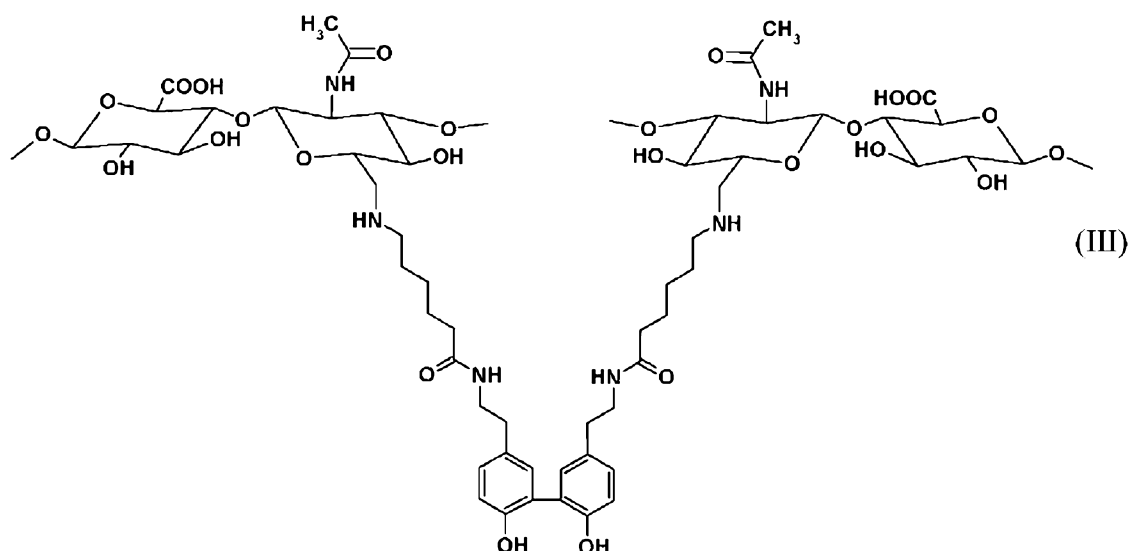
Koncentrácia chondroitín sulfátu alebo jeho farmaceuticky prijateľnej soli je v rozsahu 0,5 až 50 mg/ml hydrogélú podľa technického riešenia, výhodne v koncentrácii 1 až 20 mg/ml, výhodnejšie 5 mg/ml.

Obsah zosieťovaného hydroxyfenylového derivátu hyaluronanu je v rozsahu 5 až 30 mg/ml, výhodne 10 mg/ml hydrogélú podľa technického riešenia.

Podľa ďalšieho výhodného uskutočnenia technického riešenia hydrogél ďalej obsahuje kyselinu hyalurónovú alebo jej farmaceuticky prijateľnú soľ v koncentrácii 1 až 20 mg/ml, výhodne 5 až 10 mg/ml, výhodnejšie 5 mg/ml hydrogélú podľa technického riešenia.

Kovalentná väzba môže byť v rámci jednej molekuly derivátu kyseliny hyalurónovej podľa všeobecného vzorca (I) v ktorejkoľvek ortopolohe fenylových skupín aspoň dvoch tyramínových substituentov všeobecného vzorca (II), ktoré sa v tejto molekule nachádzajú. Ide o takzvané intramolekulárne zosieťovanie. Tiež môže byť kovalentná väzba v ktorejkoľvek ortopolohe fenylových skupín aspoň dvoch tyramínových substituentov všeobecného vzorca (II), ktoré sa nachádzajú v rôznych molekulách derivátu kyseliny hyalurónovej podľa všeobecného vzorca (I). To predstavuje navzájom prepojenú sieť medzi molekulami derivátu HA.

Príklad kovalentne zosieteného hydroxyfenylového derivátu hyaluronanu (crossHA-TA) je schematicky ukázaný, pozri vzorec (III):



Takéto hydrogély podľa technického riešenia vykazujú zvýšenú odolnosť proti biodegradácii pochodom vznikajúcim pôsobením hydrolytických enzýmov a reaktívnych foriem kyslíka.

Podľa výhodného uskutočnenia je hmotnostne stredná molárna hmotnosť (M_w) hydroxyfenylového derivátu hyaluronanu podľa všeobecného vzorca (I) v rozsahu 5×10^4 až $1,5 \times 10^6 \text{ g.mol}^{-1}$, výhodne $2,5 \times 10^5$ až $1 \times 10^6 \text{ g.mol}^{-1}$, výhodnejšie $8 \times 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$. PI je v rozsahu 1 až 3.

Podľa ďalšieho uskutočnenia technického riešenia je stupeň substitúcie (DS) hydroxyfenylového derivátu hyaluronanu všeobecného vzorca (I) v rozsahu 0,5 až 10 %, výhodne 1 až 4 %, výhodnejšie 1 %.

Podľa ďalšieho výhodného uskutočnenia je M_w chondroitín sulfátu v rozsahu 5×10^3 až $95 \times 10^3 \text{ g.mol}^{-1}$, ďalej výhodne 10×10^3 až $40 \times 10^3 \text{ g.mol}^{-1}$.

Podľa výhodného uskutočnenia hydrogél obsahuje hyaluronan (HA) alebo jeho farmaceuticky prijateľnú soľ s M_w v rozsahu 5×10^4 až $2,5 \times 10^6 \text{ g.mol}^{-1}$, výhodne $1,5 \times 10^6$ až $2,5 \times 10^6 \text{ g.mol}^{-1}$, výhodnejšie $2,0 \times 10^6 \text{ g.mol}^{-1}$.

Takéto hydrogély podľa technického riešenia môžu byť použité v kozmetike, medicíne a regeneratívnej medicíne, najmä na prípravu materiálov na regeneráciu tkaniva, augmentáciu tkaniva, prípravu scaffoldov pre tkanivové inžinierstvo, ako matrica na riadené uvoľňovanie biologicky aktívnych látok a liečiv a viskosuplementáciu synoviálnej tekutiny.

Prehľad obrázkov na výkresoch

- Obr. 1: Porovnanie rýchlosti degradácie roztokov HA s prídavkom ChS pomocou ROS
 Obr. 2: Porovnanie rýchlosti degradácie materiálov pomocou ROS
 5 Obr. 3: Kumulatívna degradácia hydrogélu [%] BTH 30 U/mg

Príklady uskutočnenia

- 10 DS = stupeň substitúcie = $100 \% \cdot \text{molárne množstvo modifikovaných disacharidických jednotiek hyaluronanu} / \text{molárne množstvo všetkých disacharidických jednotiek derivátu hyaluronanu}$. Stupeň substitúcie bol stanovený pomocou ^1H NMR spektroskopiou.

Hmotnostne stredná molárna hmotnosť (Mw) a index polydisperzity (PI) boli stanovené metódou SEC-MALLS.

- 15 Infračervené spektrá pripravených derivátov boli získané metódou FT-IR.
 Bol použitý chondroitín sulfát vo farmaceutickej kvalite na injekčné podanie od Bioiberica, ES.

Príklad 1

Syntéza tyramínovaného derivátu HA (HA-TA)

- 20 Syntéza 6-amino-*N*-[2(4hydroxyfenyl)etyl]hexánamidu

6-[(*tert*-Butoxykarbonyl)amino]hexánová kyselina (1,00 g, 4,3 mmol) bola rozpustená v 50 ml tetrahydrofuránu (THF). K roztoku kyseliny bol pridaný 1,1'-karbodiimidazol (0,70 g, 4,3 mmol). Zmes bola zahrievaná na 50 °C počas šesťdesiatich minút. Potom bola reakčná nádoba premytá inertným plynom. K reakčnej zmesi bol pridaný tyramín (0,59 g, 4,3 mmol). Zmes bola ďalej zahrievaná ďalšie 2 hodiny. Potom bol destiláciou za zníženého tlaku odstránený THF. Odparok bol rozpustený v 50 ml etylacetátu. Roztok bol premytý 150 ml čistenej vody (rozdelené do troch dielov). Organická vrstva bola vysušená nad molekulovým sítom. Etylacetát bol odstránený destiláciou za zníženého tlaku. Odparok bol rozpustený v 50 ml MeOH a k roztoku boli pridané 2 ml trifluóroctovej kyseliny (TFA). Roztok bol zahrievaný 6 hodín pod spätným chladičom. Rozpúšťadlo bolo odstránené destiláciou za zníženého tlaku. Odparok bol rozpustený v 50 ml etylacetátu. Roztok bol premytý 150 ml čistenej vody (rozdelené do troch dielov). Organická vrstva bola vysušená nad molekulovým sítom. Etylacetát bol odstránený destiláciou za zníženého tlaku.

