

(19)  
ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: 2017-318  
(22) Přihlášeno: 05.06.2017  
(40) Zveřejněno: 12.12.2018  
(Věstník č. 50/2018)  
(47) Uděleno: 17.08.2023  
(24) Oznámení o udělení ve věstníku: 27.09.2023  
(Věstník č. 39/2023)

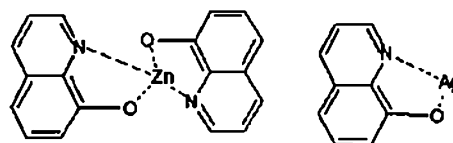
A61K 9/06 (2006.01)  
A61K 9/08 (2006.01)  
A61K 31/47 (2006.01)  
A61K 33/30 (2006.01)  
A61K 33/38 (2006.01)  
A61P 31/04 (2006.01)  
A61P 31/10 (2006.01)

(56) Relevantní dokumenty:  
Festa, Richard A., et al. "Exploiting innate immune cell activation of a copper-dependent antimicrobial agent during infection." Chemistry & biology 21.8 (2014): 977-987; Oliveri, Valentina, and Graziella Vecchio. "8-Hydroxyquinolines in medicinal chemistry: A structural perspective." European journal of medicinal chemistry 120 (2016): 252-274; Weinberg, Eugene D. "The mutual effects of antimicrobial compounds and metallic cations." Bacteriological reviews 21.1 (1957): 46.  
WO 99/61 491 A1 (BLOCK DRUG CO) 1999-12-02; WO 2009/140 215 A2 (XILINAS MICHEL E [CY]; GERAGHTY ERIN [US]) 2009-11-19; CZ 293 419 B6 (USTAV MAKROMOLEKULARNÍ CHEMIE) 2004-04-14; CZ 269 993 A3 (DUMAS BERNARD [FR]) 1989-04-11.

(73) Majitel patentu:  
Pharmacy point s.r.o., Praha 5, Smíchov, CZ

(72) Původce:  
prof. Ing. Ivan Stibor, CSc., Praha 9, CZ  
Ing. Jiří Hájek, Neratovice, CZ  
Ing. Jiří Sobek, Ph.D., Bruntál, CZ

(74) Zástupce:  
Čermák a spol., JUDr. Karel Čermák jr., Ph.D.,  
LL.M., advokát, Elišky Peškové 735/15, 150 00  
Praha 5



(54) Název vynálezu:  
**Antibakteriální a antifungální hydrofilní  
gelová kompozice na bázi zesítěvaného  
kopolymeru 2-hydroxyethylmethakrylátu**

(57) Anotace:  
Hydrofilní gel zahrnující zesítěvaný kopolymer 2-hydroxyethylmethakrylátu, vodu a polyethylenglykol, kde průměrná molární hmotnost polyethylenglykolu je 400 g/mol, přičemž uvedený zesítěvaný kopolymer sestává z 2-hydroxyethylmethakrylátu, ethylenglykoldimethakrylátu a diethylenglykoldimethakrylátu v objemovém poměru 50 : 1 : 1, pro použití jako antibakteriální a antifungální léčivo. Dále gel výhodně obsahuje alespoň jeden antibakteriální a antifungální komplex 8-hydroxychinolinu s ionty Ag<sup>+</sup> nebo Zn<sup>2+</sup> vzorce I nebo II.

## Antibakteriální a antifungální hydrofilní gelová kompozice na bázi zesíťovaného kopolymeru 2-hydroxyethylmethakrylátu

### 5 Oblast techniky

Vynález se týká hydrofilní gelové kompozice na bázi zesíťovaného kopolymeru 2-hydroxyethylmethakrylátu a popřípadě dalších antibakteriálně a antifungálně účinných přísad pro použití jako antibakteriální a antifungální léčivo.

10

### Dosavadní stav techniky

Hrozba infekcí, které jsou způsobeny patogenními bakteriemi, zejména rezistentní patogenní bakterii MRSA (Methicilin Rezistentní *Staphylococcus Aureus*), je v současné době celosvětovým problémem. Ohroženi jsou zejména nemocniční pacienti jednotek intenzivní péče (JIP), lůžkových částí, ale výjimkou nejsou ani další prostory nemocnic. Tato patogenní bakterie se může šířit mnoha různými cestami, vzduchem, vodou, jídlem či kontaktem s kontaminovanými povrchy. Klasické dezinfekční postupy nelze aplikovat komplexně na celé prostory JIP oddělení nebo operačních sálů. Dostupné fyzikální metody (pára, vysoká teplota, ozařování) a chemické metody (chlorované prostředky) jsou buď neúčinné, nebo spolu s nežádoucími bakteriemi ničí i životní prostředí. Protože jsou onemocnění způsobená patogenními bakteriemi, zejména rezistentní patogenní bakterii MRSA, jen velmi obtížně léčitelná, základní podmínkou je to, aby byly ve zdravotnických zařízeních tyto bakteriální kmeny úplně eliminovány. Zesíťované hydrogely na bázi 2-hydroxyethylmethakrylátu jsou známy řadu desetiletí a stály u zrodu vývoje měkkých kontaktních čoček v šedesátých letech minulého století. Dlouhou dobu je také známá řada jejich aplikací v lékařství, ať již samotných nebo ve formě různých kompozic obsahujících inkorporované biologicky účinné látky. U těchto hydrogelů je zejména oceňována jejich dobrá kompatibilita s tělesnými tkáněmi, odolnost proti přechodu přes bariéry, s nimiž mohou být ve styku, dobrá tvarovatelnost a stálost a řada dalších výhodných vlastností.

