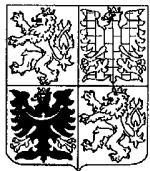


PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **08.11.1999**
(32) Datum podání prioritní přihlášky: **11.11.1998**
(31) Číslo prioritní přihlášky: **1998/MI002440**
(33) Země priority: **IT**
(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **12.09.2001**
(Věstník č. 9/2001)
(86) PCT číslo: **PCT/EP99/08481**
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO00/27887**

(21) Číslo dokumentu:

2001 - 1650

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

C 08 B 37/08

(71) Přihlašovatel:
AQUISITIO S. P. A., Milano, IT;

(72) Původce:
Barbucci Rolando, Milano, IT;
Rapuoli Roberto, Milano, IT;

(74) Zástupce:
Korejzová Zdeňka JUDr., Spálená 29, Praha 1, 11000;

(54) Název přihlášky vynálezu:
Zesítné hyaluronové kyseliny

(57) Anotace:

Nové zesítné hyaluronové kyseliny, získatelné reakcí aktivovaných karboxylových skupin přirozené rovné hyaluronové kyseliny z extraktivního nebo biosyntetického zdroje, s polyaminem, zejména rovným alkyldiaminem. Zesítné hyaluronové kyseliny mohou být volitelně sulfátovány nebo hemisukcinylovány a jsou vhodné jako náhrada synoviální tekutiny, očního sklivce, jako matrixové formy léčiv s řízeným uvolňováním, jako hojivá a protipřílnavá činidla a pro výrobu cévních protéz, biohybridních orgánů, hojivých přípravků, oftalmických a otologických prostředků, protéz, implantátů, implantátů a léčebných přípravků.

CZ 2001 - 1650 A3

Zesítěné hyaluronové kyseliny

Oblast techniky

Předkládaný vynález se týká zesítěných hyaluronových kyselin (HK), podle volby hemisukcinylovaných nebo sulfatovaných, jejich solí s biologicky vhodnými nebo farmakologicky aktivními kationty a jejich komplexů s těžkými kovy jako je měď, zinek a železo.

Dosavadní stav techniky

Hyaluronová kyselina je glykosaminoglykan, sestávající z disacharidových jednotek kyseliny D-glukuronové a N-acetylglukosamin-2-acetamid-2-deoxy-D-glukózy, spojených $\beta(1\rightarrow3)$ glykosidovými vazbami.

Přírodní kyselina hyaluronová má přímou, nikoli zesítěnou strukturu o molekulové hmotnosti 50 000 až 8 000 000 či více, v závislosti na zdroji a způsobu extrahování.

Hyaluronová kyselina je přítomna v synoviální tekutině, pojivové tkáni a v očním sklivci vyšších živočichů, stejně jako u některých bakterií.

Směsi hyaluronátu sodného o různých molekulových hmotnostech (ve formě roztoků, majících různé viskozity, gelů o rozdílných viskoelastických charakteristikách, filmů či membrán nebo houbiček) se používají v humánní medicíně a chirurgii například jako náhrady synoviální tekutiny, tkáňová protipřílnavá agens, náhrady sklivce, umělé slzy, činidla pro tkáňovou rekonstituci v podmínkách *in vivo* (například jako vněbuněčné matrice pro formování kostních segmentů s následnou kolonizací osteoblastů a kalcifikací; pojivové pokožkové tkáně s následnou kolonizací fibroblastů), jako materiály pro přípravu umělé kůže, vhodné k léčbě popálenin nebo pro plastickou chirurgii; jako překrývací agens pro biologicky slučitelné cévní protézy, jako

nosiče farmakologicky aktivních přísad v prostředcích se řízeným uvolňováním aktivní složky a podobně.

V dermatologii a kosmetice se, vzhledem ke svým viskoelastickým a zvlhčujícím vlastnostem a vysoké biologické slučitelnosti, uvedené směsi používají jednak jako základ pro zvlhčující, místně nanášené prostředky a také jako agresivní léčebné-operační přípravky ("výplňová činidla").

Použití přírodní, přímé (lineární) kyseliny hyaluronové pro zmiňované účely je samozřejmě omezeno jejím rychlým rozpadem (degradací in vivo působením enzymových systémů jako je hyaluronidáza, glukosidáza a glukuronidáza, s následným snížením molekulové hmotnosti a progresivním zhoršením viskoelastických vlastností a, obecně, fyzikálních charakteristik konečných směsí a přípravků (mechanické síly, pružnosti, velikosti pórů) a podobně.

Pro překonání tohoto problému, hlavně pak s cílem zvýšit škálu směsí a jejich pružnost nanášení, byly navrženy chemicky pozměněné hyaluronové kyseliny.

