

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

305 040

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

C07H 5/06 (2006.01)

C08B 37/00 (2006.01)

C07D 407/12 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2010-687**
(22) Přihlášeno: **14.09.2010**
(40) Zveřejněno: **21.03.2012**
(Věstník č. 12/2012)
(47) Uděleno: **25.02.2015**
(24) Oznámení o udělení ve věstníku: **08.04.2015**
(Věstník č. 14/2015)

(56) Relevantní dokumenty:
Journal of Chromatografym 508, (1990), str. 333-339; hlavně str. 333, 335.
EP 1 790 665 A; WO 2004/011503 A; CN 101367884 A.

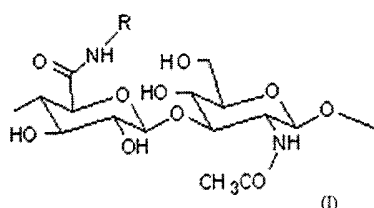
(73) Majitel patentu:
Contipro Biotech s.r.o., Dolní Dobrouč, CZ

(72) Původce:
Gloria Huerta-Angeles, Ph.D., Col. Alamos,
Nogales, Veracruz, MX
Drahomíra Chládková, p. Letohrad, CZ
Daniela Šmejkalová, Ph.D., Písek, CZ
Mgr. Radovan Buffa, Ph.D., Humenné, SK
RNDr. Vladimír Velebný, CSc., Žamberk, CZ

(74) Zástupce:
KANIA, SEDLÁK, SMOLA
Patentová a známková kancelář, Ing. František
Kania, Mendlovo nám. 1a, 603 00 Brno

(54) Název vynálezu:
**Způsob přípravy vysoce substituovaných
amidů kyseliny hyaluronové**

(57) Anotace:
Způsob přípravy vysoce substituovaných amidů kyseliny
hyaluronové obecného vzorce I s kontrolovatelným
stupněm substituce, připravených v polárním aprotickém
prostředí z kyselé formy kyseliny hyaluronové v
přítomnosti ethylchlorformiátu, pomocí primárního
aminu.



Způsob přípravy vysoce substituovaných amidů kyseliny hyaluronové

Oblast techniky

5

Technické řešení se týká způsobu přípravy amidových derivátů kyseliny hyaluronové s vysokým stupněm substituce, které jsou dále použitelné v medicíně, farmacii a pro přípravu hydrogelů v tkáňovém inženýrství.

10

Dosavadní stav techniky

15

Kyselina hyaluronová je lineární heteropolysacharid skládající se z opakujících se disacharidových jednotek kyseliny D–glukuronové a *N*–acetyl–D–glukosaminu. Jedná se o nerozvětvený polysacharid, který pokud je izolovaný z přírodního zdroje, může dosahovat molekulové hmotnosti v rozmezí od 5×10^4 do 5×10^6 g.mol⁻¹ v závislosti na způsobu izolace a výchozím materiálu.

20

Kyselina hyaluronová je hlavní složkou mezibuněčné hmoty a díky svým viskoelastickým vlastnostem je důležitou součástí reologických, fyziologických a biologických funkcí v těle. Díky své vysoké lubrikační kapacitě, schopnosti vysoké sorpce a zadržování vody je často aplikována v oční chirurgii. Likviduje volné kyslíkové radikály a ovlivňuje proliferaci i diferenciaci buněk. Dále zabraňuje ukládání kolagenu a tím podporuje hojení ran a zamezuje vzniku jizev.

25

Pro široké klinické použití nativní kyseliny hyaluronové je problematická především její velmi rychlá degradace v roztoku a poměrně špatné mechanické vlastnosti. Zlepšení těchto vlastností a zároveň zvýšení odolnosti proti degradaci lze dosáhnout chemickou modifikací hyaluronanu.

30

Z tohoto důvodu byla v posledních letech pozornost zaměřena na přípravu syntetických hyaluronových derivátů, které jsou rozpustné ve vodných roztocích, a po určitých úpravách mohou být aplikovatelné jako biodegradabilní a biokompatibilní materiály v medicíně, chirurgii a tkáňovém inženýrství. Jednou z vhodných úprav materiálu jsou síťovací reakce, kdy se z modifikované kyseliny hyaluronové vytváří hydrogely.

35

Hydrogely jsou hydrofilní sítě polymerů, které mohou být používány pro kontrolní distribuci léků, bioaktivních a jiných látek v organismu, jako skafoldy nebo kožní plniva. Důležitou podmínkou pro přípravu hydrogelů je stabilita derivátů, které jsou použity jako vstupní prekurzory pro síťovací reakci.