Z lékařských aplikací stojí za zmínku především CZ patent 293419, týkající se přípravků k hojení a prevenci zánětlivých onemocnění na bázi zesíťovaného hydrogelu 2-hydroxyethylmethakrylátu a dimethakrylátových síťovadel. Tyto hydrogely, uváděné na trh pod označením "Hemagel" ve své struktuře obsahují stericky bráněné aminy fungující jako pohlcovače volných radikálů a tím urychlující hojení ran.

V až dosud známých aplikacích fungují hydrogely na bázi 2-hydroxyethylmethakrylátu víceméně jako nosiče biologicky účinných látek, nejsou však známa žádná data o jejich vlastním antibakteriálním působení. Vyvinutí klinicky využitelných hydrogelů s inherentními antibakteriálními vlastnostmi by představovalo významný příspěvek rozšíření palety vhodných bakteriostatických léčiv.

Antibakteriální účinky komplexů 8-hydroxychinolinu s kovy zinku, mědi, niklu, železa, kobaltu, kadmia, manganu, hořčíku a železa jsou známy již z roku 1953. Tyto účinky byly publikovány v The British Journal of Experimental Pathology v článku Albert A., Gibson M.I., Rubbo D.S., The Influence of Chemical Constitution on Antibacterial Activity Part VI: The bactericidal action of 8-hydroxyquinoline (oxine).

50

O tři roky dříve publikovala stejná skupina autorů článek The Influence of Chemical Constitution on Antibacterial Activity Part V: The bactericidal action of 8-hydroxyquinoline (oxine), kde porovnávali antibakteriální aktivity komplexů 8 hydroxychinolinů různých kovů.

55 Zajímavou prací z roku 2014 je článek Festa A. R., Helsel E. M., Franz J. K. Exploiting Innate

Immune Cell Activation of a Copper-Dependent Antimicrobial Agent during Infection, ve které je prezentován komplex 8-hydroxychinolinu s mědí jako účinné antiikrobiální činidlo a je popsán jeho účinek v makrofágách a jeho interakce s prochelačným činidlem QBD jehož přeměnu inhibuje peroxid vodíku a tím zvyšuje účinnost 8-hydroxychinolinu proti kmenu *Cryptococcus* *neformans*.

Další prací, která je převážně věnována farmakologickým účinkům derivátů 8-hydroxychinolinu a jejich solí mědi a zinku, je článek Prachayasittikul V., Ruchirawat S., Prachayasittikul V., 8-hydroxyquinolines: A review of their metal chelating properties and medicinal applications, Drug Design, Development and Therapy 2013.

Článek V. Oliveri, G. Vecchio, 8-Hydroxyquinolines in medicinal chemistry: A structural perspective, *European Journal of Medicinal Chemistry* (2016), popisuje chelatační aktivitu 8-hydroxychinolinu a jeho derivátů a jejich možný mechanismus účinku v buňce. Je zajímavé, že účinek komplexů 8-hydroxychinolinu s kovy na buňku závisí na jejich stabilitě. Tyto komplexy totiž mohou vstupovat do buňky, kde se dostávají do prostředí o pH, při kterém dochází k jejich disociaci a dodané ionty mohou následně způsobovat řízenou buněčnou smrt. Dalším možným mechanismem je děj, při kterém se dostávají do buňky pouze čisté deriváty hydroxychinolinu, které způsobí chelataci kovových iontů buněčných peptidů, čímž mohou v následku také způsobit apoptózu, tedy buněčnou smrt. Mechanismus působení na buňku není zcela objasněn, ale zásadně platí, že čím je komplex stabilnější, tím má menší účinek na nitrobuněčné procesy. V této práci jsou také popsány karcinogenní a cytotoxické účinky halogenovaných 8-hydroxychinolinů na buňku a z popisu vyplývá, že nejtoxičtější a karcinogenní účinky mají jodované hydroxychinolinové deriváty.

Práce Weinberga D. E. shrnutá v článku Mutual Effects of Antimicrobial Compounds Metallic Cations pojednává o antibiotikách a jejich mechanismech působení na organismus nebo buňku v závislosti na schopnosti chelatace iontů. Mezi popsányými antibiotiky je také zmíněn komplex 8-hydroxychinolinu s různými kovy a je zde diskutována stabilita výsledného chelátu a jeho bakteriální toxicita. Zajímavým zjištěním je, že měďnaté cheláty 8-hydroxychinolinu nejsou příliš toxické, neboť vykazují významnou stabilitu.

Z výše uvedených prací vyplývá, že komplexy zinku a stříbra 8-hydroxychinolinu jsou využívány jako antibakteriální činidla a jejich stabilita je nízká. Nízká stabilita těchto komplexů způsobuje toxicitu pro zdravé buňky, a proto využití těchto antibakteriálních činidel v lékařství je z tohoto pohledu velmi diskutabilní.