Bylo předloženo zesítení s polyfunkčními epoxidy (US 4 716 224, 4 772 419, 4 716 154), polyalkoholy (US 4 957 744), divinylsulfonem (US 4 582 865, 4 605 601, 4 636 524), aldehydy (US 4 713 448, 5 128 326, 4 582 568), biskarbodiimidy (US 5 356 883) a s polykarboxylovými kyselinami (EP-A-718312).

Uvedené zesítené hyaluronové kyseliny se používají jako biologické materiály pro implantáty, protézy a léčebné přípravky, jako jsou matrice s řízeným uvolňováním léčiva, jako jsou hojivá, protipřílnavá a obvazová činidla.

Sulfatace nezesítné hyaluronové kyseliny je obecně předložena v US 5 013 724, týkající se především sulfatování heparinů, heparanů a dermatanů pro použití jako protitrombotických a protisrážlivých činidel.

Hemisukcinylační reakce kyseliny hyaluronové (HK) nebyla nikdy předložena. Příklad zavedení této skupiny je uveden v EP-B-200 574, nárokuje kompozitní biologické materiály, sestávající ze sukcinylovaného kolagenu a chitosanu.

Zesítní karboxyalkylcelulózy prostřednictvím diaminů nebo polyaminů je uvedeno v EP-A-566 118 (Kimberly Clark Corp.) pro přípravu absorbujících materiálů s HK jako síťovacím činidlem pomocí zahřívání. Takový postup se zdá ekonomicky výhodný a vhodný pro výrobu ve velkém měřítku, vyžadovaném pro tento typ výrobků.

EP-A-462 426 (Fidia) předkládá perforované biologicky slučitelné membrány a jejich použití jako umělé kůže. Kolageny zesítné diaminy a kyselinou hyaluronovou jsou všeobecně uváděny jako možné materiály pro uvedené membrány.

Podstata vynálezu

Nyní bylo zjištěno, že nové zesítné hyaluronové kyseliny, které lze získat reakcí vhodně aktivovaných karboxylových skupin hyaluronové kyseliny s polyaminem, stejně jako jejich sole a komplexy s vhodnými organickými nebo anorganickými kationty, mají výhodné fyzikálně chemické a biologické vlastnosti pro použití v biomedicině a kosmetice.

Hlavní fyzikálně-chemické a biochemické charakteristiky sloučenin podle vynálezu jsou:

- vysoká biologická slučitelnost,

- vysoká odolnost vůči enzymatickému odbourávání, zejména po sulfatování,
- vysoká kapacita absorbování vody, s vytvářením viskoelastických charakteristik závislých na stupni zesítnění, stejně jako na stupni sulfatování a/nebo stupni hemisukcinylace,
- schopnost chelatovat kovové ionty jako je zinek nebo měď; uvedené deriváty mají velice dobrou stálost.

Biologické chování je nové a překvapující; je známo, že sulfatace (nebo supersulfatace) glykosaminoglykanů jako je heparin, dermatansulfát, chondroitin a přírodní kyselina hyaluronová zvyšuje jejich protisrážlivé účinky (inhibice faktorů Xa a IIa a/nebo změna jejich poměru) oproti výchozímu produktu (US 5 013 724).

Sloučeniny podle vynálezu mají, pokud jsou sulfatované, slabou protisrážlivou aktivitu, ovšem naprosto překvapivá je nepřítomnost aktivace destiček a srážení (měřeno jako protipřilnavá aktivita; P.R.P. model u králíků podrobených stresu chování, popsánemu v "Abstract IL 15" - International Conference on Advances in Biomaterials and Tissue Engineering, 14.-19. Juin 1998, Capri, Itálie) jak u zesítněné hyaluronové kyseliny podle vynálezu (o různých stupních zesítnění), tak u odpovídajících sulfátových esterů; tato vlastnost zcela chybí u přírodní kyseliny hyaluronové a esterových derivátů.

Žádné až do teď známé polymerní materiály pro léčebné použití očividně tuto vlastnost nesdílejí.

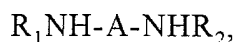
Vynález se týká nových zesítněných hyaluronových kyselin, získatelných reakcí aktivovaných karboxylových skupin přírodní rovné kyseliny hyaluronové z extrakčního nebo biosyntetického zdroje, s polyaminem a zejména pak s rovným alkyldiaminem.

Podle upřednostňovaného ztěsnění je zesíťená hyaluronová kyselina podle vynálezu dále podrobena sulfataci a hemisukcinylací. Získané produkty a jejich sole nebo komplexy mají zcela nové vlastnosti (například bobtnavost, pohyblivost vody v gelu, chemotaktickou aktivitu v endoteliálních buňkách, viskoelastické vlastnosti).