$m = 0,75 \text{ g}$ (70 % teórie)

- 35 $^1\text{H NMR}$ (D_2O , ppm) δ : 1,17 (m, 2 H, $\gamma\text{-CH}_2\text{-}$ hexánovej kyseliny); 1,48 (m, 2 H, $\beta\text{-CH}_2\text{-}$ hexánovej kyseliny); 1,58 (m, 2 H, $\delta\text{-CH}_2\text{-}$ hexánovej kyseliny); 2,17 (t, 2 H, $\text{-CH}_2\text{-CO-}$); 2,73 (m, 2 H, $\text{-CH}_2\text{-Ph}$); 2,91 (m, 2 H, $\text{-CH}_2\text{-NH}_2$); 3,42 (m, 2 H, $\text{-CH}_2\text{-NH-CO-}$); 6,83 (d, 2 H, arom); 7,13 (d, 2 H, arom).

$^{13}\text{C NMR}$ (D_2O , ppm) δ : 24 ($\gamma\text{-C-}$ hexánovej kyseliny); 26 ($\delta\text{-C-}$ hexánovej kyseliny); 33 ($\beta\text{-C-}$ hexánovej kyseliny); 35 (-C-CO-); 39 (-C-NH_2); 40 (C-Ph); 63 (-C-NH-CO-); 115 (C3 arom); 126 (C1 arom); 130 (C2 arom.); 153 (C4 arom.); 176 (-CO-).

- 40 Príprava aldehydického derivátu (HA-CHO)

Hyaluronan (10,00 g, $M_w = 2 \times 10^6 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$) bol rozpustený v 750 ml 2,5 % (w/w) roztoku $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{ H}_2\text{O}$. Roztok bol vychladený na 5 °C. K vzniknutému roztoku bolo pridaných 2,60 g NaBr a 0,05 g 4-acetamid-2,2,6,6-tetrametylpiiperidín-1-oxylu. Po dôkladnej homogenizácii roztoku boli k reakčnej zmesi pridané 3 ml roztoku NaClO (10 – 15 % dostupného Cl_2). Reakcia pokračovala za stáleho miešania 15 min. Reakcia bola ukončená prídavkom 100 ml 40 % roztoku propán-2-olu. Produkt bol prečistený ultrafiltráciou a izolovaný precipitáciou propán-2-olom.

IČ (KBr) : 3417, 2886, 2152, 1659, 1620, 1550, 1412, 1378, 1323, 1236, 1204, 1154, 1078, 1038, 945, 893 cm^{-1} .

$^1\text{H NMR}$ (D_2O) δ : 2,01 (s, 3 H, $\text{CH}_3\text{-}$), 3,37 - 3,93 (m, skelet hyaluronanu), 4,46 (s, 1H, anomér), 4,54 (s, 1H anomér, -O-CH(OH)-), 5,27 (geminálny glykol -CH- (OH)_2).

- 50 a) Príprava tyramínovaného derivátu HA s C_6 spacerom ($M_w \approx 3 \times 10^5 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$, DS $\approx 2 \%$)

Aldehydický derivát HA ($\approx 3 \times 10^5 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$, DS = 9 %) (5,00 g) bol rozpustený v 500 ml demineralizovanej vody. Pomocou kyseliny octovej bolo pH roztoku upravené na 3. K roztoku HA-CHO bol pridaný 6-amino-*N*-[2-(4-hydroxyfenyl)etyl]hexánamid (medziprodukt (I)) (1,25 g, 5 mmol). Zmes bola miešaná 2 hodiny pri laboratórnej teplote. Potom bol do reakčnej zmesi pridaný komplex pikolín-boran (0,270 g, 2,5 mmol). Zmes bola miešaná ďalších 12 hodín pri laboratórnej teplote. Produkt bol prečistený ultrafiltráciou a izolovaný z retentátu precipitáciou propán-2-olom. Precipitát bol zbavený vlhkosti a zvyškového propán-2-olu sušením v teplovzdušnej sušiarňi (40 °C, 3 dni).

IČ (KBr): 3425, 2893, 2148, 1660, 1620, 1549, 1412, 1378, 1323, 1236, 1204, 1154, 1078, 1038, 945, 893 cm^{-1} .

$^1\text{H NMR}$ (D_2O) δ : 1,25 (t, 2 H, γ - CH_2 - aminohexánovej kyseliny), 1,48 (m, 2 H, δ - CH_2 - aminohexánovej kyseliny) 1,51 (m, 2 H, β - CH_2 -aminohexánovej kyseliny), 2,01 (s, 3 H, CH_3 -), 2,65 (m, 2H, Ph- CH_2 -), 2,73 (m, 2H, ϵ - CH_2 -aminohexánovej kyseliny), 3,37 – 3,93 (m, skelet hyaluronanu), 4,46 (s, 1H, anomér), 4,54 (s, 1H anomér., -O-

-CH(OH)-), 6,59 (d, 2H, arom.), 7,01 (d, 2H. arom.).

SEC MALLS: $M_w = 2,78 \times 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$

DS ($^1\text{H NMR}$): 2,1 %

b) Príprava tyramínovaného derivátu HA s C_6 spacerom ($M_w \approx 8 \times 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$, DS ≈ 1 %)

Aldehydický derivát HA ($M_w \approx 8 \times 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$, DS ≈ 5 %) (5,00 g) bol rozpustený v 500 ml demineralizovanej vody. Pomocou kyseliny octovej bolo pH roztoku upravené na 3. K roztoku HA-CHO bol pridaný 6-amino-*N*-[2-(4- hydroxyfenyl)etyl]hexánamid (medziprodukt (I)) (0,625 g, 2,5 mmol). Zmes bola miešaná 2 hodiny pri laboratórnej teplote. Potom bol do reakčnej zmesi pridaný komplex pikolín-boran (0,270 g, 2,5 mmol). Zmes bola miešaná ďalších 12 hodín pri laboratórnej teplote. Produkt bol prečistený ultrafiltráciou a izolovaný z retentátu precipitáciou propán-2-olom. Precipitát bol zbavený vlhkosti a zvyškového propán-2-

-olu sušením v teplovzdušnej sušiarňi (40 °C, 3 dni).

IČ (KBr): 3425, 2893, 2148, 1660, 1620, 1549, 1412, 1378, 1323, 1236, 1204, 1154, 1078, 1038, 945, 893 cm^{-1} .

$^1\text{H NMR}$ (D_2O) δ : 1,25 (t, 2 H, γ - CH_2 - aminohexánovej kyseliny), 1,48 (m, 2 H, δ - CH_2 - aminohexánovej kyseliny), 1,51 (m, 2 H, β - CH_2 - aminohexánovej kyseliny), 2,01 (s, 3 H, CH_3 -), 2,65 (m, 2H, Ph- CH_2 -), 2,73 (m, 2H, ϵ - CH_2 -aminohexánovej kyseliny), 3,37 - 3,93 (m, skelet hyaluronanu), 4,46 (s, 1H, anomér), 4,54 (s, 1H anomér., -O-

-CH(OH)-), 6,59 (d, 2H, arom.), 7,01 (d, 2H. arom.).

SEC MALLS: $M_w = 8,09 \times 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$

DS ($^1\text{H NMR}$): 1,1 %

c) Príprava tyramínovaného derivátu HA s C_6 spacerom ($M_w \approx 1,5 \times 10^6 \text{ g.mol}^{-1}$, DS $\approx 0,5$ %)

Aldehydický derivát HA ($M_w \approx 1,5 \times 10^6 \text{ g.mol}^{-1}$, DS $\approx 0,5$ %) (5,00 g) bol rozpustený v 500 ml demineralizovanej vody. Pomocou kyseliny octovej bolo pH roztoku upravené na 3. K roztoku HA-CHO bol pridaný 6-amino-*N*-[2-(4- hydroxyfenyl)etyl]hexán-amid (medziprodukt (I)) (0,625 g, 2,5 mmol). Zmes bola miešaná 2 hodiny pri laboratórnej teplote. Potom bol do reakčnej zmesi pridaný komplex pikolín-boran (0,270 g, 2,5 mmol). Zmes bola miešaná ďalších 12 hodín pri laboratórnej teplote. Produkt bol prečistený ultrafiltráciou a izolovaný z retentátu precipitáciou propán-2-olom. Precipitát bol zbavený vlhkosti a zvyškového propán- 2-olu sušením v teplovzdušnej sušiarňi (40 °C , 3 dni).

IČ (KBr): 3425, 2893, 2148, 1660, 1620, 1549, 1412, 1378, 1323, 1236, 1204, 1154, 1078, 1038, 945, 893 cm^{-1} .

$^1\text{H NMR}$ (D_2O) δ : 1,25 (t, 2 H, γ - CH_2 - aminohexánovej kyseliny), 1,48 (m, 2 H, δ - CH_2 - aminohexánovej kyseliny) 1,51 (m, 2 H, β - CH_2 - aminohexánovej kyseliny), 2,01 (s, 3 H, CH_3 -), 2,65 (m, 2H, Ph- CH_2 -), 2,73 (m, 2H, ϵ - CH_2 - aminohexánovej kyseliny), 3,37 – 3,93 (m, skelet hyaluronanu), 4,46 (s, 1H, anomér), 4,54 (s, 1H anomér., -O-CH(OH)-), 6,59 (d, 2H, arom.), 7,01 (d, 2H. arom.).