#### Podstata vynálezu

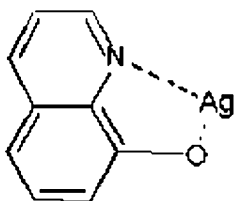
Nyní se s překvapením zjistilo, že výše uvedené nedostatky dosavadního stavu techniky odstraňuje antibakteriální hydrofilní gel na bázi zesíťovaného kopolymeru 2-hydroxyethylmethakrylátu podle vynálezu, který je použitelný buď sám o sobě nebo po případné aditivaci dále uvedenými antibakteriálně a antifungálně účinnými přísadami.

Předmětem vynálezu v hlavním provedení je hydrofilní gel zahrnující zesíťovaný kopolymer 2-hydroxyethylmethakrylátu, vodu a polyethylenglykol, kde průměrná molární hmotnost polyethylenglykolu je 400 g/mol (PEG 400), přičemž uvedený zesíťovaný kopolymer sestává z 2-hydroxyethylmethakrylátu, ethylenglykoldimethakrylátu a diethylenglykoldimethakrylátu v objemovém poměru 50 : 1 : 1, pro použití jako antibakteriální a antifungální léčivo.

V přednostním provedení vykazuje tento hydrofilní gel viskozitu od 20 do 100 Pa.s, s výhodou od 50 do 75 Pa.s, při obvodové rychlosti 6 s<sup>-1</sup>.

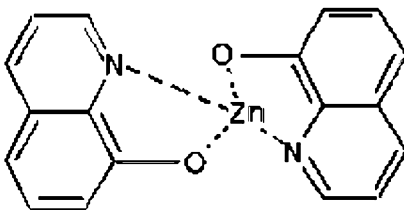
V jiném přednostním provedení tento hydrofilní gel dále obsahuje 0,005 až 10 % hmotnostních,

vztaženo na celý gel, alespoň jednoho komplexu 8-hydroxychinolinu s ionty  $\text{Ag}^+$  vzorce I



(I)

nebo ionty  $\text{Zn}^{2+}$  vzorce II



(II).

Výše definovaný hydrofilní gel (dále označovaný také jako hydrogel nebo hydrogelová kompozice), složený z kopolymeru 2-hydroxyethylmethakrylátu s ethylenglykoldimethakrylátem a diethylenglykoldimethakrylátem v přesném vzájemném poměru ve směsi s polyethylenglykolem s průměrnou molární hmotností 400 g/mol a vodou má inherentní antibakteriální vlastnosti, a to již bez jakýchkoliv dalších přidaných antibakteriálních látek nebo antibiotik. Antibakteriální účinnost tohoto hydrogelu je navíc možno významně zvýšit inkorporací  $\text{Ag}^+$ - a  $\text{Zn}^{2+}$ -komplexů 8-hydroxychinolinu, při níž dochází k rovněž překvapující stabilizaci těchto chelátů. Hydrogely na bázi 2-hydroxyethylmethakrylátu s  $\text{Ag}^+$ - a  $\text{Zn}^{2+}$ -komplexy 8-hydroxychinolinu inkorporovanými do matrice hydrogelu podle vynálezu jsou vhodné pro použití jako antibakteriální a antifungální přípravky, s výrazným synergickým trvalým efektem mezi hydrogelem a jednotlivými komplexy, pokud jde o biologickou aktivitu a stabilitu inkorporovaných komplexů. Jejich předností je vysoká antibakteriální účinnost, převyšující účinnost samotných  $\text{Ag}^+$ - a  $\text{Zn}^{2+}$ -komplexů 8-hydroxychinolinu, v kombinaci s vysokou stálostí a bezpečností při použití v porovnání se samotnými  $\text{Ag}^+$ - a  $\text{Zn}^{2+}$ -komplexy 8-hydroxychinolinu nebo jejich vzájemnými směsmi. Další výhodou uvedeného řešení je výrazné prodloužení stability obou komplexů inkorporovaných do hydrogelu podle vynálezu. Hydrogel tyto komplexy fyzikálně chemickými silami zadržuje ve své struktuře a neumožňuje jejich eluci přímo do rány. To je zvláště důležité při ošetřování spálenin, bércových vředů a špatně se hojících ran, kde samotné antibakteriální komplexy tohoto typu není možné použít, poněvadž by se dostávaly do kůže a přímo do rány a mohly by způsobovat podráždění nebo vyvolávat lokální alergické reakce.

Ve zvláště výhodném provedení má gel podle vynálezu formu hydrofilního gelu na bázi kopolymeru 2-hydroxyethylmethakrylátu (Hema) ethylenglykoldimethakrylátu (EDTA) a diethylenglykoldimethakrylátu (DEDTA) v objemovém zastoupení EDTA: DEDTA: HEMA 1 : 1 : 50 a polyethylenglykolu o průměrné molární hmotnosti 400 g/mol (PEG 400) a vody v takovém poměru, aby výsledný hydrofilní gel vykazoval viskozitu od 50 do 71 Pa. s. při rychlosti  $6 \text{ s}^{-1}$  s přísadou 0,005 až 10 % hmotn., s výhodou 0,1 % hmotn., vztaženo na celý gel, alespoň jednoho  $\text{Ag}^+$ -komplexu 8-hydroxychinolinu a  $\text{Zn}^{2+}$ -komplexu 8-hydroxychinolinu nebo jejich směsi. V této formě vykazují použité komplexy zvláště dobrou stabilitu a zvýšenou účinnost díky

synergii se samotným hydrofilním gelem.