40

Pro tvorbu hydrogelů byla vyzkoušena řada modifikovaných derivátů hyaluronanu. Jedněmi z nich byly i amidové deriváty. Tyto deriváty si zasloužily velkou pozornost z důvodu jejich poměrně vysoké stability vůči degradaci a hydrolýze ve fyziologických podmínkách v prostředí bez enzymatické aktivity.

45

Současný stav přípravy amidových derivátů hyaluronanu pro následnou gelaci je založen na používání různých reakčních podmínek, které však vedou pouze k relativně nízkým stupňům amidace (do 30 %) (WO 2000/001733 (A1)). Velkou nevýhodou některých současných postupů je především to, že vlastní amidaci předchází deacetylace hyaluronanu (WO 2000/001733 (A1)). Amidový derivát hyaluronanu je následovně síťován až do vzniku hydrogelu. Síťování azidů a alkyňů, které jsou navázány na polysacharid přes amidickou vazbu, je nejčastěji katalyzováno měďnými kationty, které jsou toxické. Čím nižší je stupeň substituce amidových derivátů vstupujících do reakce, tím větší množství katalyzátoru musí být použito (WO 2008/031525 A1)).

50

Podstata vynálezu

Nízký stupeň amidových derivátů hyaluronanu může být navýšen aplikací specifických reakčních podmínek. Hlavní podstatou tohoto vynálezu je postup přípravy amidů kyseliny hyaluronové, při kterém dochází k selektivní amidaci karboxylové skupiny kyseliny hyaluronové za vzniku vysoce substituovaných produktů. Princip reakce spočívá v aktivaci karboxylové skupiny hyaluronanu pomocí ethylchlorformiátu, v přítomnosti báze, přičemž vzniklý intermediát – aktivovaný hyaluronan – následně reaguje s primárním aminem $R-NH_2$ za vzniku amidu kyseliny hyaluronové obecného vzorce I podle schématu 1:

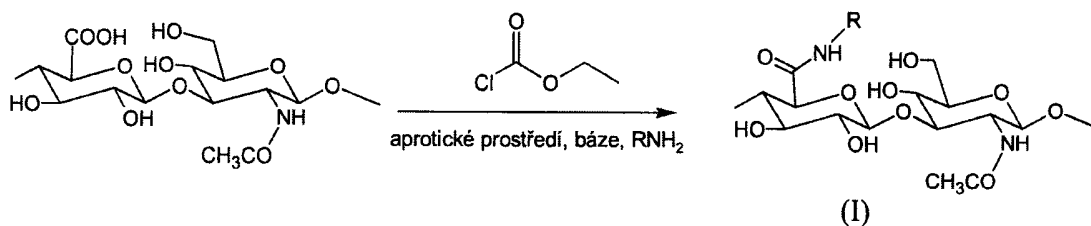


Schéma 1 Amidace kyseliny hyaluronové

kde R je alkylový lineární nebo rozvětvený řetězec C_1 až C_{30} , volitelně s obsahem aromatických nebo heteroaromatických skupin. Příprava probíhá s výhodou v polárním aprotickém prostředí, zejména v dimethylsulfoxidu. Kyselina hyaluronová je s výhodou v kyselé formě a má střední molekulovou hmotnost v rozmezí 1×10^4 až $5 \times 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$, zejména $3,5 \times 10^5$ až $5 \times 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$.

Ve výhodném provedení vynálezu probíhá reakce při teplotě 25°C po dobu 8 až 24 h, s výhodou po dobu 12 h.

Stupeň substituce kyseliny hyaluronové ve způsobu přípravy podle vynálezu je s výhodou řízen molárním množstvím přidaného aminu $R-NH_2$, přičemž primární amin se s výhodou přidá do reakce v čase 0,1 až 2 h po přidavku ethylchlorformiátu a v molárním množství 3 až 5 ekvivalentů vzhledem k látkovému množství dimeru hyaluronanu. Primárním aminem $R-NH_2$ může být například $CH\equiv C-CH_2-NH_2$, $NH_2-CH_2-CH_2-CH_2-N_3$ nebo $NH_2(CH_2)_5-CH_3$.

Ve výhodném provedení vynálezu je látkové množství přidaného ethylchlorformiátu v molárním poměru 3 až 5 ekvivalentů vzhledem k látkovému množství dimeru hyaluronanu. Bázi použitou ve způsobu podle vynálezu může být trialkylamin, například triethylamin, a to s výhodou v látkovém množství v molárním poměru 3 až 5 ekvivalentů báze vzhledem k látkovému množství dimeru hyaluronanu.

Výhodou oproti známým analogům je volitelně vysoký stupeň substituce, který vede k výrazné změně fyzikálně-chemických vlastností. Blokování karboxylové skupiny hyaluronanu v síťovaných produktech má za následek nižší bobtnavost, a tudíž lepší mechanickou stabilitu připravených síťovaných produktů.