SEC MALLS: $M_w = 1,5 \times 10^6 \text{ g.mol}^{-1}$

DS ($^1\text{H NMR}$): 0,5 %

d) Príprava tyramínovaného derivátu HA s C_6 spacerem ($M_w \approx 5 \times 10^4 \text{ g.mol}^{-1}$, DS ≈ 10 %)

Aldehydický derivát HA ($M_w \approx 5 \times 10^4 \text{ g.mol}^{-1}$, DS ≈ 10 %) (5,00 g) bol rozpustený v 500 ml demineralizovanej vody. Pomocou kyseliny octovej bolo pH roztoku upravené na 3. K roztoku HA-CHO bol pridaný 6-amino-*N*-[2-(4-hydroxy- fenyl)etyl]hexánamid (medziprodukt (I)) (0,625 g, 2,5 mmol). Zmes bola miešaná 2 hodiny pri laboratórnej teplote. Potom bol do reakčnej zmesi pridaný komplex pikolín-boran (0,270 g, 2,5 mmol). Zmes bola miešaná ďalších 12 hodín pri laboratórnej teplote. Produkt bol prečistený ultrafiltráciou a izolovaný z retentátu precipitáciou propán-2-olom. Precipitát bol zbavený vlhkosti a zvyškového propán- 2-olu sušením v teplovzdušnej sušiarňi (40 °C, 3 dni).

IČ (KBr): 3425, 2893, 2148, 1660, 1620, 1549, 1412, 1378, 1323, 1236, 1204, 1154, 1078, 1038, 945, 893 cm^{-1} .

$^1\text{H NMR}$ (D_2O) δ : 1,25 (t, 2 H, γ - CH_2 - aminohexánovej kyseliny), 1,48 (m, 2 H, δ - CH_2 - aminohexánovej kyseliny), 1,51 (m, 2 H, β - CH_2 - aminohexánovej kyseliny), 2,01 (s, 3 H, CH_3 -), 2,65 (m, 2H, Ph- CH_2 -), 2,73 (m, 2H, ϵ - CH_2 -aminohexánovej kyseliny), 3,37 - 3,93 (m, skelet hyaluronanu), 4,46 (s, 1H, anomér), 4,54 (s, 1H anomér., -O-CH(OH)-), 6,59 (d, 2H, arom.), 7,01 (d, 2H, arom.).

SEC MALLS: $M_w = 5 \times 10^4 \text{ g.mol}^{-1}$

DS ($^1\text{H NMR}$): 10 %

Príklad 2

Príprava hydrogélů na báze hydroxyfenylového derivátu HA-TA s koncentraciou 20 mg/ml

Hydrogély boli pripravené zmiešaním dvoch prekursorových roztokov A a B, na ich prípravu bol použitý vodný roztok NaCl (9 g/l). Na prípravu prekursorových roztokov bol použitý hydroxyfenylový derivát HA-TA s $M_w = 2,78 \times 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$ a DS 2,1 %. Zloženie roztokov je uvedené v nasledujúcej tabuľke (tabuľka 1).

Tabuľka 1 Zloženie prekursorových roztokov na prípravu hydrogélů na báze hydroxyfenylového derivátu HA-TA s koncentraciou 20 mg/ml

Roztok A	Roztok B
HRP..... 0,48 U/ml	H ₂ O ₂ 2,0 mmol/l
HA-TA..... 20 mg/ml	HA-TA..... 20 mg/ml
NaCl..... 9 g/l	NaCl..... 9 g/l

- 10 Zmiešaním roztoku A a roztoku B v pomere 1 : 1 boli pripravené hydrogély s finálnym zložením, uvedeným v nasledujúcej tabuľke (tabuľka 2), kde crossHA-TA je kovalentne zosieteným hydroxyfenylovým derivátom hyaluronanu.

Tabuľka 2 Finálne zloženie hydrogélů na báze hydroxyfenylového derivátu HA-TA s koncentraciou 20 mg/ml

15

Zloženie hydrogélů
HRP.....0,24 U/ml
crossHA-TA.....20 mg/ml
NaCl.....9 g/l

Príklad 3

Príprava hydrogélů, obsahujúcich ChS s koncentraciou 0,5 mg/ml

- 20 Hydrogély boli pripravené zmiešaním dvoch prekursorových roztokov A a B, na prípravu ktorých bol použitý vodný roztok NaCl (9 g/l). Na prípravu prekursorových roztokov bol použitý hydroxyfenylový derivát HA-TA s $M_w = 2,78 \times 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$ a DS 2,1 % a ChS s $M_w = 10 \times 10^3 - 40 \times 10^3 \text{ g.mol}^{-1}$. Zloženie roztokov je uvedené v nasledujúcej tabuľke (tabuľka 3).

25 Tabuľka 3 Zloženie prekursorových roztokov na prípravu hydrogélů obsahujúce ChS s koncentraciou 0,5 mg/ml

Roztok A	Roztok B
HRP.....0,48 U/ml	H ₂ O ₂2,0 mmol/l
HA-TA.....20 mg/ml	HA-TA.....20 mg/ml
ChS.....0,5 mg/ml	ChS.....0,5 mg/ml
NaCl.....9 g/l	NaCl.....9 g/l

Zmiešaním roztoku A a roztoku B v pomere 1 : 1 boli pripravené hydrogély s finálnym zložením, uvedeným v nasledujúcej tabuľke (tabuľka 4), kde crossHA-TA je kovalentne zosieteným hydroxyfenylovým derivátom hyaluronanu.

30

Tabuľka 4 Finálne zloženie hydrogélů obsahujúce ChS s koncentraciou 0,5 mg/ml

Zloženie hydrogélů
HRP.....0,24 U/ml
crossHA-TA.....20 mg/ml
ChS.....0,5 mg/ml
NaCl.....9 g/l

Príklad 4

- 35 Príprava hydrogélů, obsahujúcich ChS s koncentraciou 3,3 mg/ml

Hydrogély boli pripravené zmiešaním dvoch prekursorových roztokov A a B, na prípravu ktorých bol použitý vodný roztok NaCl (9 g/l). Na prípravu prekursorových roztokov bol použitý hydroxyfenylový derivát HA-TA s $M_w = 2,78 \times 10^5 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ a DS 2,1 % a ChS s $M_w = 10 \times 10^3 - 40 \times 10^3 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$. Zloženie roztokov je uvedené v nasledujúcej tabuľke (tabuľka 5).

5

Tabuľka 5 Zloženie prekursorových roztokov na prípravu hydrogélů obsahujúce ChS s koncentráciou 3,3 mg/ml

Roztok A	Roztok B
HRP.....0,48 U/ml	H ₂ O ₂2,0 mmol/l
HA-TA.....20 mg/ml	HA-TA.....20 mg/ml
ChS.....3,3 mg/ml	ChS.....3,3 mg/ml
NaCl.....9 g/l	NaCl.....9 g/l

10 Zmiešaním roztoku A a roztoku B v pomere 1 : 1 boli pripravené hydrogély s finálnym zložením, uvedeným v nasledujúcej tabuľke (tabuľka 6), kde crossHA-TA je kovalentne zosieteným hydroxyfenylovým derivátom hyaluronanu.

Tabuľka 6 Finálne zloženie hydrogélů obsahujúce ChS s koncentráciou 3,3 mg/ml

15

Zloženie hydrogélů
HRP.....0,24 U/ml
crossHA-TA.....20 mg/ml
ChS.....3,3 mg/ml
NaCl.....9 g/l

Príklad 5

Príprava hydrogélů, obsahujúcich ChS s koncentráciou 10 mg/ml

20 Hydrogély boli pripravené zmiešaním dvoch prekursorových roztokov A a B, na prípravu ktorých bol použitý vodný roztok NaCl (9 g/l). Na prípravu prekursorových roztokov bol použitý hydroxyfenylový derivát HA-TA s $M_w = 2,78 \times 10^5 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ a DS 2,1 % a ChS s $M_w = 10 \times 10^3 - 40 \times 10^3 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$. Zloženie roztokov je uvedené v nasledujúcej tabuľke (tabuľka 7).

25 Tabuľka 7 Zloženie prekursorových roztokov na prípravu hydrogélů obsahujúce ChS s koncentráciou 10 mg/ml

Roztok A	Roztok B
HRP.....0,48 U/ml	H ₂ O ₂2,0 mmol/l
HA-TA.....20 mg/ml	HA-TA.....20 mg/ml
ChS.....10 mg/ml	ChS.....10 mg/ml
NaCl.....9 g/l	NaCl.....9 g/l

30 Zmiešaním roztoku A a roztoku B v pomere 1 : 1 boli pripravené hydrogély s finálnym zložením, uvedeným v nasledujúcej tabuľke (tabuľka 8), kde crossHA-TA je kovalentne zosieteným hydroxyfenylovým derivátom hyaluronanu.