Hydrofilní gel podle vynálezu je možné připravit obecně známými syntézními technikami. Podstatnou složkou je kopolymer na bázi 2-hydroxyethylmethakrylátu, který je připravován tak, že se do vodného roztoku přidá 2-hydroxyethylmethakrylát, a kopolymerační činidla EDTA a DEDTA ve vzájemném poměru 1:1:50. Tato směs je zahřáta na teplotu 50 °C a následně je do této směsi vložen polymerační katalyzátor buď organického nebo anorganického původu. Po 12 hodinách je polymerace přerušena a směs vychlazená. Takto vzniklý kopolymer je promyt a vložen do míchacího zařízení současně s vodou a PEG 400. V tomto zařízení se potom směs míchá do té doby, dokud nedojde k homogenizaci celého gelu.

$\text{Ag}^+$  a  $\text{Zn}^{2+}$ -komplexy 8-hydroxychinolinu výše uvedených vzorců se připravují známým způsobem z výchozí vodorozpustné stříbrné nebo zinečnaté soli, jako dusičnanu stříbrného nebo chloridu zinečnatého a 8-hydroxychinolinu. Může se například postupovat tak, že se rozpustí potřebné množství 8-hydroxychinolinu ve vodě a ke vzniklému roztoku se přidá stechiometrické množství dusičnanu stříbrného (pro přípravu  $\text{Ag}^+$  hydroxychinolátu), nebo chloridu zinečnatého (pro přípravu  $\text{Zn}^{2+}$  hydroxychinolátu). Vzniklý roztok se dále míchá po dobu 12 hodin, odpaří se na poloviční množství a ochladí. Ochlazením vznikne komplex 8-hydroxychinolátu  $\text{Ag}^+$  nebo  $\text{Zn}^{2+}$  ve formě sraženiny, která se izoluje filtrací. Takto vzniklé komplexy se dále přímo použijí ve vzájemné směsi nebo samostatně ve formě pravých či koloidních roztoků nebo disperzí pro inkorporaci do hydrogelu podle vynálezu. Komplexy se přidávají v takových množstvích, aby jejich obsah ve výsledném gelu byl v rozmezí 0,005 % až 10 % (hmotnostních).

Inkorporace komplexů do gelu se může provést na koloidním mlýnu s chlazeným výstupem tak, že se hydrofilní gel podle vynálezu vloží do koloidního mlýnu a za současného mletí se do něj přidá odvážené množství komplexů. Proces mletí polymeru podle vynálezu s komplexy probíhá tak dlouho, dokud není inkorporace komplexů do hydrogelu kompletní. Proces inkorporace je kontrolován pomocí UV světla pod mikroskopem tak, že se kontrolují nehomogenní zvýrazněné shluky komplexů v polymeru. Jakmile se tyto shluky v hydrogelu nevyskytují a hydrogel vykazuje homogenní strukturu, je inkorporace ukončena.

Použití hydrofilního gelu podle vynálezu je mnohostranné. Tak například je možné hydrofilní gel využít jako nosič různých účinných látek organického a anorganického charakteru. Dále je možné hydrofilní gel použít samostatně pro urychlení léčby otevřených nekolonizovaných ran. Hydrofilní gel totiž podporuje efekt mokrého hojení ran, což má za následek výraznou redukci jizev a zkrácení doby hojení. Inkorporací  $\text{Ag}^+$  nebo  $\text{Zn}^{2+}$  komplexů se použití hydrofilního gelu značně rozšiřuje, neboť je ho možné využít ve zdravotnictví nebo veterinární péči pro hojení kolonizovaných ran, špatně hojících se ran, bércových vředů a popálenin.

40

#### Příklady uskutečnění vynálezu

##### Příklad 1

45 Příprava neaditivované hydrogelové kompozice podle vynálezu – "kompozice PV"

Hydrogel byl podle vynálezu syntetizován tak, že se do nádoby vložilo 50 objemových dílů monomerního HEMA ve vodném roztoku o koncentraci 20 % a k němu byly přidány komonomery v odpovídajících objemových poměrech, tj. HEMA : EGDMA : DEGDMA v objemovém poměru 50 : 1 : 1, podle tabulky níže. Směs byla zahřáta za stálého míchání na teplotu 50 °C a k této směsi byl přidán persíran sodný, jako iniciátor polymerace. Teplota směsi byla udržována za stálého míchání na teplotě 50 až 55 °C po dobu 12 hodin. Po proběhnutí polymerace byl polymer vložen do roztoku PEG 400 a rozmíchán a k takto vzniklé směsi byla přidána voda do požadované viskozity 75 Pa.s. při obvodové rychlosti 6 s<sup>-1</sup> při 25°C. Viskozita byla sledována pomocí reometru a byla stanovována na sestavě destička proti destičce. Takto

vzniklá hydrofilní gelová kompozice podle vynálezu byla označena pro jako "kompozice PV".