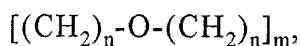
Uvedené esterifikační postupy se provádějí známými způsoby (použití reagensů pyridinu/SO₃; kyseliny chlorsulfonové; sukcinanhydridu, v homogenní nebo heterogenní fázi, při pH od 6,5 do 8).

Příklady postupu hemisukcinylace kolagenu jsou uvedeny ve WO 88/10123 a v US 4493829.

Polyaminem, který má být použitý jako síťující činidlo podle vynálezu, je s výhodou diamin o vzorci



kde A je rovný nebo větvený C₂-C₁₀ alkylenový řetězec, s výhodou C₂-C₆ řetězec, podle volby substituovaný hydroxyskupinami, karboxyskupinami, halogenovými skupinami, alkoxyskupinami a aminoskupinami; polyoxyalkylenový řetězec



kde n je 2 nebo 3, m je celé číslo od 2 do 10; C₅-C₇ cykloalkylová skupina; arylová nebo hetarylová skupina, s výhodou 1, 4 substituovaný nebo 1,3 disubstituovaný benzen; R₁ a R₂, stejné nebo rozdílné, jsou vodíkovými, C₁-C₆ alkylovými, fenylovými nebo benzylovými skupinami.

Upřednostňovaným A jsou C₂-C₆ alkylen nebo řetězec $[(CH_2)_n-O-(CH_2)_m]$. R₁ a R₂ jsou s výhodou atomy vodíku.

Polamin reaguje s hyaluronovou kyselinou nebo jejími solemi, jejichž karboxylové skupiny byly předem aktivovány.

Aktivace se může provádět běžnými metodami; například a s výhodou těmi obvykle používanými, v bezvodém aprotickém rozpouštědle, k vytvoření amidových vazeb v peptidové syntéze látkami jako karbonyldiimidazol; karbonyltriazol; hydroxybenzotriazol; N-hydroxysukcinimid; p-nitrofenol + p-nitrofenyltrifluoracetát; chlormethylpyridyliumjodid; s výhodou chlormethylpyridyliumjodid a podobně; tyto aktivátory umožňují nejlepší výtěžky a největší reprodukovatelnost pokud jde o stupeň zesílení.

Hyaluronová kyselina je s výhodou převáděna do formy sole s lipofilním kationtem, například tetralkylamoniovým kationtem nebo jinými lipofilními organickými bázemi, schopnými indukovat vhodnou rozpustnost v polárním aprotickém rozpouštědle jako je dimethylformamid, tetrahydrofuran a podobně.

Transformace anorganických solí, jako sodných solí, na vhodné organické kationty, může být prováděna dobře známými metodami iontové výměny v homogenní fázi, nebo vysrážením kyselé složky, jejím znovunabytím a následnou tvorbou sole s požadovanou organickou bází.

Aktivační reakce karboxylových skupin se obvykle provádí v homogenní fázi a v bezvodém polárním aprotickém rozpouštědle.

Síťující polyamin se přidává k roztoku aktivovaného esteru ve stejném bezvodém rozpouštědle za udržování teploty v rozmezí od 0 do 30°C. Doba reakce se pohybuje od 1 do 12 hodin v závislosti na přítomnosti vhodných bází jako je triethylamin.

Obecně se požadovaný konečný produkt znovu získává přidáním odlišného rozpouštědla za sníženého tlaku a následným běžným zpracováním.

Stupeň zesílení se může pohybovat v širokých mezích a může být upraven změnou množství aktivačního činidla karboxylových skupin, přičemž aktivace a síťovací reakce jsou téměř kvantitativní.

V důsledku toho je požadovaný stupeň zesíťení (C.L.D., procento karboxylových skupin zapojených v zesíťování) výborně reprodukovatelný, jak je prokázáno údaji z NMR (nukleární magnetické rezonance). Konečné produkty, získané za podobných určujících podmínek mají proto konstantní charakteristiky.

Výchozí hyaluronovou kyselinou může být jakákoli hyaluronová kyselina, mající molekulovou hmotnost od 5 000 do 8 000 000 a s výhodou od 10 000 do 200 000, extrahovaná z běžných zdrojů, nebo získatelná kvašením mikroorganismů skupiny *Streptococcus* nebo jiných technických kmenů.

Zesíťená kyselina hyaluronová podle vynálezu může být podrobena sulfataci s vhodným reakčním činidlem, s výhodou s komplexem pyridin/oxid sírový v dimethylformamidu.