Amidové deriváty hyaluronanu připravené tímto způsobem vykazují kontrolovatelný stupeň substituce v rozmezí 10 až 99 %. Stupeň substituce je kontrolován molárním poměrem primárního aminu, ethylchlorformiátu a báze, přičemž právě vhodně zvoleným množstvím primárního aminu $R-NH_2$, jako poslední složky, která se přidává do reakční směsi, lze stupeň substituce kyseliny hyaluronové s výhodou řídit v rozmezí 10 až 99 %.

Amidové deriváty jsou vysoce stabilní vůči degradaci a hydrolýze, a proto mohou být použity pro tvorbu stabilních hydrogelů. V případě vysokého stupně substituce je k síťovací reakci třeba jen velmi malé množství katalyzátoru.

Příklady uskutečnění vynálezu

Příklad 1

5

Amidace kyseliny hyaluronové propargylaminem

0,5 g kyseliny hyaluronové (kyselá forma) o molekulové hmotnosti $1 \times 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$ a polydisperzitě 1,9 bylo rozpuštěno v 50 ml DMSO při teplotě 60°C . Po rozpuštění se roztok kyseliny hyaluronové nechá ochladit na laboratorní teplotu. Po ochlazení se přidá 0,922 ml triethylaminu (5 eq) a reakční směs se nechá míchat 10 minut. Poté se přidá 0,378 ml ethylchlorformiátu (3 eq) a reakční směs se nechá hodinu míchat. Poté se do reakční směsi přidá 0,125 g (1,36 mmol) hydrochloridu propargylaminu a reakční směs se míchá dalších 24 h při laboratorní teplotě, směs se naředí na celkový objem 200 ml a přelije do dialyzačních střev (cut-off $12 \text{ až } 14 \times 10^3 \text{ g.mol}^{-1}$), kde se dialyzuje 3x po 24 h proti 0,1% roztoku NaCl a NaHCO_3 (celkový objem 10 l) a dále 3x po 24 h proti demi vodě. Dialyzovaný derivát se odpaří do sucha a vysuší pomocí acetonu. Struktura derivátu byla potvrzena NMR analýzou.

Výtěžek reakce: 0,3957 g

Mw derivátu po reakci: $8 \times 10^4 \text{ g.mol}^{-1}$.

20 Stupeň substituce = 44 %.

^1H NMR přiřazené pomocí HSQC (500 MHz, NaOD, δ ppm):

2,01 (s, 3H, 8a), 3,36 (bs, 1H, 2b), 3,46 (bs, 1H, 5a), 3,54 (bs, 1H, 4a), 3,70 (bs, 2H, 3a a 3b), 3,82 (bs, 1H, 4b), 3,90 (bs, 1H, 5b), 3,91 (d, 1H, 1α), 4,10 (d, 1H, 1β), 4,50 (bs, 2H, 1a a 1b)

DOSY NMR:

25 $\log D$ (2,03 ppm $\text{CH}_3\text{-CO-NH-Polymer}$) $\sim -10,5 \text{ m}^2/\text{s}$

$\log D$ (2,7 ppm $\text{-CH}_2\text{NH-R}$) $\sim -10,5 \text{ m}^2/\text{s}$

$\log D$ (3,0 ppm $\text{-CH}_2\text{NH-R}$) $\sim -10,5 \text{ m}^2/\text{s}$

30 Příklad 2

Amidace kyseliny hyaluronové propargylaminem

0,5 g kyseliny hyaluronové (kyselá forma) o molekulové hmotnosti $248 \times 10^3 \text{ g.mol}^{-1}$ a polydisperzitě 1,6 bylo rozpuštěno v 50 ml DMSO při teplotě 60°C . Po rozpuštění se roztok kyseliny hyaluronové nechá ochladit na laboratorní teplotu. Po ochlazení se přidá 0,922 ml triethylaminu (5 eq) a reakční směs se nechá míchat 10 minut. Poté se přidá 0,378 ml ethylchlorformiátu (3 eq) a reakční směs se nechá hodinu míchat. Poté se do reakční směsi přidá 0,125 g (1,36 mmol) hydrochloridu propargylaminu a reakční směs se míchá dalších 24 h při laboratorní teplotě, směs se naředí na celkový objem 200 ml a přelije do dialyzačních střev (cut-off $12 \text{ až } 14 \times 10^3 \text{ g.mol}^{-1}$), kde se dialyzuje 3x po 24 h proti 0,1% roztoku NaCl a NaHCO_3 (celkový objem 10 l) a dále 3x po 24 h proti demi vodě. Dialyzovaný derivát se odpaří do sucha a vysuší pomocí acetonu. Struktura derivátu byla potvrzena NMR analýzou.

Výtěžek reakce: 0,3957 g

45 Mw derivátu po reakci: $12 \times 10^4 \text{ g.mol}^{-1}$.

Stupeň substituce = 98 %.