#### Příklad 1a – srovnávací

- 5 Pro srovnání byly analogickým způsobem připraveny i jiné kompozice (A až G) s hydrogely s odlišným složením HEMA, EGDMA a DEGDMA monomerů, než je složení podle vynálezu. Voda a PEG 400 byly do hydrogelů přidávány tak, aby výsledná viskozita všech hydrogelů byla stejná.
- 10 Připravené kompozice a objemový poměr výchozích monomerů pro přípravu hydrogelu jsou uvedeny v následující tabulce:

| Označení kompozice | Složení hydrogelu (objemový poměr) |       |        |
|--------------------|------------------------------------|-------|--------|
|                    | HEMA                               | EGDMA | DEGDMA |
| PV                 | 50                                 | 1     | 1      |
| A                  | 50                                 | 0     | 0      |
| B                  | 50                                 | 1     | 0      |
| C                  | 50                                 | 0     | 1      |
| D                  | 50                                 | 0,5   | 0,5    |
| E                  | 50                                 | 2     | 2      |
| F                  | 50                                 | 0,5   | 1      |
| G                  | 50                                 | 1     | 0,5    |

#### Příklad 2

- 15 Příprava hydrogelové kompozice podle vynálezu na bázi hydrogelu s objemovým poměrem HEMA : EGDMA : DEGDMA 50 : 1 : 1 s obsahem  $\text{Ag}^+$ -komplexu 8-hydroxychinolinu „přípravek 1“:
- 20 Do ocelové nádoby míšicího přístroje se odváží 4 kg gelu, který je složen z 30 % kopolymeru (složeného z HEMA : EGDMA : DEGDMA = 50 : 1 : 1), 50 % PEG 400 a 20 % vody. Mezitím se odváží 4 g  $\text{Ag}^+$ -komplexu 8-hydroxychinolinu, který se přidá jako suspenze s PEG 400 a míchá po dobu 4 hodin. Vzniklý gel se vyjme z míšacího přístroje a adjustuje. Takto připravený gel s obsahem stříbrného komplexu je produkt, který je označen jako „přípravek 1“.

25

#### Příklad 3

- Příprava hydrogelové kompozice podle vynálezu na bázi hydrogelu s objemovým poměrem HEMA : EGDMA : DEGDMA 50 : 1 : 1 s obsahem  $\text{Ag}^+$ -komplexu 8-hydroxychinolinu a  $\text{Zn}^{2+}$ -komplexu 8-hydroxychinolinu – „přípravek 2“:

30

- Do ocelové nádoby míšicího přístroje se odváží 4 kg gelu, který je složen z 30 % kopolymeru o složení podle příkladu 2, 50 % PEG 400 a 20 % vody. Mezitím se odváží 4 g  $\text{Ag}$ -komplexu 8-hydroxychinolinu a 4 gramy  $\text{Zn}$ -komplexu 8-hydroxychinolinu, které se přidají jako suspenze s PEG 400 do gelu a směs se míchá po dobu 4 hodin. Vzniklý gel se vyjme z míšacího přístroje a adjustuje. Takto připravený gel s obsahem  $\text{Ag}^+$ - a  $\text{Zn}^{2+}$ - komplexů je produkt, který je označen jako „přípravek 2“.

35

#### Příklad 4

40

- Příprava hydrogelové kompozice podle vynálezu na bázi hydrogelu s objemovým poměrem HEMA : EGDMA : DEGDMA 50 : 1 : 1 s obsahem  $\text{Zn}^{2+}$ -komplexu 8-hydroxychinolinu –

„přípravek 3“:

Do ocelové nádoby míšicího přístroje se odváží 4 kg gelu, který se skládá z 30 % kopolymeru o složení podle příkladu 2, 50 % PEG 400 a 20 % vody. Mezitím se odváží 4 g Zn-komplexu 8-hydroxychinolinu, který se přidá jako suspenze s PEG 400 do gelu a směs se míchá po dobu 4 hodin. Vzniklý gel se vyjme z míšacího přístroje a adjustuje. Takto připravený gel s obsahem Zn komplexu je produkt, který je níže označen jako „přípravek 3“.

Testování antibakteriálních vlastností:

a) Stanovení minimálních inhibičních koncentrací ve zkumavkovém provedení (dle Urbáškové)

Standardní ředění roztoků bylo prováděno takto:

0,2 g „přípravku 1,2,3“, 0,5 g syntaponu (lineární alkylbenzensulfonan sodný a laurylsulfát sodný, směs 1:1) a 5 ml glycerolu se přidá do 100 ml vody, za vzniku suspenze s koncentrací 0,2 % účinné látky.

Následujícím ředěním vodou byly připraveny suspenze s koncentrací 0,1 %; 0,05 %; 0,025 %; 0,005 %; a 0,0033 % účinné látky.

Stejně ředění probíhalo i u porovnávacích testů antibakteriálních vlastností vybraných sloučenin (dusičnan stříbrný, 8-hydroxychinolin).

Testování bylo provedeno vždy duplicitně na 8 bakteriálních kmenech uvedených v tabulkách. (+ = normální růst mikroorganismu, – = zábrana růstu)

Z přípravku 1, 2, 3 a 4 byly připraveny naředěné suspenze a jejich výsledky testování zachycují tabulky níže.