Reakce se provádí v heterogenní fázi při teplotě 0 až 10°C po dobu od přibližně 0,5 do přibližně 6 hodin.

Stupeň získatelné sulfatace může být v širokém rozmezí hodnot a lze ho upravit změnou reakční doby a teploty.

Obecně se může stupeň sulfatace (definovaný jako ekviv. sulfátové skupiny/g) pohybovat od 1×10^{-6} do 6×10^{-6} , lépe pak činí přibližně 2×10^{-6} ekviv./g pro C.L.D.=0,5.

Zesíťená kyselina hyaluronová podle vynálezu může být rovněž podrobena hemisukcinylačním reakcím za známých podmínek (vodná heterogenní fáze, za důkladného míchání, přidání pevného sukcinahhydridu v následných dávkách, v hmotnostních poměrech od 1:1 do 1:5; udržování pH na hodnotě 7 až 8,5 pomocí alkalického činidla, při teplotách od 5 do 30°C). Stupeň hemisukcinylace může být v širokém rozmezí v závislosti na následujících parametrech: reakční době a teplotě; rychlosti míchání

vícefázového systému a rychlosti přidávání pevného suikcinanhydridu. Při udržování těchto parametrů na konstantní úrovni poskytuje reakce reprodukovatelné produkty. Zesítné hyaluronové kyseliny, volitelně sulfatované nebo hemisukcinylované, podle vynálezu vykazují schopnost vytvářet komplexy s kovovými ionty jako je měď, zinek a železo.

Tyto komplexy lze snadno získat rozpuštěním nebo rozptýlením až do úplného nabobtnání derivátu hyaluronové kyseliny ve vodě a přidáním za míchání, s výhodou při teplotě místnosti, koncentrovaného roztoku organické či anorganické sole mědi, zinku nebo železa, například CuCl_2 , ZnCl_2 či $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$; po 12 až 24 hodinách míchání se komplex zpětně získá odstředěním nebo vysrážením po změně rozpouštědla (např. přidání ethanolu nebo acetonu), anebo odpařením za sníženého tlaku; takto získaný surový produkt se důkladně promyje destilovanou vodou k odstranění přebytku iontu.

Poté se komplexy lyofilizují.

Obsah kovových iontů závisí na použitých provozních podmínkách: molárních poměrech polymeru a iontu, koncentraci a pH roztoku; reakčních dobách a zejména stupni zesítnění. Ten může dosáhnout maximálního objemu 1 kovového iontu na disacharidovou jednotku, neúčastnící se zesíťování.

Důležitá výhoda vynálezu spočívá v možnosti získání, vhodnou změnou stupně zesítnění a/nebo stupně sulfatace či sukcinylace, derivátů kyseliny hyaluronové v široké škále odlišných forem, charakterizovaných různými vlastnostmi (jako viskoelastičností, kovovými ionty, schopností vytvářet hydrogely, filmy, houbičky, mechanickou silou a podobně).

To umožňuje použití derivátů kyseliny hyaluronové podle vynálezu v různých lékařských a farmaceutických oblastech, v oblasti veterinární nebo humání medicíny:

- 1) jako nitrokloubní náhrady synoviální tekutiny pro léčbu osteoartritických stavů;
- 2) jako náhrad sklivce pro léčbu patologických změn a vedlejších účinků spojených s chirurgií oka;
- 3) jako základu přípravků umělých slz pro léčbu suchého oka;
- 4) jako matrix pro řízené uvolňování léčiv (např. protizánětlivých léčiv, antibiotik, β -adrenergických agonistů a antagonistů, inhibitorů aldosa reduktasy, antialergik, léčiv působících proti akné, proti plešatosti, novotvarům, glaukomu, svědění, lupence, proti mazotoku, protivředových léčiv, protivirových činidel, růstových faktorů a podobně) jejich jednoduchým uzavřením do hydrogelů, získaných ze sloučenin podle vynálezu. Jinou možností je vazba léčiva kovalentními vazbami k matrixu kyseliny hyaluronové, pomocí:
 - a) esterifikace nebo amidace skupin COOH, které se neúčastní zesílení s polyaminy, pokud je léčivem alkohol nebo amin;
 - b) esterifikace volnými hydroxyskupinami derivátů kyseliny hyaluronové, pokud má léčivo volné karboxylové skupiny.

Produkty spadající do (a) mohou být získány za použití stejného způsobu aktivace karboxylových skupin, jaký byl popsán dříve, v důsledně bezvodém médiu, nebo transesterifikací.