^1H NMR přiřazené pomocí HSQC (500 MHz, NaOD, δ ppm): viz příklad 1

DOSY NMR: viz příklad 1

Příklad 3

Amidace kyseliny hyaluronové propargylaminem

- 5 0,5 g kyseliny hyaluronové (kyselá forma) o molekulové hmotnosti $366 \times 10^3 \text{ g.mol}^{-1}$ a polydisperzitě 1,6 bylo rozpuštěno v 50 ml DMSO při teplotě 60°C . Po rozpuštění se roztok kyseliny hyaluronové nechá ochladit na laboratorní teplotu. Po ochlazení se přidá 0,922 ml triethylaminu (3 eq) a reakční směs se nechá míchat 10 minut. Poté se přidá 0,378 ml ethylchlorformiátu (3 eq) a reakční směs se nechá hodinu míchat. Poté se do reakční směsi přidá 0,125 g (1,36 mmol) hydrochloridu propargylaminu a reakční směs se míchá dalších 12 h při laboratorní teplotě, směs se naředí na celkový objem 200 ml a přelije do dialyzačních střevek (cut-off 12 až $14 \times 10^3 \text{ g.mol}^{-1}$), kde se dialyzuje 3x po 24 h proti 0,1% roztoku NaCl a NaHCO_3 (celkový objem 10 l) a dále 3x po 24 h proti demi vodě. Dialyzovaný derivát se odpaří do sucha a vysuší pomocí acetonu. Struktura derivátu byla potvrzena NMR analýzou.
- 10
- 15 Výtěžek reakce: 0,3957 g
Mw derivátu po reakci: $177,4 \times 10^3 \text{ g.mol}^{-1}$.
Stupeň substituce = 50 %.
 ^1H NMR přiřazené pomocí HSQC (500 MHz, NaOD, δ ppm): viz příklad 1
DOSY NMR: viz příklad 1

20

Příklad 4

Amidace kyseliny hyaluronové propargylaminem

- 25 0,5 g kyseliny hyaluronové (kyselá forma) o molekulové hmotnosti $393 \times 10^3 \text{ g.mol}^{-1}$ a polydisperzitě 1,6 bylo rozpuštěno v 50 ml DMSO při teplotě 60°C . Po rozpuštění se roztok kyseliny hyaluronové nechá ochladit na laboratorní teplotu. Po ochlazení se přidá 0,922 ml triethylaminu (5 eq) a reakční směs se nechá míchat 10 minut. Poté se přidá 0,378 ml ethylchlorformiátu (3 eq) a reakční směs se nechá hodinu míchat. Poté se do reakční směsi přidá 0,111 g (1,32 mmol) hydrochloridu propargylaminu a reakční směs se míchá dalších 12 h při laboratorní teplotě, směs se naředí na celkový objem 200 ml a přelije do dialyzačních střevek (cut-off 12 až $14 \times 10^3 \text{ g.mol}^{-1}$), kde se dialyzuje 3x po 24 h proti 0,1% roztoku NaCl a NaHCO_3 (celkový objem 10 l) a dále 3x po 24 h proti demi vodě. Dialyzovaný derivát se odpaří do sucha a vysuší pomocí acetonu. Struktura derivátu byla potvrzena NMR analýzou.
- 30
- 35 Výtěžek reakce: 0,4452 g
Mw derivátu po reakci: $24 \times 10^4 \text{ g.mol}^{-1}$.
Stupeň substituce = 60 %.
 ^1H NMR přiřazené pomocí HSQC (500 MHz, NaOD, δ ppm): viz příklad 1
DOSY NMR: viz příklad 1

40

Příklad 5

Amidace kyseliny hyaluronové propargylaminem

- 45 0,5 g kyseliny hyaluronové (kyselá forma) o molekulové hmotnosti $485 \times 10^3 \text{ g.mol}^{-1}$ a polydisperzitě 1,6 bylo rozpuštěno v 50 ml DMSO při teplotě 60°C . Po rozpuštění se roztok kyseliny hyaluronové nechá ochladit na laboratorní teplotu. Po ochlazení se přidá 0,922 ml triethylaminu (5 eq) a reakční směs se nechá míchat 10 minut. Poté se přidá 0,378 ml ethylchlorformiátu (3 eq) a reakční směs se nechá hodinu míchat. Poté se do reakční směsi přidá 0,111 g (1,32 mmol) hydrochloridu propargylaminu a reakční směs se míchá dalších 12 h při laboratorní teplotě, směs se
- 50

naředí na celkový objem 200 ml a přelije do dialyzačních střev (cut-off 12 až 14 x 10³ g.mol⁻¹), kde se dialyzuje 3x po 24 h proti 0,1% roztoku NaCl a NaHCO₃ (celkový objem 10 l) a dále 3x po 24 h proti demi vodě. Dialyzovaný derivát se odpaří do sucha a vysuší pomocí acetonu. Struktura derivátu byla potvrzena NMR analýzou.