Z antibakteriálních látek byly připraveny roztoky; pro porovnání byl vybrán roztok s koncentrací 0,1 % antibakteriální látky. Výsledky jsou shrnuty v tabulkách níže. V tabulkách značí "-" účinnost a "+" absenci účinnosti.

Porovnání antibakteriálních vlastností neaditivovaných hydrogelových kompozic probíhalo tak, že se kompozice nanese na sklíčko a kolonizovala bakteriálními kmeny uvedenými v tabulce. Po 24 hodinách se vyhodnotil růst kolonií (- znamená zábranu růstu, + normální růst mikroorganismu)

| Kompozice | <i>Escherichia coli</i> | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
|-----------|-------------------------|-------------------------------|
| PV        | -                       | -                             |
| A         | +                       | +                             |
| B         | +                       | +                             |
| C         | +                       | +                             |
| D         | +                       | +                             |
| E         | +                       | +                             |
| F         | +                       | +                             |
| G         | +                       | +                             |

Při testování antibakteriálních vlastností bylo prokázáno, že hydrogelová kompozice podle

vynálezu má, na rozdíl od srovnávacích kompozic, sama o sobě antibakteriální účinky. Mechanismus tohoto účinku nebyl objasněn a v současné době jde o zcela nový, nepublikovaný výsledek.

- 5 Dále byl pomocí antibakteriálních testů prověřován účinek samotné směsi  $\text{Ag}^+$  a  $\text{Zn}^{2+}$  komplexů 8-hydroxychinolinu v porovnání s aditivovanými přípravky 1 až 3.

#### Přípravek 1

| Bakteriální kmen / koncentrace | 0,1 | 0,05 | 0,025 | 0,005 | 0,0033 |
|--------------------------------|-----|------|-------|-------|--------|
| <i>Staphylococcus pyogenes</i> | -   | -    | +     | +     | +      |
| <i>Streptococcus pyogenes</i>  | -   | -    | +     | +     | +      |
| <i>Enterobacter cloacae</i>    | -   | -    | +     | +     | +      |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i>  | -   | -    | -     | +     | +      |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i>   | -   | -    | -     | -     | +      |
| <i>Escherichia coli</i>        | -   | -    | -     | +     | +      |
| <i>Proteus mirabilis</i>       | -   | -    | +     | +     | +      |
| <i>Proteus rettgeri</i>        | -   | -    | +     | +     | +      |

10

#### Přípravek 2

| Bakteriální kmen / koncentrace | 0,1 | 0,05 | 0,025 | 0,005 | 0,0033 |
|--------------------------------|-----|------|-------|-------|--------|
| <i>Staphylococcus pyogenes</i> | -   | -    | -     | +     | +      |
| <i>Streptococcus pyogenes</i>  | -   | -    | -     | +     | +      |
| <i>Enterobacter cloacae</i>    | -   | -    | -     | -     | +      |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i>  | -   | -    | -     | -     | -      |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i>   | -   | -    | -     | -     | +      |
| <i>Escherichia coli</i>        | -   | -    | -     | -     | +      |
| <i>Proteus mirabilis</i>       | -   | -    | -     | +     | +      |
| <i>Proteus rettgeri</i>        | -   | -    | -     | -     | +      |

#### Přípravek 3

15

| Bakteriální kmen / koncentrace | 0,1 | 0,05 | 0,025 | 0,005 | 0,0033 |
|--------------------------------|-----|------|-------|-------|--------|
| <i>Staphylococcus pyogenes</i> | -   | +    | +     | +     | +      |
| <i>Streptococcus pyogenes</i>  | -   | +    | +     | +     | +      |
| <i>Enterobacter cloacae</i>    | -   | -    | -     | -     | +      |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i>  | -   | +    | +     | +     | +      |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i>   | -   | -    | -     | -     | +      |
| <i>Escherichia coli</i>        | -   | +    | +     | +     | +      |
| <i>Proteus mirabilis</i>       | -   | -    | -     | +     | +      |
| <i>Proteus rettgeri</i>        | -   | -    | -     | +     | +      |

Směs  $\text{Ag}^-$  a  $\text{Zn}^-$  komplexů 8-hydroxychinolinu v roztoku polyethylenglykolu a vody

| Bakteriální kmen / koncentrace | 0,1 | 0,05 | 0,025 | 0,005 | 0,0033 |
|--------------------------------|-----|------|-------|-------|--------|
| <i>Staphylococcus pyogenes</i> | +   | +    | +     | +     | +      |
| <i>Streptococcus pyogenes</i>  | +   | +    | +     | +     | +      |
| <i>Enterobacter cloacae</i>    | -   | +    | +     | +     | +      |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i>  | -   | +    | +     | +     | +      |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i>   | -   | +    | +     | +     | +      |
| <i>Escherichia coli</i>        | -   | +    | +     | +     | +      |
| <i>Proteus mirabilis</i>       | -   | +    | +     | +     | +      |
| <i>Proteus rettgeri</i>        | -   | +    | +     | +     | +      |

5 Z porovnání přípravků 1 až 3 a směsi Ag- a Zn- komplexů 8-hydroxychinolinu v roztoku polyethylenglykolu a vody je patrné, že synergický efekt hydrogelu a Ag- a Zn- komplexů 8-hydroxychinolinu způsobuje mnohem vyšší antibakteriální efekt v porovnání se směsí samotných komplexů. Z testů jednoznačně vyplývá, že kompozice hydrogelu podle vynálezu, s příměsí Ag- a Zn- komplexů 8-hydroxychinolinu ve své struktuře silně zvyšuje antibakteriální efekt.