Tabuľka 8 Finálne zloženie hydrogélů obsahujúce ChS s koncentráciou 10 mg/ml

Zloženie hydrogélů
HRP.....0,24 U/ml
crossHA-TA.....20 mg/ml
ChS.....10 mg/ml
NaCl.....9 g/l

Príklad 6

Príprava hydrogélů, obsahujících ChS s koncentraciou 50 mg/ml

Hydrogély boli pripravené zmiešaním dvoch prekursorových roztokov A a B, na prípravu ktorých bol použitý vodný roztok NaCl (9 g/l). Na prípravu prekursorových roztokov bol použitý hydroxyfenylový derivát HA-TA s $M_w = 2,78 \times 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$ a DS 2,1 % a ChS s $M_w = 10 \times 10^3 - 40 \times 10^3 \text{ g.mol}^{-1}$. Zloženie roztokov je uvedené v nasledujúcej tabuľke (tabuľka 9).

Tabuľka 9 Zloženie prekursorových roztokov na prípravu hydrogélů obsahujúce ChS s koncentraciou 50 mg/ml

Roztok A	Roztok B
HRP.....0,48 U/ml	H ₂ O ₂2,0 mmol/l
HA-TA.....20 mg/ml	HA-TA.....20 mg/ml
ChS.....50 mg/ml	ChS.....50 mg/ml
NaCl.....9 g/l	NaCl.....9 g/l

Zmiešaním roztoku A a roztoku B v pomere 1 : 1 boli pripravené hydrogély s finálnym zložením, uvedeným v nasledujúcej tabuľke (tabuľka 10), kde crossHA-TA je kovalentne zosieteným hydroxyfenylovým derivátom hyaluronanu.

Tabuľka 10 Finálne zloženie hydrogélů obsahujúce ChS s koncentraciou 50 mg/ml

Zloženie hydrogélů
HRP.....0,24 U/ml
crossHA-TA.....20 mg/ml
ChS.....50 mg/ml
NaCl.....9 g/l

Príklad 7

Príprava hydrogélů, obsahujících HA s koncentraciou 5 mg/ml

Príprava hydrogélů, obsahujících nezosietenú kyselinu hyaluronovú zahŕňala 3 základné kroky:

1. Príprava hydrogélů obsahujúceho zosietený derivát crossHA-TA

Hydrogél obsahujúci zosietený derivát crossHA-TA bol pripravený zmiešaním dvoch prekursorových roztokov A a B, ktoré boli pripravené rozpustením jednotlivých zložiek vo fosfátom pufovanom fyziologickom roztoku (PBS). Na prípravu prekursorových roztokov bol použitý hydroxyfenylový derivát HA-TA s $M_w = 8,09 \times 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$ a DS 1,1 %. Zloženie roztokov je uvedené v nasledujúcej tabuľke (tabuľka 11).

Tabuľka 11 Zloženie prekursorových roztokov na prípravu zosieteného derivátu crossHA-TA

Roztok A	Roztok B
HRP.....12,8 mU/ml	H ₂ O ₂0,6 mmol/l
HA-TA.....20 mg/ml	HA-TA.....20 mg/ml
NaCl.....8 g/l	NaCl.....8 g/l
KCl.....0,2 g/l	KCl.....0,2 g/l
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O.....2,85 g/l	Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O.....2,85 g/l
KH ₂ PO ₄0,2 g/l	KH ₂ PO ₄0,2 g/l

Zmiešaním roztoku A a roztoku B v pomere 1 : 1 bol pripravený hydrogél so zložením uvedenom v nasledujúcej tabuľke (tabuľka 12).

Tabuľka 12 Zloženie zosieteného derivátu crossHA-TA

Zloženie zosieteného derivátu crossHA-TA	
HRP.....	0,24 U/ml
crossHA-TA.....	20 mg/ml
NaCl.....	8 g/l
KCl.....	0,2 g/l
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O.....	2,85 g/l
KH ₂ PO ₄	0,2 g/l

2. Príprava roztoku hyaluronanu

- 5 Roztok HA s koncentráciou 5 mg/ml bol pripravený rozpustením natívneho hyaluronanu s Mw 1,91 x 10⁶ g.mol⁻¹ v PBS.

3. Homogenizácia hydrogélu a roztoku hyaluronanu

- 10 Finálny hydrogél bol pripravený zmiešaním zosieteného derivátu crossHA-TA a roztoku HA v pomere 1 : 1 s následnou homogenizáciou zmesi. Finálne zloženie materiálu je uvedené v nasledujúcej tabuľke (tabuľka 13).

Tabuľka 13 Finálne zloženie hydrogélu, obsahujúce HA s koncentráciou 5 mg/ml

Finálne zloženie	
HRP.....	0,12 U/ml
crossHA-TA.....	10 mg/ml
HA.....	5 mg/ml
NaCl.....	8 g/l
KCl.....	0,2 g/l
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O.....	2,85 g/l
KH ₂ PO ₄	0,2 g/l

15 Príklad 8

Príprava hydrogélů, obsahujúcich HA s koncentráciou 20 mg/ml

Príprava hydrogélů, obsahujúcich nezosietenú kyselinu hyalurónovú zahŕňala 3 základné kroky:

1. Príprava hydrogélu obsahujúceho zosietený derivát crossHA-TA

- 20 Hydrogél obsahujúci zosietený derivát crossHA-TA bol pripravený zmiešaním dvoch prekursorových roztokov A a B, ktoré boli pripravené rozpustením jednotlivých zložiek vo fosfátom pufovanom fyziologickom roztoku (PBS). Na prípravu prekursorových roztokov bol použitý hydroxyfenylový derivát HA-TA s Mw = 8,09 x 10⁵ g.mol⁻¹ a DS 1,1 %. Zloženie roztokov je uvedené v nasledujúcej tabuľke (tabuľka 14).

25 Tabuľka 14 Zloženie prekursorových roztokov na prípravu zosieteného derivátu crossHA-TA

Roztok A	Roztok B
HRP.....	12,8 mU/ml
HA-TA.....	20 mg/ml
NaCl.....	8 g/l
KCl.....	0,2 g/l
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O.....	2,85 g/l
KH ₂ PO ₄	0,2 g/l
	H ₂ O ₂0,6 mmol/l
	HA-TA.....20 mg/ml
	NaCl.....8 g/l
	KCl.....0,2 g/l
	Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O.....2,85 g/l
	KH ₂ PO ₄0,2 g/l

Zmiešaním roztoku A a roztoku B v pomere 1 : 1 bol pripravený hydrogél so zložením uvedenom v nasledujúcej tabuľke (tabuľka 15).

Tabuľka 15 Zloženie zosieteného derivátu crossHA-TA

Zloženie zosieteného derivátu crossHA-TA	
HRP.....	0,24 U/ml
crossHA-TA.....	20 mg/ml
NaCl.....	8 g/l
KCl.....	0,2 g/l
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O.....	2,85 g/l
KH ₂ PO ₄	0,2 g/l

2. Príprava roztoku hyaluronanu

- 5 Roztok HA s koncentráciou 40 mg/ml bol pripravený rozpustením natívneho hyaluronanu s Mw 1,91 x 10⁶ g.mol⁻¹ vo fosfátovom pufri (PBS).

3. Homogenizácia hydrogélu a roztoku hyaluronanu

- Finálny hydrogél bol pripravený zmiešaním zosieteného derivátu crossHA-TA a roztoku HA v pomere 1 : 1 s následnou homogenizáciou zmesi. Finálne zloženie materiálu je uvedené v nasledujúcej tabuľke (tabuľka 16).

Tabuľka 16 Finálne zloženie hydrogélu, obsahujúce HA s koncentráciou 20 mg/ml

Finálne zloženie	
HRP.....	0,12 U/ml
crossHA-TA.....	10 mg/ml
HA.....	20 mg/ml
NaCl.....	8 g/l
KCl.....	0,2 g/l
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O.....	2,85 g/l
KH ₂ PO ₄	0,2 g/l

15 Príklad 9

Príprava hydrogélů, obsahujúcich HA s koncentráciou 5 mg/ml a ChS s koncentráciou 5 mg/ml

Príprava hydrogélů, obsahujúcich nezosietenú kyselinu hyaluronovú a chondroitín sulfát zahŕňala 3 základné kroky:

1. Príprava hydrogélu obsahujúceho zosietený derivát crossHA-TA

- 20 Hydrogél obsahujúci zosietený derivát crossHA-TA bol pripravený zmiešaním dvoch prekursorových roztokov A a B, ktoré boli pripravené rozpustením jednotlivých zložiek vo fosfátom pufrovanom fyziologickom roztoku (PBS). Na prípravu prekursorových roztokov bol použitý hydroxyfenylový derivát HA-TA s Mw = 8,09 x 10⁵ g.mol⁻¹ a DS 1,1 %. Zloženie roztokov je uvedené v nasledujúcej tabuľke (tabuľka 17).