5

Výtěžek reakce: 0,4452 g

Mw derivátu po reakci: 133,4 x 10³ g.mol⁻¹.

Stupeň substituce = 88 %.

¹H NMR přiřazené pomocí HSQC (500 MHz, NaOD, δ ppm): viz příklad 1

10 DOSY NMR: viz příklad 1

Příklad 6

15 Amidace kyseliny hyaluronové 3–azidopropylaminem

1,0 g kyseliny hyaluronové (kyselá forma) o molekulové hmotnosti 42 x 10³ g.mol⁻¹ a polydisperzitě 1,6 bylo rozpuštěno v 50 ml DMSO při teplotě 60 °C. Po rozpuštění se roztok kyseliny hyaluronové nechá ochladit na laboratorní teplotu. Po ochlazení se přidá 0,922 ml triethylaminu (3 eq) a reakční směs se nechá míchat 10 minut. Poté se přidá 0,378 ml ethylchlorformiátu (3 eq) a reakční směs se nechá hodinu míchat. Poté se do reakční směsi přidá 0,228 g (2,65 mmol) 3–azidopropylaminu a reakční směs se míchá dalších 12 h při laboratorní teplotě, směs se naředí na celkový objem 200 ml a přelije do dialyzačních střev (cut-off 12 až 14 x 10³ g.mol⁻¹), kde se dialyzuje 3x po 24 h proti 0,1% roztoku NaCl a NaHCO₃ (celkový objem 10 l) a dále 3x po 24 h proti demi vodě. Dialyzovaný derivát se odpaří do sucha a vysuší pomocí acetonu. Struktura derivátu byla potvrzena NMR analýzou.

25 Výtěžek reakce: 0,8001 g

Mw derivátu po reakci: 2 x 10⁴ g.mol⁻¹.

Stupeň substituce = 75 %.

30 ¹H NMR přiřazené pomocí HSQC (500 MHz, NaOD, δ ppm):

1,8 (q, 3H, 2), 2,01 (s, 3H, 8a), 3,19 (bs, 1H), 1α), 3,30 (bs, 1H, 2b), 3,36 (bs, 2H, 3), 3,50 (bs, 3H, 1β, 6a, 5a), 3,57 (bs, 1H, 3b), 3,70 (bs, 4H, 6a, 3b, 4b, 3a), 3,89 (bs, 5H, 6a, 3b, 4b, 3a, 5b), 4,50 (bs, 2H, 1a a 1b)

DOSY NMR:

35 log D (2,03 ppm CH₃–CO–NH–Polymer) ~ -10,5 m²/s

log D (2,7 ppm –CH₂ NH–R) ~ - 10,5 m²/s

log D (3,0 ppm –CH₂NH–R) ~ - 10,5 m²/s

40 Příklad 7

Amidace kyseliny hyaluronové 3–azidopropylaminem

1,0 g kyseliny hyaluronové (kyselá forma) o molekulové hmotnosti 42 x 10³ g.mol⁻¹ a polydisperzitě 1,6 bylo rozpuštěno v 50 ml DMSO při teplotě 60 °C. Po rozpuštění se roztok kyseliny hyaluronové nechá ochladit na laboratorní teplotu. Po ochlazení se přidá 0,922 ml triethylaminu (3 eq) a reakční směs se nechá míchat 10 minut. Poté se přidá 0,378 ml ethylchlorformiátu (4 eq) a reakční směs se nechá hodinu míchat. Poté se do reakční směsi přidá 0,228 g (2,65 mmol) 3–azidopropylaminu a reakční směs se míchá dalších 12 h při laboratorní teplotě, směs se naředí na celkový objem 200 ml a přelije do dialyzačních střev (cut-off 12 až 14 x 10³ g.mol⁻¹), kde se dialyzuje 3x po 24 h proti 0,1% roztoku NaCl a NaHCO₃ (celkový objem 10 l) a dále 3x po 24 h

50

proti demi vodě. Dialyzovaný derivát se odpaří do sucha a vysuší pomocí acetonu. Struktura derivátu byla potvrzena NMR analýzou.

Výtěžek reakce: 0,8067 g

Mw derivátu po reakci: $2 \times 10^4 \text{ g.mol}^{-1}$.