10 Antibakteriální vlastnosti připravených roztoků byly testovány na bakteriálních kmenech MRSA (Methicilin Rezistentní *Staphylococcus Aureus* ATCC 33591, ATCC 33592) a dále i na bakteriálních kmenech *Escherichia Coli* (ATCC 9637), *Staphylococcus Aureus* (ATCC 1260), *Acinetobacter baumannii* (ATCC 17978), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 31480), *Proteus vulgaris* (ATCC 29905) a *Proteus mirabilis* (ATCC 35659).

15 Z předem připraveného bakteriálního inokula ve fyziologickém roztoku o koncentraci  $10^8$  CFU/ml bakteriální suspenze byla ředěním fyziologickým roztokem připravena koncentrace  $10^5$  CFU/ml bakteriální suspenze. Poté bylo 250  $\mu$ l této bakteriální suspenze nakápnuto na vzorek. Testované vzorky s nanesenou bakteriální suspenzí byly poté ozařovány pod zářivkou Philips special (Actinic BL F15T8, oblast záření UV-A, rozsah 315 až 400 nm). Vzorky bakteriálních kultur byly ve stanovených časových intervalech vyočkovávány na Petriho misky s krevním agarem. Misky s vyočkovávanými bakteriálními kulturami byly inkubovány v termostatu při teplotě 37,5 °C po dobu 24 hodin.

#### 25 Příklad 5

##### Test stability Ag- a Zn- komplexů

30 Testy stability byly provedeny tak, že byl připraven 0,2% roztok Ag- a Zn- komplexu 8-hydroxychinolinu v PEG 400 a vodě (voda/PEG 400 = 3:7). Polovina roztoku byla odebrána a druhá polovina byla přimíchávána ke kopolymeru o složení podle vynálezu (s objemovým poměrem HEMA : EGDMA : DEGDMA 50 : 1 : 1). Testy stability probíhaly tak, že se připravený roztok nechal po dobu 12 hodin na UV světle o stejné intenzitě a v závislosti na čase byl sledován přírůstek kovového stříbra jak v roztoku, tak v polymeru. Přírůstek nanočástic stříbra byl sledován pomocí SEM/EDX obrazovou a skenovací analýzou.

| čas<br>(hod) | Přírůstek kovového stříbra<br>% hmotn. |     |
|--------------|----------------------------------------|-----|
|              | Roztok                                 | Gel |
| 0            | 0                                      | 0   |
| 2            | 1                                      | 0,1 |
| 4            | 2                                      | 0,3 |
| 6            | 4,5                                    | 0,5 |
| 8            | 6                                      | 0,8 |
| 10           | 7,5                                    | 1   |
| 12           | 9,4                                    | 1,1 |

- 5 Přírůstek kovového stříbra byl vyhodnocen tak, že se hmotnost kovového stříbra vztáhla na hmotnost stříbra vázaného. Z experimentů vyplývá, že stabilita komplexů 8-hydroxychinolinů je v polymeru mnohem vyšší, a proto je kompozice na bázi takto aditivovaného polymeru vhodná pro použití v medicíně. Stabilita těchto komplexů a v gelech nebyla až dosud podle dosavadního stavu techniky zkoumána a jedná se o zcela nový výsledek.

#### 10 Příklad 6

Pro porovnání stabilizace byly postupem podle příkladu 5 provedeny obdobné testy za použití polymerů z kompozice PV a srovnávacích kompozic A až G z příkladu 1 a 1a. Výsledky jsou uvedeny v následující tabulce:

- 15 Stabilita komplexů v polymerech kompozic PV a A až G

|              | Přírůstek kovového stříbra v rel. % |     |     |     |     |     |     |     |
|--------------|-------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| čas<br>(hod) | PV                                  | A   | B   | C   | D   | E   | F   | G   |
| 0            | 0                                   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   |
| 2            | 0,1                                 | 1,1 | 1   | 0,9 | 0,6 | 0,4 | 0,8 | 0,9 |
| 4            | 0,3                                 | 1,9 | 2,1 | 1,8 | 1,4 | 0,9 | 1,7 | 1,8 |
| 6            | 0,5                                 | 4,1 | 4,2 | 4,3 | 3,8 | 1,5 | 3,7 | 3,6 |
| 8            | 0,8                                 | 6,2 | 6,1 | 6,2 | 5,4 | 2,7 | 5,9 | 6,1 |
| 10           | 1                                   | 7,6 | 7,7 | 7,3 | 6,8 | 3,8 | 6,9 | 7,3 |
| 12           | 1,1                                 | 9,3 | 9,2 | 9   | 8,2 | 4,2 | 8,5 | 8,9 |

- 20 Z tabulky vyplývá, že nejvyšší stabilitu Ag- a Zn-komplexů lze dosáhnout jejich inkorporací do polymeru kompozice PV podle vynálezu.