- 5) Pro přípravu přípravku na rány nebo kožní vředy, působícího léčivě, ve formě filmů o různé tloušťce, více či méně propustných pro plyny, houbiček a podobně. Takové přípravky s výhodou obsahují vhodná léčiva jako jsou antibiotika, léčivé faktory. Hodí se také pro kultivaci epitelálních buněk, keratinocytů a podobně.
- 6) Pro veškeré aplikace, u nichž bylo již dříve navrženo použití známých hyaluronových kyselin, například pro přípravu pevných či polopevných forem či modelovatelných forem pro výrobu cévních protéz (protipřílnavých obvazů krevních cév, umělých srdečních ventilů

a pod.) biohybridních orgánů (umělé slinivky, umělých jater); oftalmologických výrobků (náhrad očních čoček, kontaktních čoček); otologických výrobků (pro ušní lékařství); obecně protipřílnavých implantátů k použití v břišní, gynekologické, plastické, ortopedické, neurologické, oftalmologické, hrudní, otorhinolaryngologické chirurgii; léčebných přípravků jako jsou stenty, katetry, kanyly a podobně.

Použití zesítěné hyaluronové kyseliny a z ní získaných biomateriálů jsou známá a popsána, například ve WO 97/39788, WO 97/22629, WO 97/18244, WO 97/7833, EP 763754, EP 718312, WO 96/40005, WO 96/33751, US 5 532 221, WO 95/1165 a EP 320 164.

Zvláštní zájem se věnuje použití zesítěných hyaluronových kyselin podle vynálezu v kosmetické dermatologii, například jako zvlhčujících činidel, základů různých kosmetologických prostředků, injikovatelných plnidel a podobně.

Formální výrobky, získané z derivátů zesítěné kyseliny hyaluronové podle vynálezu, mohou být podrobeny sterilizaci (například zahřátím na 120°C nebo působením ethylenoxidu) bez jakékoli změny technologických vlastností, což je samozřejmě další výhodou, poskytovanou předkládaným vynálezem.

Předkládaný vynález je podrobněji popsán v následujících příkladech.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Sodná sůl kyseliny hyaluronové (1×10^{-3} mol. vzhledem k disacharidové jednotce) byla přeměněna na tributylamoniovou sůl (TBA sůl) podle jedné z následujících metod:

- a) 1% vodný roztok hyaluronátu sodného se převede do H^+ formy pomocí silné H^+ kationtové pryskyřice (amberlite IR 120); na konečný roztok se působí 0,5% roztokem TBA-OH přibližně do $pH=9$.
- b) 1% vodný roztok hyaluronátu sodného se převede na roztok TBA sole působením slabé kationtové pryskyřice v TBA^+ formě (Amberlite IRC 50).

V obou případech se konečný roztok lyofilizuje. TBA sůl se poté rozpustí v 15 ml bezvodého dimethylformamidu (DMF) pod dusíkovou atmosférou a k tomuto roztoku TBA sole se při $0^\circ C$ po kapkách přidá roztok 0,02 g chlormethylpyridiliumjodidu (CMPJ) ve 2 ml bezvodého DMF.

Reakční směs byla poté doplněna 0,1 ml triethylaminu a následně, po kapkách, roztokem 1,3-diaminpropanu ($d=0,88$, ve velkém přebytku, aby se snadněji vytvořilo zesíťení aktivovaných karboxylových skupin) ve 2 ml bezvodého DMF. Po skončení adice byla reakční směs míchána alespoň 30 minut a poté bylo rozpouštědlo odstraněno za sníženého tlaku, zbytek byl odebrán s DMF, který byl hned následně odstraněn destilací a zbytek byl promyt ethanolem, směsí ethanolu a vody a konečně vodou. Produkt byl lyofilizován a získaný zbytek podroben analýzám:

Infračervená spektra (IR, film): 1630 cm^{-1} ($-\underline{CO}-NH$); 1740 cm^{-1} ($-\underline{COOH}$, polysacharid); 3200 cm^{-1} ($-NH-$).

SD (stupeň nabobtnání, ve vodě a při teplotě místnosti, po 15'; gravimetrické stanovení; počítáno podle:

$$SD = \frac{W_s - W_d}{W_d} \cdot 100$$

kde W_s = hmotnost hydratovaného gelu; W_d je hmotnost suchého gelu): 31 000
stupeň zesíťení: 0,05 (5 % z původně dostupných karboxylových skupin).

Příklad 2

Postupem popsaným v příkladu 1 a za stejných podmínek jako v příkladu 1, za použití stejné hyaluronové kyseliny a stejného aktivačního činidla, kdy pouze místo 1,3-diaminopropanu byl jako aktivační činidlo použit 1,6-diaminohexan, byla získána zesíťená kyselina hyaluronová, mající stupeň zesíťení 0,05.