5 Stupeň substituce = 50 %.

^1H NMR přiřazené pomocí HSQC (500 MHz, NaOD, δ ppm): viz příklad 6

DOSY NMR: viz příklad 6

10 Příklad 8

Amidace kyseliny hyaluronové 3-azidopropylaminem

15 1,0 g kyseliny hyaluronové (kyselá forma) o molekulové hmotnosti $42 \times 10^3 \text{ g.mol}^{-1}$ a polydisperzitě 1,6 bylo rozpuštěno v 50 ml DMSO při teplotě 60 °C. Po rozpuštění se roztok kyseliny hyaluronové nechá ochladit na laboratorní teplotu. Po ochlazení se přidá 0,922 ml triethylaminu (3 eq) a reakční směs se nechá míchat 10 minut. Poté se přidá 0,378 ml ethylchlorformiátu (5 eq) a reakční směs se nechá hodinu míchat. Poté se do reakční směsi přidá 0,228 g (2,65 mmol) 3-azidopropylaminu a reakční směs se míchá dalších 12 h při laboratorní teplotě, směs se naředí na celkový objem 200 ml a přelije do dialyzačních střev (cut-off 12 až $14 \times 10^3 \text{ g.mol}^{-1}$), kde se dialyzuje 3x po 24 h proti 0,1% roztoku NaCl a NaHCO_3 (celkový objem 10 l) a dále 3x po 24 h proti demi vodě. Dialyzovaný derivát se odpaří do sucha a vysuší pomocí acetonu. Struktura derivátu byla potvrzena NMR analýzou.

Výtěžek reakce: 0,8067 g

25 Mw derivátu po reakci: $2 \times 10^4 \text{ g.mol}^{-1}$.

Stupeň substituce = 40 %.

^1H NMR přiřazené pomocí HSQC (500 MHz, NaOD, δ ppm): viz příklad 6

DOSY NMR: viz příklad 6

30

Příklad 9

Amidace kyseliny hyaluronové 3-azidopropylaminem

35 1,0 g kyseliny hyaluronové (kyselá forma) o molekulové hmotnosti $72 \times 10^3 \text{ g.mol}^{-1}$ a polydisperzitě 1,7 bylo rozpuštěno v 50 ml DMSO při teplotě 60 °C. Po rozpuštění se roztok kyseliny hyaluronové nechá ochladit na laboratorní teplotu. Po ochlazení se přidá 0,922 ml triethylaminu (3 eq) a reakční směs se nechá míchat 10 minut. Poté se přidá 0,378 ml ethylchlorformiátu (5 eq) a reakční směs se nechá hodinu míchat. Poté se do reakční směsi přidá 0,228 g (2,65 mmol) 3-azidopropylaminu a reakční směs se míchá dalších 24 h při laboratorní teplotě, směs se naředí na celkový objem 200 ml a přelije do dialyzačních střev (cut-off 12 až $14 \times 10^3 \text{ g.mol}^{-1}$), kde se dialyzuje 3x po 24 h proti 0,1% roztoku NaCl a NaHCO_3 (celkový objem 10 l) a dále 3x po 24 h proti demi vodě. Dialyzovaný derivát se odpaří do sucha a vysuší pomocí acetonu. Struktura derivátu byla potvrzena NMR analýzou.

45 Výtěžek reakce: 0,7826 g

Mw derivátu po reakci: $52 \times 10^3 \text{ g.mol}^{-1}$.

Stupeň substituce = 54 %.

^1H NMR přiřazené pomocí HSQC (500 MHz, NaOD, δ ppm): viz příklad 6

DOSY NMR: viz příklad 6

50

Příklad 10

Amidace kyseliny hyaluronové 3–azidopropylaminem

- 5 1,0 g kyseliny hyaluronové (kyselá forma) o molekulové hmotnosti $7 \times 10^4 \text{ g.mol}^{-1}$ a polydisperzitě 1,7 bylo rozpuštěno v 50 ml DMSO při teplotě 60°C . Po rozpuštění se roztok kyseliny hyaluronové nechá ochladit na laboratorní teplotu. Po ochlazení se přidá 0,922 ml triethylaminu (3 eq) a reakční směs se nechá míchat 10 minut. Poté se přidá 0,378 ml ethylchlorformiátu (5 eq) a reakční směs se nechá hodinu míchat. Poté se do reakční směsi přidá 0,228 g (2,65 mmol) 3–
- 10 azidopropylaminu a reakční směs se míchá dalších 24 h při laboratorní teplotě, směs se naředí na celkový objem 200 ml a přelije do dialyzačních střev (cut-off 12 až $14 \times 10^3 \text{ g.mol}^{-1}$), kde se dialyzuje 3x po 24 h proti 0,1% roztoku NaCl a NaHCO_3 (celkový objem 10 l) a dále 3x po 24 h proti demi vodě. Dialyzovaný derivát se odpaří do sucha a vysuší pomocí acetonu. Struktura derivátu byla potvrzena NMR analýzou.
- 15 Výtěžek reakce: 0,7826 g
Mw derivátu po reakci: $35 \times 10^3 \text{ g.mol}^{-1}$.
Stupeň substituce = 60 %.
 ^1H NMR přiřazené pomocí HSQC (500 MHz, NaOD, δ ppm): viz příklad 6
DOSY NMR: viz příklad 6