25 Tabuľka 17 Zloženie prekursorových roztokov na prípravu zosieteného derivátu crossHA-TA

Roztok A	Roztok B
HRP.....	12,8 mU/ml
HA-TA.....	20 mg/ml
NaCl.....	8 g/l
KCl.....	0,2 g/l
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O.....	2,85 g/l
KH ₂ PO ₄	0,2 g/l
	H ₂ O ₂0,6 mmol/l
	HA-TA.....20 mg/ml
	NaCl.....8 g/l
	KCl.....0,2 g/l
	Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O.....2,85 g/l
	KH ₂ PO ₄0,2 g/l

Zmiešaním roztoku A a roztoku B v pomere 1 : 1 bol pripravený hydrogél so zložením uvedenom v nasledujúcej tabuľke (tabuľka 18).

Tabuľka 18 Zloženie zosieteného derivátu crossHA-TA

Zloženie zosieteného derivátu crossHA-TA	
HRP.....	0,24 U/ml
crossHA-TA.....	20 mg/ml
NaCl.....	8 g/l
KCl.....	0,2 g/l
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O.....	2,85 g/l
KH ₂ PO ₄	0,2 g/l

2. Príprava roztoku s obsahom hyaluronanu a chondroitín sulfátu

- 5 Rostok HA s koncentráciou 10 mg/ml a ChS s koncentráciou 10 mg/ml bol pripravený rozpustením natívneho hyaluronanu s M_w $1,91 \times 10^6$ g.mol⁻¹ a chondroitín sulfátu ChS s $M_w = 10 \times 10^3 - 40 \times 10^3$ g.mol⁻¹ vo fosfátovom pufri (PBS).

3. Homogenizácia hydrogélu a roztoku s obsahom hyaluronanu a chondroitín sulfátu

- 10 Finálny hydrogél bol pripravený zmiešaním zosieteného derivátu crossHA-TA a roztoku HA a ChS v pomere 1 : 1 s následnou homogenizáciou zmesi. Finálne zloženie materiálu je uvedené v nasledujúcej tabuľke (tabuľka 19).

Tabuľka 19 Finálne zloženie hydrogélu, HA s koncentráciou 5 mg/ml a ChS s koncentráciou 5 mg/ml

Finálne zloženie	
HRP.....	0,12 U/ml
crossHA-TA.....	10 mg/ml
HA.....	5 mg/ml
ChS.....	5 mg/ml
NaCl.....	8 g/l
KCl.....	0,2 g/l
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O.....	2,85 g/l
KH ₂ PO ₄	0,2 g/l

15

Príklad 10

Príprava hydrogélův, obsahujúcich HA s koncentráciou 5 mg/ml a ChS s koncentráciou 10 mg/ml

Príprava hydrogélův, obsahujúcich nezosietenú kyselinu hyalurónovú a chondroitín sulfát zahŕňala 3 základné kroky:

- 20 1. Príprava hydrogélu obsahujúceho zosietený derivát crossHA-TA

Hydrogél obsahujúci zosietený derivát crossHA-TA bol pripravený zmiešaním dvoch prekursorových roztokov A a B, ktoré boli pripravené rozpustením jednotlivých zložiek vo fosfátom pufrovanom fyziologickom roztoku (PBS). Na prípravu prekursorových roztokov bol použitý hydroxyfenylový derivát HA-TA s $M_w = 8,09 \times 10^5$ g.mol⁻¹ a DS 1,1 %. Zloženie roztokov je uvedené v nasledujúcej tabuľke (tabuľka 20).

25

Tabuľka 20 Zloženie prekursorových roztokov na prípravu zosieteného derivátu crossHA-TA

Roztok A	Roztok B
HRP.....	12,8 mU/ml
HA-TA.....	20 mg/ml
NaCl.....	8 g/l
KCl.....	0,2 g/l
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O.....	2,85 g/l
KH ₂ PO ₄	0,2 g/l
	H ₂ O ₂
	0,6 mmol/l
	HA-TA.....
	20 mg/ml
	NaCl.....
	8 g/l
	KCl.....
	0,2 g/l
	Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O.....
	2,85 g/l
	KH ₂ PO ₄
	0,2 g/l

Zmiešaním roztoku A a roztoku B v pomere 1 : 1 bol pripravený hydrogél so zložením uvedenom v nasledujúcej tabuľke (tabuľka 21).

Tabuľka 21 Zloženie zosieteného derivátu crossHA-TA

5

Zloženie zosieteného derivátu crossHA-TA	
HRP.....	0,24 U/ml
crossHA-TA.....	20 mg/ml
NaCl.....	8 g/l
KCl.....	0,2 g/l
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O.....	2,85 g/l
KH ₂ PO ₄	0,2 g/l

2. Príprava roztoku s obsahom hyaluronanu a chondroitín sulfátu

Roztok HA s koncentráciou 10 mg/ml a ChS s koncentráciou 20 mg/ml bol pripravený rozpustením natívneho hyaluronanu s Mw 1,91 x 10⁶ g.mol⁻¹ a chondroitín sulfátu s Mw = 10 x 10³ – 40 x 10³ g.mol⁻¹ vo fosfátovom pufri (PBS).

10

3. Homogenizácia hydrogélu a roztoku s obsahom hyaluronanu a chondroitín sulfátu

Finálny hydrogél bol pripravený zmiešaním zosieteného derivátu crossHA-TA a roztoku HA a ChS v pomere 1 : 1 s následnou homogenizáciou zmesi. Finálne zloženie materiálu je uvedené v nasledujúcej tabuľke (tabuľka 22).

15

Tabuľka 22 Finálne zloženie hydrogélu, HA s koncentráciou 5 mg/ml a ChS s koncentráciou 10 mg/ml

Finálne zloženie	
HRP.....	0,12 U/ml
crossHA-TA.....	10 mg/ml
HA.....	5 mg/ml
ChS.....	10 mg/ml
NaCl.....	8 g/l
KCl.....	0,2 g/l
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O.....	2,85 g/l
KH ₂ PO ₄	0,2 g/l

Príklad 11

20 Príprava hydrogélů na báze hydroxyfenylového derivátu HA-TA s koncentráciou 5 mg/ml

Hydrogély boli pripravené zmiešaním dvoch prekursorových roztokov A a B, na prípravu ktorých bol použitý vodný roztok NaCl (9 g/l). Na prípravu prekursorových roztokov bol použitý hydroxyfenylový derivát HA-TA s Mw = 1,5 x 10⁶ g.mol⁻¹ a DS 0,5 %. Zloženie roztokov je uvedené v nasledujúcej tabuľke (tabuľka 23).

25 Tabuľka 23 Zloženie prekursorových roztokov na prípravu hydrogélů na báze hydroxyfenylového derivátu HA-TA s koncentráciou 5 mg/ml

Roztok A	Roztok B
HRP.....0,12 U/ml	H ₂ O ₂0,5 mmol/l
HA-TA.....5 mg/ml	HA-TA.....5 mg/ml
NaCl.....9 g/l	NaCl.....9 g/l

30 Zmiešaním roztoku A a roztoku B v pomere 1 : 1 boli pripravené hydrogély s finálnym zložením, uvedeným v nasledujúcej tabuľke (tabuľka 24), kde crossHA-TA je kovalentne zosieteným hydroxyfenylovým derivátom hyaluronanu.

Tabuľka 24 Finálne zloženie hydrogélův na báze hydroxyfenylového derivátu HA-TA s koncentráciou 5 mg/ml

Zloženie hydrogélův	
HRP.....	0,06 U/ml
crossHA-TA.....	5 mg/ml
NaCl.....	9 g/l

Príklad 12

- 5 Príprava hydrogélův na báze hydroxyfenylového derivátu HA-TA s koncentráciou 30 mg/ml

Hydrogély boli pripravené zmiešaním dvoch prekursorových roztokov A a B, na prípravu ktorých bol použitý vodný roztok NaCl (9 g/l). Na prípravu prekursorových roztokov bol použitý hydroxyfenylový derivát HA-TA s $M_w = 5 \times 10^4 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ a DS 10 %. Zloženie roztokov je uvedené v nasledujúcej tabuľke (tabuľka 25).