IR (film): 1630 cm^{-1} ($-\text{CO}-\text{NH}-$); 1740 cm^{-1} ($-\text{COOH}$ polysacharid); 3200 cm^{-1} ($-\text{NH}-$).

Příklad 3

Postupem popsaným v příkladu 1 a za stejných podmínek jako v příkladu 1, kdy byl jako aktivační činidlo použit 0,0'-dis(2-aminopropyl) PEG 500, byla získána zesíťená kyselina hyaluronová, mající stupeň zesíťení 0,05.

IR (film): 1630 cm^{-1} ($-\text{CO}-\text{NH}-$); 1740 cm^{-1} ($-\text{COOH}$ polysacharid); 3200 cm^{-1} ($-\text{NH}-$).

SD = 31 000

Příklad 4

0,6 g tributylamoniové sole kyseliny hyaluronové (1×10^{-3} mol. vzhledem k disacharidové jednotce) bylo za míchání rozpuštěno ve 30 ml DMF pod dusíkovou atmosférou. K míchanému roztoku, udržovanému při teplotě 0°C , byly po kapkách přidány 0,08 g chlormethylpyridyliumjodidu ($3,5 \cdot 10^{-4}$ mol), rozpuštěné ve 2 ml DMF. Molární poměr byl tedy přibližně 3:1.

Po 20 minutách byly přidány 2 ml 1,3-diaminopropanu (0,024 mol) a bezprostředně poté 0,5 ml triethylaminu. Získán byl pevný, želatinovitý produkt, který pak byl ponechán nabobtnat vodou a opět promyt ethanolem.

Konečný produkt vykazoval po lyofilizaci v skenovacím mikroskopu nepravidelný profil s hladkými zónami, střídajícími houbovitě zóny.

Stupeň zesítnění byl 0,3 (30 % původně dostupných karboxylových skupin).

IR (film): 1740 cm^{-1} (-COOH); 1630 cm^{-1} (-CO-NH); 1610 cm^{-1} (-COO-); 1560 cm^{-1} (-CO-NH-).

Příklad 5

0,6 g tributylamoniové sole kyseliny hyaluronové (1×10^{-3} mol. vzhledem k disacharidové jednotce) bylo za míchání rozpuštěno ve 30 ml DMF pod dusíkovou atmosférou. K míchanému roztoku, udržovanému při teplotě 0°C , bylo po kapkách přidáno 0,15 g chlormethylpyridyliumjodidu (CMPJ) (6×10^{-6} mol), rozpuštěného ve 2 ml DMF. Molární poměr byl 2(HK.TBA):1(CMPJ). Po 20 minutách byly k roztoku přidány 2 ml 1,3-diaminopropanu (0,024 mol). Následně bylo přidáno 0,5 ml triethylaminu.

Získaný pevný, rosolovitý produkt byl důkladně promyt DMF.

Po odpaření DMF byl produkt ponechán nabobtnat ve vodě a promyt ethanolem před tím, než byl lyofilizován.

Získaný produkt měl stupeň zesítnění 0,5 a vykazoval ve skanovacím mikroskopu zrnitý vzhled, přerušovaný širokým síťovím. Při vyšších zvětšeních obě morfologie působily identicky a vykazovaly kulaté výčnělky o průměru několika mikrometrů.

IR (film): 1740 cm^{-1} (-COOH); 1630 cm^{-1} (-CO-NH); 1610 cm^{-1} (-COO-); 1560 cm^{-1} (-CO-NH-).

Gely byly podrobeny bobtnání v PBS (pufrovaném fyziologickém roztoku) a stanovena byla maximální schopnost bobtnání.

SD = 23 500

NMR = ^{13}C ; ppm, tj. dílů z milionu): 29,3 a 39,8 ($-\overset{1}{\text{CH}_2}-\overset{2}{\text{CH}_2}-\overset{3}{\text{CH}_2}-\text{propan-}$
diaminové spojení); 172,5 ($-\overset{\cdot}{\underset{\text{O}}{\parallel}}{\text{C}}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$).

Rheologické vlastnosti, stanovované přístrojem Bohlin VOR Rheometer, při teplotě $23 \pm 0,1^\circ\text{C}$, ukázaly, že dynamický modul pružnosti G' (100 Pa při 10 Hz), identický při dvou uvažovaných koncentracích (10 a 20 mg/ml), je vždy vyšší než viskozní dynamický modul ($G'' = 40$ Pa pro 20 mg při 10 Hz a 20 Pa pro 10 mg při 10 Hz).