20

Příklad 11

Amidace kyseliny hyaluronové 3–azidopropylaminem

- 25 1,0 g kyseliny hyaluronové (kyselá forma) o molekulové hmotnosti $393 \times 10^3 \text{ g.mol}^{-1}$ a polydisperzitě 1,7 bylo rozpuštěno v 50 ml DMSO při teplotě 60°C . Po rozpuštění se roztok kyseliny hyaluronové nechá ochladit na laboratorní teplotu. Po ochlazení se přidá 0,922 ml triethylaminu (3 eq) a reakční směs se nechá míchat 10 minut. Poté se přidá 0,378 ml ethylchlorformiátu (3 eq)
- 30 a reakční směs se nechá hodinu míchat. Poté se do reakční směsi přidá 0,228 g (2,65 mmol) 3–azidopropylaminu a reakční směs se míchá dalších 8 h při laboratorní teplotě, směs se naředí na celkový objem 200 ml a přelije do dialyzačních střev (cut-off 12 až $14 \times 10^3 \text{ g.mol}^{-1}$), kde se dialyzuje 3x po 24 h proti 0,1% roztoku NaCl a NaHCO_3 (celkový objem 10 l) a dále 3x po 24 h proti demi vodě. Dialyzovaný derivát se odpaří do sucha a vysuší pomocí acetonu. Struktura derivátu byla potvrzena NMR analýzou.
- 35 Výtěžek reakce: 0,7826 g
Mw derivátu po reakci: $165 \times 10^3 \text{ g.mol}^{-1}$.
Stupeň substituce = 85 %.
 ^1H NMR přiřazené pomocí HSQC (500 MHz, NaOD, δ ppm): viz příklad 6
- 40 DOSY NMR: viz příklad 6

Příklad 12

Amidace kyseliny hyaluronové 3–azidopropylaminem

- 45 1,0 g kyseliny hyaluronové (kyselá forma) o molekulové hmotnosti $485 \times 10^3 \text{ g.mol}^{-1}$ a polydisperzitě 1,7 bylo rozpuštěno v 50 ml DMSO při teplotě 60°C . Po rozpuštění se roztok kyseliny hyaluronové nechá ochladit na laboratorní teplotu. Po ochlazení se přidá 0,922 ml triethylaminu (3 eq) a reakční směs se nechá míchat 10 minut. Poté se přidá 0,378 ml ethylchlorformiátu (3 eq)
- 50 a reakční směs se nechá hodinu míchat. Poté se do reakční směsi přidá 0,228 g (2,65 mmol) 3–azidopropylaminu a reakční směs se míchá dalších 10 h při laboratorní teplotě, směs se naředí na

celkový objem 200 ml a přelije do dialyzačních střev (cut-off 12 až 14 x 10³ g.mol⁻¹), kde se dialyzuje 3x po 24 h proti 0,1% roztoku NaCl a NaHCO₃ (celkový objem 10 l) a dále 3x po 24 h proti demi vodě. Dialyzovaný derivát se odpaří do sucha a vysuší pomocí acetonu. Struktura derivátu byla potvrzena NMR analýzou.

5 Výtěžek reakce: 0,7826 g

Mw derivátu po reakci: 177 x 10³ g.mol⁻¹.

Stupeň substituce = 98 %.

¹H NMR přiřazené pomocí HSQC (500 MHz, NaOD, δ ppm): viz příklad 6

DOSY NMR: viz příklad 6

10

Příklad 13

Amidace kyseliny hyaluronové hexylaminem

15

1,0 g kyseliny hyaluronové (kyselá forma) o molekulové hmotnosti 485 x 10³ g.mol⁻¹ a polydisperzitě 1,7 bylo rozpuštěno v 50 ml DMSO při teplotě 60 °C. Po rozpuštění se roztok kyseliny hyaluronové nechá ochladit na laboratorní teplotu. Po ochlazení se přidá 0,922 ml triethylaminu (5 eq) a reakční směs se nechá míchat 10 minut. Poté se přidá 0,378 ml ethylchlorformiátu (3 eq) a reakční směs se nechá hodinu míchat. Poté se do reakční směsi přidá 0,253 g (2,5 mmol) hexylaminu a reakční směs se míchá dalších 12 h při laboratorní teplotě, směs se naředí na celkový objem 200 ml a přelije do dialyzačních střev (cut-off 12 až 14 x 10³ g.mol⁻¹), kde se dialyzuje 3x po 24 h proti 0,1% roztoku NaCl a NaHCO₃ (celkový objem 10 l) a dále 3x po 24 h proti demi vodě. Dialyzovaný derivát se odpaří do sucha a vysuší pomocí acetonu. Struktura derivátu byla potvrzena NMR analýzou.