- 10 Tabuľka 25 Zloženie prekursorových roztokov na prípravu hydrogélův na báze hydroxyfenylového derivátu HA-TA s koncentráciou 30 mg/ml

Roztok A	Roztok B
HRP.....	1,2 U/ml
HA-TA.....	30 mg/ml
NaCl.....	9 g/l
	H ₂ O ₂
	5 mmol/l
	HA-TA.....
	30 mg/ml
	NaCl.....
	9 g/l

- 15 Zmiešaním roztoku A a roztoku B v pomere 1 : 1 boli pripravené hydrogély s finálnym zložením, uvedeným v nasledujúcej tabuľke (tabuľka 26), kde crossHA-TA je kovalentne zosieteným hydroxyfenylovým derivátom hyaluronanu.

Tabuľka 26 Finálne zloženie hydrogélův na báze hydroxyfenylového derivátu HA-TA s koncentráciou 30 mg/ml

Zloženie hydrogélův	
HRP.....	0,6 U/ml
crossHA-TA.....	30 mg/ml
NaCl.....	9 g/l

20

Príklad 13

Degradácia roztokov HA s prídavkom ChS pomocou ROS

- 25 Na porovnanie rýchlosti degradácie roztokov HA s ChS pôsobením ROS boli pripravené roztoky hyaluronanu vo fosfátovom pufri (PBS) s rôznou koncentráciou ChS. Na prípravu roztokov bola použitá kyselina hyalurónová s $M_w 1,91 \times 10^6 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ a ChS s $M_w = 10 \times 10^3 - 40 \times 10^3 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$. Roztok A obsahoval 20 mg/ml HA, roztok B 20 mg/ml HA a 0,5 mg/ml ChS, roztok C 20 mg/ml HA a 1 mg/ml ChS, roztok D 20 mg/ml HA a 3 mg/ml ChS, roztok E 20 mg/ml HA a 5 mg/ml ChS, roztok F 20 mg/ml HA a 20 mg/ml ChS.

Uskutočnenie experimentu degradácie

- 30 Rýchlosť degradácie bola vyjadrená ako percentuálny pokles viskozity roztokov pri šmykovej rýchlosti $0,1 \text{ s}^{-1}$ oproti počiatočnej hodnote. Meranie poklesu viskozity sa uskutočňovalo na reometri Kinexus Malvern v konfigurácii cone-plate. Bol použitý kužel s priemerom 40 mm s vrcholovým uhlom 1° . Degradácia materiálu prebiehala v 10 ml striekačkách, kde do 9 ml materiálu bolo pridaných 0,5 ml roztoku CuSO₄ s koncentráciou 0,25 mmol/l a následne 0,5 ml roztoku H₂O₂ s koncentráciou 2,5 mmol/l. Počas prebiehajúcej degradácie hydrogélův boli vo vopred daných časových intervaloch odoberané vzorky materiálu, pri ktorých bola nameraná viskozita pri teplote 25°C a šmykovej rýchlosti $0,1 \text{ s}^{-1}$. Celkový čas degradácie bol 3 h.

- 35 Obr. 1 znázorňuje degradáciu reťazcov hyaluronanu, ktorá je vyjadrená percentuálnym poklesom viskozity roztokov v čase. Z obr. 1 je vidieť vplyv koncentrácie ChS na rýchlosť degradácie hyaluronanu. So zvyšujúcou sa koncentráciou ChS klesá rýchlosť degradácie HA pôsobením ROS. Viskozita roztoku A, ktorý neobsahoval ChS, po 3 hodinách poklesla o 97 % oproti počiatočnej hodnote pred degradáciou, roztoku B (s prídavkom 0,5 mg/ml ChS) už o 89 %, roztoku C, do ktorého bolo pridaných 1 mg/ml ChS o 84 %, roztoku D (20 mg/ml HA + 3 mg/ml ChS) o 46 %, roztoku E (20 mg/ml HA + 5 mg/ml ChS) o 25 % a roztoku F (20 mg/ml HA + 20 mg/ml ChS) len o 8 %.

Príklad 14

Degradácia hydrogélův na báze zosieteného derivátu crossHA-TA pôsobením ROS

Na porovnanie rýchlosti degradácie hydrogélův pôsobením ROS boli pripravené 3 typy materiálov.

Materiál A je roztok HA s koncentráciou 20 mg/ml, ktorý bol pripravený rozpustením HA s M_w $1,91 \times 10^6$ g.mol⁻¹ v PBS.

Materiál B je zmes zosieteného derivátu crossHA-TA a nezosietenej HA, ktorý bol pripravený podľa príkladu 7.

Materiály C a D sa skladali z nezosietenej HA, ChS a crossHA-TA a boli pripravené podľa príkladov 9 a 10.

Rýchlosť degradácie bola vyjadrená ako percentuálny pokles viskozity materiálov pri šmykovej rýchlosti 0,1 s⁻¹ oproti počiatočnej hodnote. Meranie poklesu viskozity sa uskutočňovalo na reometri Kinexus Malvern v konfigurácii cone-plate. Bol použitý kužel s priemerom 40 mm s vrcholovým uhlom 1°. Degradácia materiálu prebiehala v 10 ml striekačkách, kde do 9 ml materiálu bolo pridaných 0,5 ml roztoku CuSO₄ s koncentráciou 0,25 mmol/l a následne 0,5 ml roztoku H₂O₂ s koncentráciou 2,5 mmol/l. Po určitých časoch degradácie sa odoberali vzorky, pri ktorých bola nameraná viskozita pri teplote 25 °C a šmykovej rýchlosti 0,1 s⁻¹. Celkový čas degradácie bol 3 h. Z obr. 2 je zrejmé, že prítomnosť ChS v pripravených hydrogélůch (C – 5 mg/ml ChS; D – 10 mg/ml ChS) zvyšuje ich odolnosť proti pôsobeniu ROS.

Príklad 15

Enzymatická degradácia hydrogélův na báze zosieteného derivátu crossHA-TA

Na zistenie vplyvu prítomnosti ChS na rýchlosť degradácie hydrogélův na báze crossHA-TA pôsobením bovinej testikulárnej hyaluronidázy boli pripravené 3 typy hydrogélův:

A – hydrogély bez prídavku chondroitín sulfátu, ktoré boli pripravené podľa postupu v príklade 2,

B – hydrogély s prídavkom ChS s koncentráciou 3,3 mg/ml, ktoré boli pripravené podľa postupu v príklade 4,

C – hydrogély s prídavkom ChS s koncentráciou 10 mg/ml, ktoré boli pripravené podľa postupu v príklade 5.

Rýchlosť degradácie bola vyjadrená ako nárast koncentrácie produktov degradácie, spôsobenej BTH, vyjadrený v percentách.

Hydrogély boli ponorené do degradačného média (roztok hyaluronidázy BTH s aktivitou 30 U/mg v roztoku hovädzieho sérového albumínu (BSA) s koncentráciou 0,1 mg/ml v 0,01 mol/l octanovom pufri (OP) pH 5,3). Degradácia hydrogélův prebiehala v inkubátore pri 37 °C za súčasného miešania. Po určitých časových intervaloch sa odoberali vzorky degradačného média s produktmi degradácie hydrogélův. Koncentrácia disacharidických jednotiek HA v degradačnom médiu bola stanovená spektrofotometricky ako koncentrácia *N*-acetylglukozamínu. Obr. 3 znázorňuje nárast koncentrácie degradačných produktov hydrogélův v médiu v čase. Z obr. je zrejmé, že prítomnosť ChS v hydrogélůch na báze crossHA-TA vedie k zníženiu rýchlosti degradácie materiálov pôsobením hyaluronidázy.

Odkazy:

Aubry-Rozier B. 2012. *Revue Médicale Suisse* 14: 571

Akkara, J. A., K. J. Senecal a D. L. Kaplan (1991). "Synthesis and characterization of polymers produced by horseradish peroxidase in dioxane." Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry **29**(11): 1561-1574.

5 Bali, J.-P., H. Cousse a E. Neuzil (2001). "Biochemical basis of the pharmacologic action of chondroitin sulfates on the osteoarticular system." Seminars in Arthritis and Rheumatism **31**(1): 58-68.

Baeurle S. A., Kiselev M. G., Makarova E. S., Nogovitsin E. A. 2009. *Polymer* 50: 1805

Buck li, D. W., M. Alam a J. Y. S. Kim (2009). "Injectable fillers for facial rejuvenation: a review." Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery **62**(1): 11-18.

10 Burdick, J. A. a G. D. Prestwich (2011). "Hyaluronic Acid Hydrogels for Biomedical Applications." Advanced Materials **23**(12): H41-H56.

Calabro, A., L. Akst, D. Alam, J. Chan, A. B. Darr, K. Fukamachi, R. A. Gross, D. Haynes, K. Kamohara, D. P. Knott, H. Lewis, A. Melamud, A. Miniaci a M. Strome (2008). Hydroxyphenyl cross-linked macromolecular network and applications thereof. United States, The Cleveland Clinic Foundation (Cleveland, OH, US).