Příklady 6 až 9

Způsoby popsány v předcházejících příkladech byly získány zesílené deriváty hyaluronové kyseliny o charakteristikách, které jsou shrnuty v následující tabulce 1, přičemž se vycházelo z 1×10^{-3} mol (0,6 g) tributylamoniové sole hyaluronové kyseliny.

Získané deriváty měly následující vlastnosti:

Tabulka 1

př.	síťovací činidlo (mol)	množství (g) CMPJ (mol)	stupeň zesítění	SD	NMR (¹³ C) (ppm)	IR (film) (cm ⁻¹)	vzhled ve škanov. mikroskopu
6	1,3-propandi- amin (0,024)	0,6 g (1,2x10 ⁻³)	100 %	13 200	29,3/39,8 (-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -propan- diaminové spojení); 172,5 (-C(=O)-NH-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -) O	1630 (-CO-NH-); 1560 (-CO-NH-);	homogenní, zvlněná morfolofie
7	0,0'-1-bis-(2-di- aminopropyl) PEG 500 (0,022)	0,15 g (6x10 ⁻⁴)	50 %	9 000			střídající se hladké plochy a síťovina, okrouhlé výčnělky velikosti několika mikrometrů
8	0,0'-bis-(2-amino propyl) PEG 800 (0,022)	0,15 g (6x10 ⁻⁴)	50 %	6 100			dvě morfol. odlišné zóny, první zvlněná a druhá s děrovitými strukturami
9	1,6-diaminohexan (0,023)	0,15 g (6x10 ⁻⁴)	50 %	8 000	169,46 (-CO-NH- zesítění); 74,04/76,80/80,41 (CH ₂ - síťovacího ramena)	1740 (-COOH); 1630 (-CO-NH-); 1610 (COO ⁻); 1560 (-CO-NH-);	hladký povrch s výčnělky velikosti několika mikrometrů

Příklad 10

Sulfatování 50% zesítené kyseliny hyaluronové

Derivát získaný v příkladu 5 byl dispergován v 5 ml DMF za důkladného míchání a pod dusíkovou atmosférou.

Za teploty 0°C byl přidán roztok 1 g SO₃/pyridinu v mol DMF a míchán 3 hodiny. Reakce byla zablokována přidáním přebytku H₂O (50 ml) a pH bylo upraveno na hodnotu 9 pomocí 0,1 mol.l⁻¹ NaOH.

Produkt byl důkladně promyt ethanolem a H₂O a poté byl lyofilizován.

Infračervené spektrum prokazuje kromě pásů výchozího produktu, maximum (pík) o hodnotě 1260 cm⁻¹ a silnější pás o hodnotě 1025 cm⁻¹.

Gel bobtná v pufrovaném fyziologickém roztoku (PBS) se stupněm nabobtnání SD = 33 000. ¹³C NMR spektrum o vyšší rozlišovací schopnosti prokazuje signály v H₂O při 37°C, uvedené v tabulce 2. Intensita NMR signálů při 29,3 a 38,8 ppm (částí z milionu) (-CH₂-) a signál při 172,5 ppm (CONH) potvrzuje přibližně 50% stupeň zesítení.

Reologické vlastnosti (týkající se deformačního chování) jsou charakterizovány dynamickými moduly pružnosti G' (2500 Pa u 20 mg a 1000 Pa u 10 mg při 10 Hz), které jsou vždycky vyšší než dynamické viskozní moduly G'' (600 Pa u 20 mg a 150 Pa u 10 mg při 10 Hz) a mnohem vyšší než odpovídající hodnoty, získané s nesulfatovanou hyaluronovou kyselinou (13 při 50% - příklad 5). Tato sloučenina má dobu thrombinu (thrombin time) TT vyšší (61±5) než kontrola (14,0") a odpovídající nezesítená sloučenina (14,6").

Sloučenina byla aktivní také v testu PRP za použití stresovaných králíků.

Tabulka 2: ^{13}C chemický posun

C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	x-C=O	y-CH ₃	
103,5	57,3	85,4	71,3	78,7	178,0	25,3	ppm
C-1'	C-2'	C-3'	C-4'	C-5'	6-C=O		
105,9	75,2	76,4	82,8	78,6	176,2		ppm
1-CH ₂	2-CH ₂	3-CH ₂	6'-C=O	zesítěnění			
39,8	29,3	39,8	172,5				ppm

Příklad 11

Za použití stejné metodologie byly syntetizovány sulfatované deriváty 50% zesíťovaných produktů podle příkladu 7, 8 a 9.

Kolorimetrické charakteristiky sulfatovaných derivátů jsou uvedeny v tabulce 3 společně s charakteristikami produktů, odvozených od příkladů 5 a 10.