25

Výtěžek reakce: 0,7826 g

Mw derivátu po reakci: 2 x 10⁵ g.mol⁻¹

Stupeň substituce = 88 %.

¹H NMR přiřazené pomocí HSQC (500 MHz, NaOD, δ ppm):

30

0,8 (bs, 2H, 6), 1,2 (bs, 2H, 5), 1,45 (bs, 6H, 3, 4 a 5), 1,8 (q, 3H, 8), 2,01 (s, 3H, 8a), 3,19 (bs, 1H, 1α), 3,30 (bs, 1H, 2b), 3,36 (bs, 2H, 3), 3,50 (bs, 3H, 1β,6a,5a), 3,57 (bs, 1H, 3b), 3,70 (bs, 4H, 6a,3b,4b,3a), 3,89 (bs, 5H,6a,3b,4b,3a,5b), 4,50 (bs, 2H, 1a a 1b)

DOSY NMR:

35

log D (2,03 ppm CH₃-CO-NH-Polymer) ~ - 10,5 m²/s

log D (2,7 ppm -CH₂NH-R) ~ - 10,5 m²/s

log D (3,0 ppm -CH₂NH-R) ~ - 10,5 m²/s

Uvedené příklady provedení jsou pouze ilustrativní a nijak neomezují ani nevycherpávají všechny varianty provedení vynálezu.

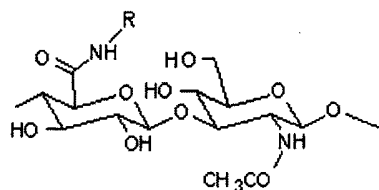
40

PATENTOVÉ NÁROKY

45

1. Způsob přípravy amidových derivátů kyseliny hyaluronové, **vyznačující se tím**, že se nejprve v přítomnosti báze aktivuje skupina COOH kyseliny hyaluronové ethylchlorformiátem za vzniku reaktivního intermediátu, který následně reaguje s primárním aminem R-NH₂ za vzniku amidu kyseliny hyaluronové obecného vzorce I:

50



(I),

5 kde R je alkylový lineární nebo rozvětvený řetězec C_1 až C_{30} , volitelně s obsahem aromatických nebo heteroaromatických skupin, případně R je $CH\equiv C-CH_2-NH_2$ nebo $NH_2-CH_2-CH_2-CH_2-N_3$; přičemž stupeň substituce v rozmezí 10 až 99 % kyseliny hyaluronové je řízen molárním množ-

10 2. Způsob přípravy podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že probíhá v polárním aprotickém prostředí, zejména v dimethylsulfoxidu.

3. Způsob přípravy podle kteréhokoli z nároků 1 a 2, **vyznačující se tím**, že kyselina hyaluronová je v kyselé formě a má střední molekulovou hmotnost v rozmezí 1×10^4 až $5 \times 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$, zejména $3,5 \times 10^5$ až $5 \times 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$.

15 4. Způsob přípravy podle kteréhokoli z nároků 1 až 3, **vyznačující se tím**, že reakce probíhá při teplotě 25°C po dobu 8 až 24 h, s výhodou po dobu 12 h.

20 5. Způsob přípravy podle kteréhokoli z nároků 1 až 4, **vyznačující se tím**, že primární amin se přidá do reakce v čase 0,1 až 2 h po přidavku ethylchlorformiátu.

6. Způsob přípravy podle kteréhokoli z nároků 1 až 5, **vyznačující se tím**, že primární amin se přidá do reakce v molárním množství 3 až 5 ekvivalentů vzhledem k látkovému množství dimeru hyaluronanu.

25 7. Způsob přípravy podle kteréhokoli z nároků 1 až 6, **vyznačující se tím**, že primárním aminem $R-NH_2$ je $CH\equiv C-CH_2-NH_2$, $NH_2-CH_2-CH_2-CH_2-N_3$ nebo $NH_2(CH_2)_5-CH_3$.

30 8. Způsob přípravy podle kteréhokoli z nároků 1 až 7, **vyznačující se tím**, že látkové množství přidaného ethylchlorformiátu je v molárním poměru 3 až 5 ekvivalentů vzhledem k látkovému množství dimeru hyaluronanu.

9. Způsob přípravy podle kteréhokoli z nároků 1 až 8, **vyznačující se tím**, že bázi je trialkylamin, zejména triethylamin.

35 10. Způsob přípravy podle kteréhokoli z nároků 1 až 9, **vyznačující se tím**, že látkové množství přidané báze je v molárním poměru 3 až 5 ekvivalentů vzhledem k látkovému množství dimeru hyaluronanu.

40

Konec dokumentu