15 Darr, A. a A. Calabro (2009). "Synthesis and characterization of tyramine-based hyaluronan hydrogels." Journal of Materials Science: Materials in Medicine **20**(1): 33-44.

Ghan, R., T. Shutava, A. Patel, V. T. John a Y. Lvov (2004). "Enzyme-Catalyzed Polymerization of Phenols within Polyelectrolyte Microcapsules." Macromolecules **37**(12): 4519-4524.

Higashimura, H. a S. Kobayashi (2002). Oxidative Polymerization, John Wiley & Sons, Inc.

20 Kurisawa, M., F. Lee a J. E. Chung (2009). Formation of Hydrogel in the Presence of Peroxidase and Low Concentration of Hydrogen Peroxide

Kurisawa, M., F. Lee, L.-S. Wang a J. E. Chung (2010). "Injectable enzymatically crosslinked hydrogel system with independent tuning of mechanical strength and gelation rate for drug delivery and tissue engineering." Journal of Materials Chemistry **20**(26): 5371-5375.

25 Lee, F., J. E. Chung a M. Kurisawa (2008). "An injectable enzymatically crosslinked hyaluronic acid-tyramine hydrogel system with independent tuning of mechanical strength and gelation rate." Soft Matter **4**: 880-887.

Li, P., D. Raitcheva, M. Hawes, N. Moran, X. Yu, F. Wang a G. L. Matthews (2012). "Hylan G-F 20 maintains cartilage integrity and decreases osteophyte formation in osteoarthritis through both anabolic and anti-catabolic mechanisms." Osteoarthritis and Cartilage **20**(11): 1336-1346.

30 Prestwich, G. D. (2011). "Hyaluronic acid-based clinical biomaterials derived for cell and molecule delivery in regenerative medicine." J Control Release **155**(2): 193-199.

Salwowska, N. M., A. Bebenek, D. A. Żądło a D. L. Wcisło-Dziadecka (2016). "Physiochemical properties and application of hyaluronic acid: a systematic review." Journal of Cosmetic Dermatology **15**(4): 520-526.

35 Shutava, T., Z. Zheng, V. John a Y. Lvov (2004). "Microcapsule modification with peroxidase-catalyzed phenol polymerization." Biomacromolecules **5**(3): 914-921.

Stern, R., G. Kogan, M. J. Jedrzejewski a L. Šoltés (2007). "The many ways to cleave hyaluronan." Biotechnology advances **25**(6): 537-557.

Tognana, E., A. Borriore, C. De Luca a A. Pavesio (2007). "Hyalograft C: hyaluronan-based scaffolds in tissue-engineered cartilage." Cells Tissues Organs **186**(2): 97-103.

40 Veitch, N. C. (2004). "Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme." Phytochemistry **65**(3): 249-259.

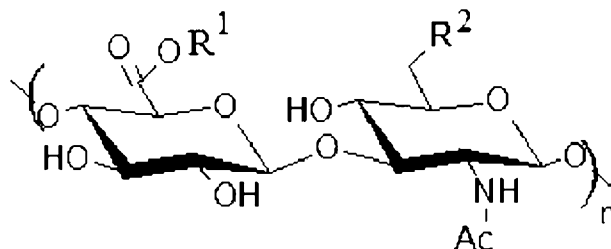
Volpi, N. (2019). "Chondroitin Sulfate Safety and Quality." Molecules (Basel, Switzerland) **24**(8): 1447.

Xiong, S.-L. a Z.-Y. Jin (2007). "THE FREE RADICAL-SCAVENGING PROPERTY OF CHONDROITIN SULFATE FROM PIG LARYNGEAL CARTILAGE IN VITRO." Journal of Food Biochemistry **31**(1): 28-44.

45 Xu, X., A. K. Jha, D. A. Harrington, M. C. Farach-Carson a X. Jia (2012). "Hyaluronic Acid-Based Hydrogels: from a Natural Polysaccharide to Complex Networks." Soft matter **8**(12): 3280-3294.

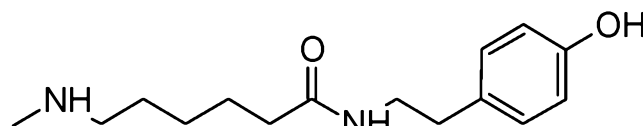
NÁROKY NA OCHRANU

1. Hydrogél na báze zosieťovaného hydroxyfenylového derivátu kyseliny hyalurónovej, **v y z n a č u - j ú c i s a t ý m**, že obsahuje molekuly hydroxyfenylového derivátu hyalurónovej kyseliny (HA-TA) alebo jeho farmaceuticky prijateľnú soľ podľa všeobecného vzorca (I)



(I),

kde n je v rozmedzí 2 až 7 500 a kde R¹ je H⁺ alebo ión alkalickéj soli alebo soli alkalických zemín a R² je OH alebo tyramínový substituent podľa všeobecného vzorca (II):



(II),

- 10 pričom v rámci jednej molekuly hydroxyfenylového derivátu hyalurónovej kyseliny alebo jeho farmaceuticky prijateľnej soli podľa všeobecného vzorca (I) je aspoň jeden R² tyramínový substituent podľa všeobecného vzorca (II) a pričom aspoň dva tyramínové substituenty podľa všeobecného vzorca (II) sú spojené prostredníctvom kovalentnej väzby v ktorejkoľvek ortopolohe fenylových skupín, a ďalej obsahuje chondroitín sulfát alebo jeho farmaceuticky prijateľnú soľ vybranú zo skupiny obsahujúcej alkalické soli alebo soli alkalických zemín.

15 2. Hydrogél podľa nároku 1, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že alkalické soli alebo soli alkalických zemín sú vybrané zo skupiny obsahujúcej Na⁺, K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺.

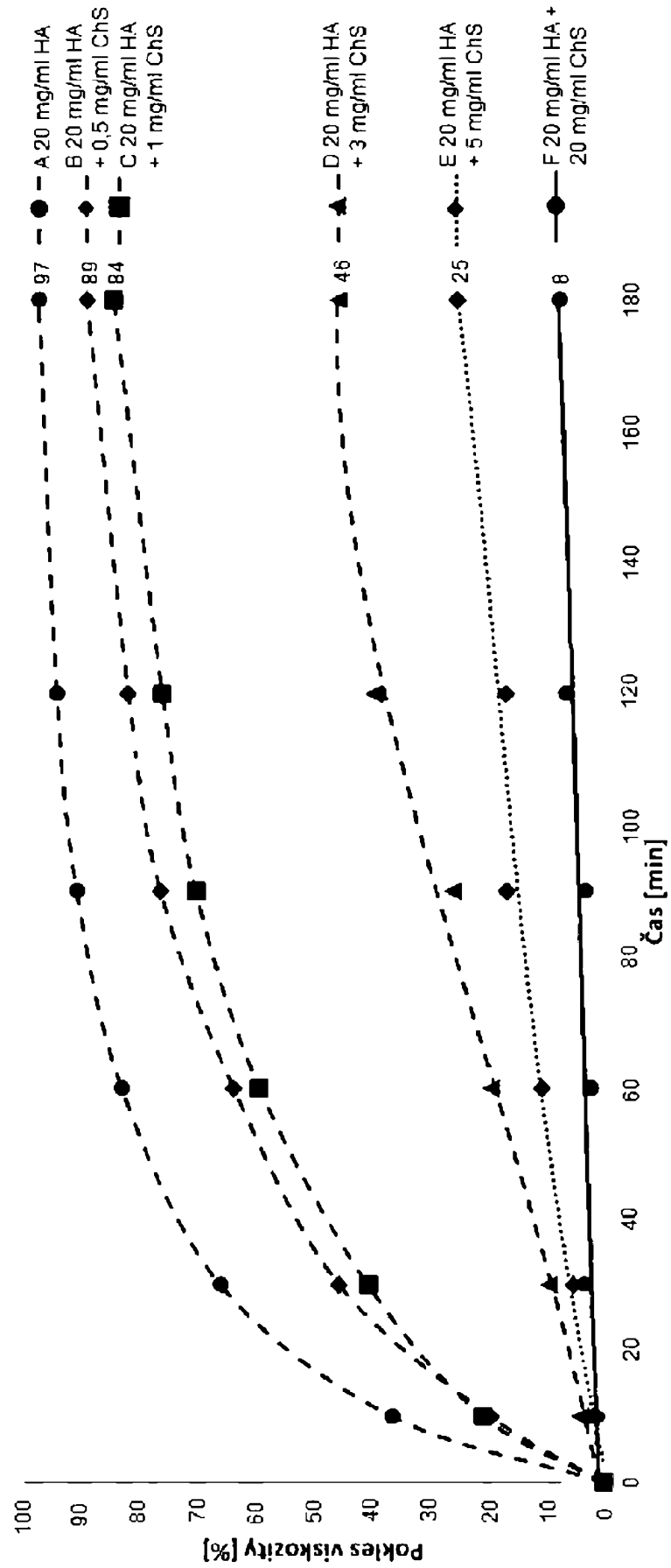
3. Hydrogél podľa nároku 1 alebo nároku 2, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že koncentrácia chondroitín sulfátu alebo jeho farmaceuticky prijateľnej soli je v rozsahu 0,5 až 50 mg/ml hydrogélu, výhodne v koncentrácii 1 až 20 mg/ml, výhodnejšie 5 mg/ml.