Tabulka 3

zesítěňý polymer (50% st. zesítěnění)	ΔHa [J/g]	T _g [°C]	ΔHb [J/g]	hm.% vody
zesíť. hyal-1,3 (př. 5)	276	51	42	12
zesíť. hyalS-1,3 (př. 10)	357	64	53	16
zesíť. hyal-1,6 (př. 9)	327	64	58	16
zesíť. hyalS-1,6	465	64	65	20
5 zesíť. hyal-P500.2NH ₂ (př. 7)	239	45	72	10
6 zesíť. hyal-P500.2NH ₂	384	69	113	16
7 zesíť. hyal-P800.2NH ₂ (př. 8)	179	73	30	10
8 zesíť. hyalS-P800.2NH ₂	206	76	52	10
hyal ITBA	164	-	130	5

ΔH_a [J/g]: entalpie odpaření vody

T_g [°C]: entalpie tepelného degradačního procesu

ΔH_b [J/g]: teplota sklovatění

hm. % vody: % obsah vody vzhledem k ΔH_a

Příklad 12

Příprava komplexů Cu, Zn a Fe

100 mg lyofilizovaného gelu z příkladu 5 bylo přidáno za míchání a při teplotě místnosti, k 200 ml koncentrovaného roztoku chloridu měďnatého v destilované vodě. Suspenze byla míchána 24 hodin a komplex byl vysrážen přidáním ethanolu. Po odstředění byl vzniklý zbytek opakovaně promyt vodou a ethanolem k odstranění přebytku iontů.

Konečný gel světle zelené barvy byl lyofilizován a analyzován.

Stejný postup byl proveden za použití $ZnCl_2$ a $FeCl_2$.

Provedené analýzy (EDAX, polarografie, titrace 0,1 N HCl, atomová adsorpce) prokázaly obsah mědi 0,5 mol/disacharidové jednotky.

Zastupuje:

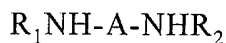
UD. JIŘENA KOREJZOVÁ
ADVOKÁTKA

PATENTOVÉ NÁROKY

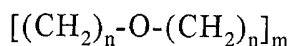
1. Zesítné hyaluronové kyseliny, získatelné reakcí karboxylových skupin hyaluronové kyseliny a polyaminu.

2. Zesítné hyaluronové kyseliny podle nároku 1, přičemž polyaminem je diamin.

3. Zesítné hyaluronové kyseliny podle nároku 2, přičemž diamin má vzorec

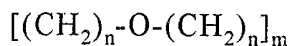


kde A je rovný nebo větvený C_2-C_{10} alkylenový řetězec, s výhodou C_2-C_6 řetězec, podle volby substituovaný hydroxyskupinami, karboxyskupinami, halogenovými skupinami, alcoxyskupinami a aminoskupinami; polyoxyalkylenový řetězec



kde n je 2 nebo 3, m je celé číslo od 2 do 10; arylová nebo hetarylová skupina, s výhodou 1, 4 substituovaný nebo 1,3 disubstituovaný benzen; R_1 a R_2 , stejné nebo rozdílné, jsou vodíkovými, C_1-C_6 alkylovými, fenylovými nebo benzylovými skupinami.

4. Zesítné hyaluronové kyseliny podle nároku 3, přičemž A je rovný C_2-C_6 alkylen nebo řetězec o vzorci



kde n je 2 a m je celé číslo od 2 do 10.

5. Zesítné hyaluronové kyseliny podle kteréhokoli z nároků 1 až 4, přičemž hydroxylové skupiny jsou sulfatované nebo hemisukcinylované.

6. Zesítné hyaluronové kyseliny podle kteréhokoli z předcházejících nároků ve formě gelu.

7. Zesítné hyaluronové kyseliny podle kteréhokoli z předcházejících nároků v pevných nebo polopevných formách.

8. Komplexy zinku, mědi nebo železa podle nároků 1 až 7.

9. Použití derivátů zesítných hyaluronových kyselin podle nároků 6 a 8 jako náhrad synoviální tekutiny, očního sklivce, jako matrixových forem léčiv s řízeným uvolňováním, jako hojivých a protipřilnavých činidel.

10. Použití derivátů zesítných hyaluronových kyselin podle nároku 7 k výrobě cévních protéz, biohybridních orgánů, hojivých přípravků, oftalmických a otologických prostředků, protéz,, implantátů a léčebných přípravků.

11. Biomateriály zahrnující zesítné hyaluronové kyseliny podle nároků 1 až 8.

Zastupuje:

JUDr. ZDEŇKA KOREJZOVÁ
ADVOKÁTKA