#### Antifungální testy

Testované kmeny:

- 25 CA-*candida albicans*, sbírkový kmen: AtCC 44859  
 TA-*Trichosporon Asahii*, sbírkový kmen: 1188  
 TM-*trichophyton mentagrophytes*, sbírkový kmen: 445

## Metodika

## Chemikálie:

- 5 RPMI 1640-medium pro kultivaci složené z aminokyselin, vitamínů a cukrů (<http://www.sigmaaldrich.com/life-science/cell-culture/learning-center/media-formulations/rpmi-1640.html>), MOPS [3-(*N*-morfolino)propansulfonová kyselina], glukóza, DMSO (dimethylsulfoxid), NaOH a sterilní voda. Všechny chemikálie jsou dodávány firmou Sigma-Aldrich, Praha; vyjma NaOH (dr. Kulich Pharma, s.r.o., Hradec Králové) a sterilní vody, která se
- 10 připravuje autoklávováním deionizované vody.

## Příprava růstového media:

- 15 Nejprve byl k 4 dílům MOPS s 2 % glukózy přidán 1 díl RPMI 1640 (např. 80 ml MOPS + 20 ml RPMI podle celkové spotřeby, protože celkový objem připravovaného růstového média vychází z předpokládané spotřeby, resp. z počtu testovaných kmenů). Dále se upravilo pH do rozmezí 6,5 – 7,9 přidáním 10M roztoku NaOH, aby původně žlutý roztok změnil barvu na oranžovo-červenou.

- 20 Příprava řady testované látky:

Nejprve byla odvážena navážka všech testovaných látek a následně byla rozpuštěna v destilované vodě. Z takto připraveného roztoku byly připraveny roztoky o nižších koncentracích v řadě od 1 do 150 mikrogramů na ml s rozdílem koncentrací 5 mikrogramů mezi dvěma po sobě jdoucími

25 roztoky.

## Provedení testů

- 30 Pomocí mikropipety byly odpipetovány roztoky kmenů do označených testovacích destiček, ke kterým byly přidány naředěné roztoky testovaných látek o různých koncentracích. Následně byla každá mikrotitrační destička přikryta víčkem a inkubována v termostatu při 35 °C po dobu 24 hodin.

- 35 Po uplynutí inkubační doby byl vizuálně hodnocen nárůst ve všech jamkách. V první jamce, ve které již nebyl viditelný růst kvasinky či vláknité houby, byla odečtena hodnota minimální inhibiční koncentrace (MIC) (čím nižší číslo, tím je látka účinnější).

| Kmen  |                   | Testované látky |                   |                    |                  |             |             |             |
|-------|-------------------|-----------------|-------------------|--------------------|------------------|-------------|-------------|-------------|
| Houba | Doba inkubace (h) | ZnO             | AgNO <sub>3</sub> | 8-hydroxy-chinolin | Zn- a Ag-komplex | Přípravek 1 | Přípravek 2 | Přípravek 3 |
| CA    | 24                | 120             | 35                | 75                 | 10               | 5           | 2           | 3           |
| TA    | 24                | 135             | 35                | 75                 | 10               | 5           | 2           | 3           |
| TM    | 24                | 135             | 35                | 75                 | 10               | 5           | 2           | 3           |

- 40 CA-*Candida albicans*, sbírkový kmen: AtCC 44859  
 TA-*Trichosporon Asahii*, sbírkový kmen: 1188  
 TM-*Trichophyton mentagrophytes*, sbírkový kmen: 445

Průmyslová využitelnost

- 45 Antibakteriální a antifungální hydrogelová kompozice podle vynálezu je vhodná pro lékařské

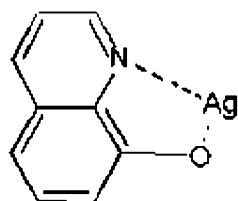
účely a bude používána hlavně jako přípravek pro hojení akutních a chronických ran v humánním lékařství nebo veterinární péči.

## PATENTOVÉ NÁROKY

1. Hydrofilní gel zahrnující zesíťovaný kopolymer 2-hydroxyethylmethakrylátu, vodu a polyethylenglykol, kde průměrná molární hmotnost polyethylenglykolu je 400 g/mol, přičemž uvedený zesíťovaný kopolymer sestává z 2-hydroxyethyl-methakrylátu, ethylenglykoldimethakrylátu a diethylenglykoldimethakrylátu v objemovém poměru 50 : 1 : 1, pro použití jako antibakteriální a antifungální léčivo.

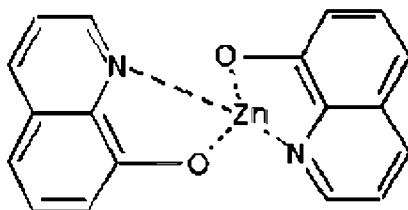
2. Hydrofilní gel pro použití podle nároku 1, který vykazuje viskozitu od 20 do 100 Pa.s, s výhodou od 50 do 75 Pa.s, při obvodové rychlosti  $6 \text{ s}^{-1}$ .

3. Hydrofilní gel pro použití podle nároku 1 nebo 2, který dále obsahuje 0,005 až 10 % hmotnostních, vztaženo na celý gel, alespoň jednoho komplexu 8-hydroxychinolinu s ionty  $\text{Ag}^+$  vzorce I



(I)

nebo ionty  $\text{Zn}^{2+}$  vzorce II



(II)