20 4. Hydrogél podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 3, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že obsah zosieťovaného hydroxyfenylového derivátu hyaluronanu je v rozsahu 5 až 30 mg/ml, výhodne 10 mg/ml hydrogélu.

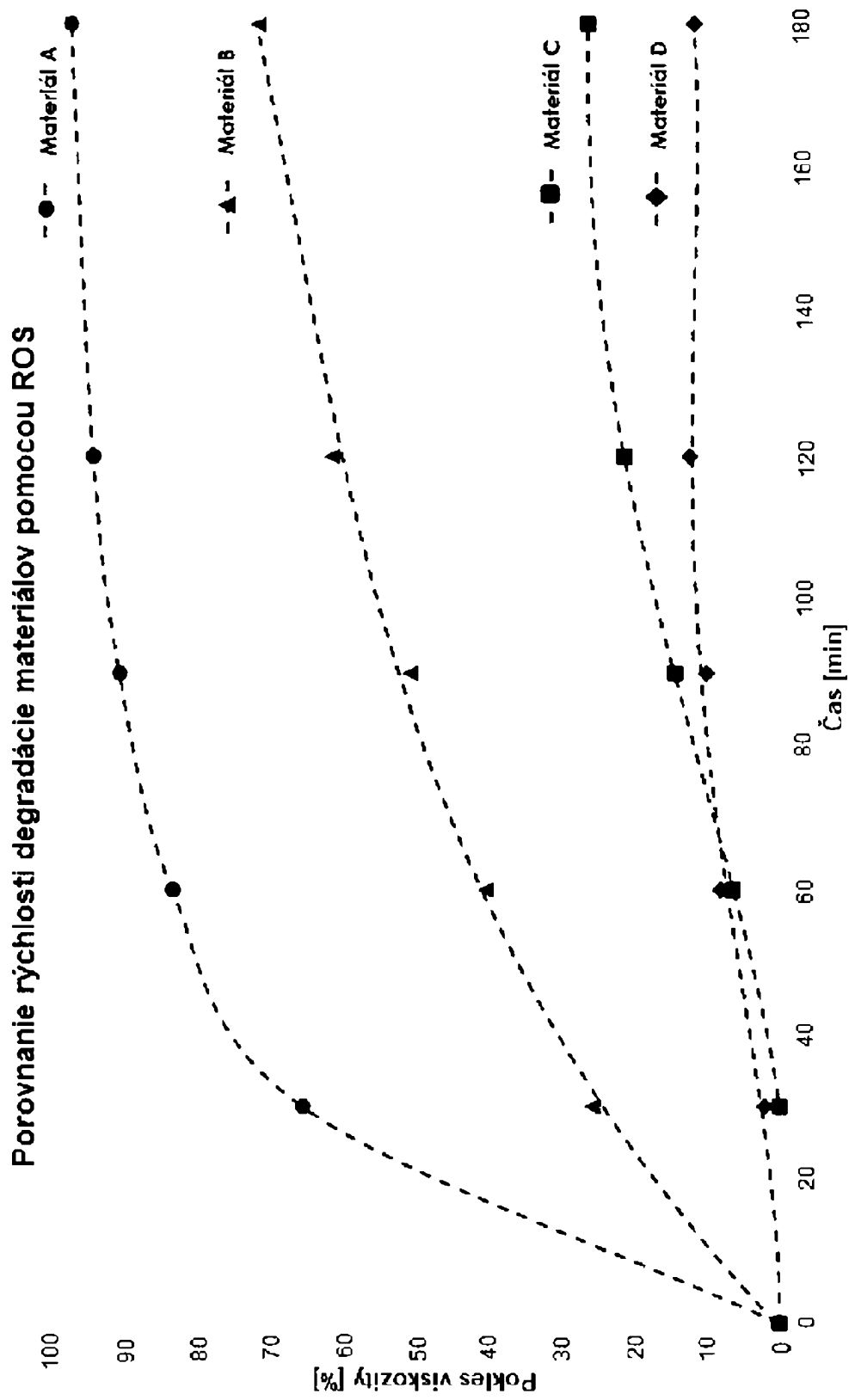
- 25 5. Hydrogél podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 4, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že ďalej obsahuje kyselinu hyalurónovú alebo jej farmaceuticky prijateľnú soľ v koncentrácii 1 až 20 mg/ml hydrogélu, výhodne 5 až 10 mg/ml, výhodnejšie 5 mg/ml hydrogélu.

3 výkresy

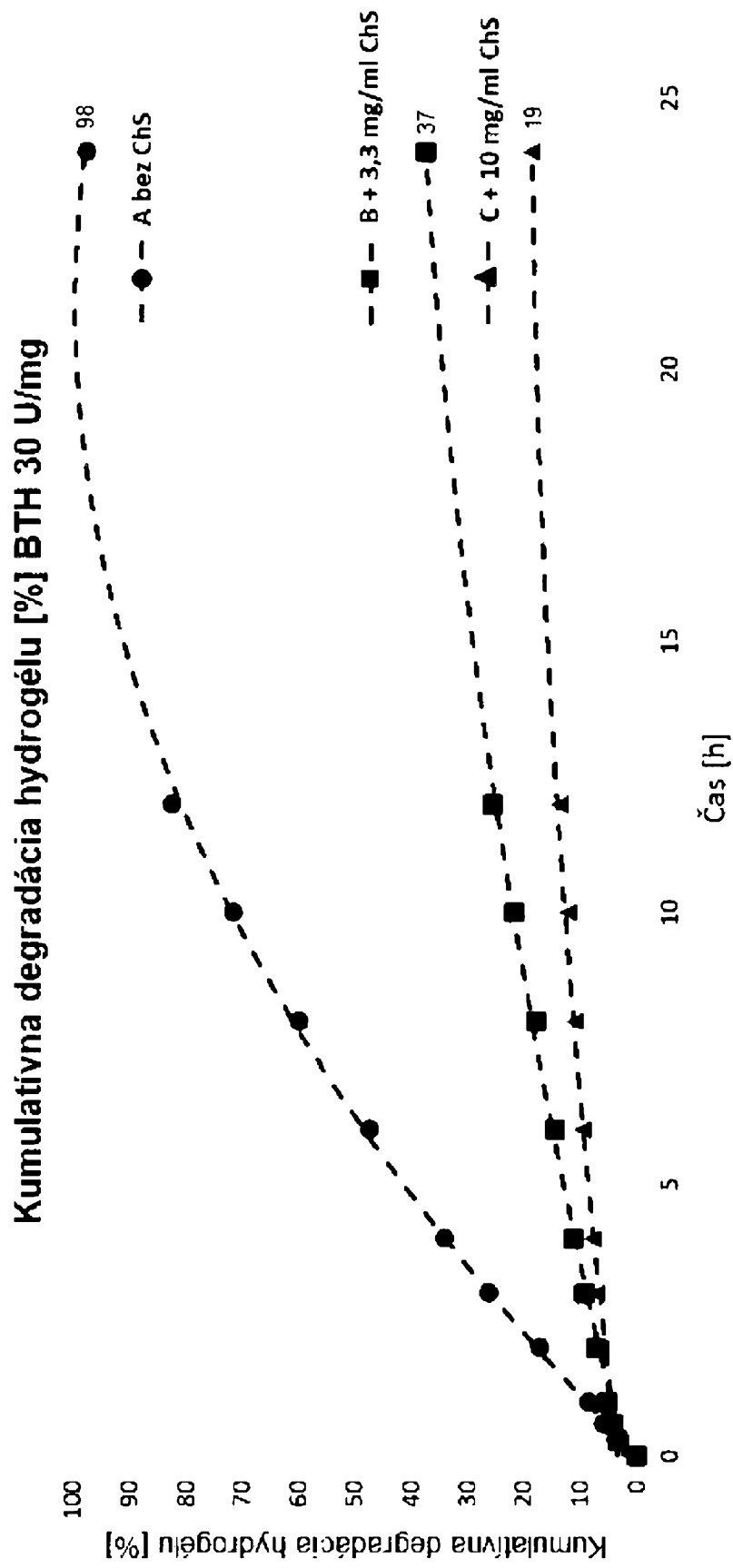
Porovnanie rýchlosti degradácie roztokov HA s prídavkom ChS pomocou ROS



Obr. 1



Obr. 2



Obr. 3

 Koniec dokumentu
