

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(21) Číslo dokumentu:

2018-426

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.:

C08B 37/08 (2006.01)
A61K 47/36 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01)
A61P 31/10 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **23.08.2018**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **16.10.2019**
(Věstník č. 42/2019)

(71) Přihlašovatel:
Contipro a.s., Dolní Dobrouč, CZ

(72) Původce:
Radovan Buffa, Humenné, SK
Ivana Basarabová, Medzilaborce, SK
Martina Hermannová, Žamberk, CZ
Kateřina Knotková, Choceň, CZ
Jaromír Kulhánek, Pardubice, Bílé Předměstí, CZ
Josef Chmelař, Ústí nad Orlicí, Hylváty, CZ
Tomáš Pitucha, Chrudim, Chrudim I, CZ
Drahomíra Chládková, Lukavice, CZ
Helena Krejčí, Svitavy, Předměstí, CZ
Hana Vágnerová, Dolní Čermná, CZ
Martin Sojka, Holice na Ostrove, SK
Luboš Sobotka, Hradec Králové, Malšovice, CZ
Vladimír Velebný, Žamberk, CZ

(74) Zástupce:
Kania, Sedlák, Smola, Ing. Lucie Lunzarová,
Mendlovo náměstí 907/1a, 603 00 Brno, Staré Brno

(54) Název přihlášky vynálezu:
**Chlorovaný derivát kyseliny hyaluronové,
způsob jeho přípravy, kompozice, která jej
obsahuje, a použití**

(57) Anotace:
Vynález se týká přípravy a použití různých forem obsahujících derivát kyseliny hyaluronové - chloramid hyalurononanu, ve kterém je většina atomů vodíků amidické skupiny -NH-CO- nahrazena za atomy chloru -NCl-CO-. Kompozice obsahující chloramid hyaluronanu vykazují širokospektrální antimikrobiální a antivirovou aktivitu a díky své biokompatibilitě jsou vhodné pro aplikace v oblasti krytů ran nebo na přípravu široké škály implantabilních zdravotnických prostředků.

Chlorovaný derivát kyseliny hyaluronové, způsob jeho přípravy, kompozice, která jej obsahuje, a použití

5 Oblast techniky

Vynález se týká derivátu kyseliny hyaluronové, ve kterém je většina atomů vodíků amidické skupiny $-NH-CO-$ nahrazena za atomy chloru $-NCl-CO-$. Takto modifikovaný polymer - chloramid hyaluronanu vykazuje zvýšenou reaktivitu v oxidačních i redukčních reakcích.

10

Dále se vynález týká způsobu přípravy chloramidu hyaluronanu, kde je chemická modifikace uskutečněna ve vodném prostředí pomocí trichlorisokyanurové kyseliny nebo pomocí solí kyseliny dichlorisokyanurové. Příprava finálních kompozic dále zahrnuje tvorbu forem s obsahem chloramidu hyaluronanu. Pod pojmem „forma“ se rozumí typy materiálů jako například

15

tenký film, lyofilizát, vrstva ze staplových vláken, nekonečné vlákno, tkanina, splétaná textilie nebo nanovláknenná vrstva.

Dále se vynález týká finálních kompozic s obsahem chloramidu hyaluronanu a jejich použití v oblastech, kde jsou vyžadovány následující vlastnosti, nebo jejich libovolné kombinace:

20

- oxidační nebo redukční nebo antimikrobiální nebo antifungální nebo antivirální aktivita
- biokompatibilita a biodegradovatelnost
- možnost přípravy různých forem s vyhovující stabilitou
- možnost regulace rychlosti biodegradace
- 25 - možnost regulace rychlosti oxidačních nebo redukčních reakcí
- významná podpora procesu hojení

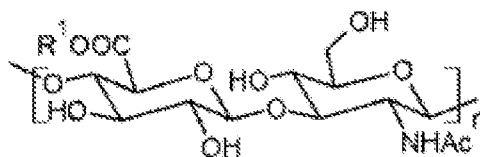
Dosavadní stav techniky

30

Kyselina hyaluronová

Kyselina hyaluronová nebo její sodná sůl je nesulfatovaný glykosaminoglykan, který je složený ze dvou opakujících se jednotek D-glukuronové kyseliny a *N*-acetyl-D-glukosaminu.

35



kde

40

R^1 je vodík nebo sodík.

Molekulová hmotnost nativní kyseliny hyaluronové se pohybuje v rozsahu $5 \cdot 10^4$ až $5 \cdot 10^6$ g.mol⁻¹. Tento hydrofilní polysacharid hraje významnou roli v řadě biologických procesů jako je organizace proteoglykanů, hydratace a diferenciacie buněk a tvoří významnou součást kůže, synoviální tekutiny kloubů a pojivových tkání. Tento polymer se v biologických systémech přirozeně vyskytuje, tudíž je možné ho charakterizovat jako biodegradovatelný a biokompatibilní. Proto je vhodným substrátem pro oblast nosičů biologicky aktivních látek v široké škále biomedicinských aplikací.

45

50

Chemické modifikace kyseliny hyaluronové a její formy

Je známo mnoho způsobů, jak chemicky modifikovat kyselinu hyaluronovou za účelem změny jejích fyzikálních a biologických vlastností (Burdick J. A. a Prestwich G. D. *Adv. Mater.* 23, 41-56, 2011). V případě, že je pro určitou aplikaci žádaná zásadní změna v rozpustnosti, nejčastější řešením je kovalentní navázání hydrofobního řetězce formou biodegradovatelné esterové vazby na strukturu polymeru (Kettou S. a kol. PV 2009-399, Buffa R. a kol. WO2010105582). Z takto modifikovaných materiálů lze pak vytvářet různé formy, jako jsou například vlákna (Ščudlová J. a kol. EP2925916 A1), pleteniny a splétané textilie (Pitucha T. a kol., CZ 306354), samonosné filmy (Foglarová M. a kol. PV2015-166; Foglarová M. a kol. *Carbohydrate Polymers*, 144, 68-75, 2016) nebo vrstvy z nanovláken (Růžicková J. a kol. PV2013-913). Další možností jsou netkané textilie tvořené spojením staplových mikrovláken, která jsou připravována metodou mokrého zvláknování v nestacionární koagulační lázni (Zápotocký V. a kol. *International Journal of Biological Macromolecules*, 95, 903-909, 2017).

Oxidace s trichlorisokyanurovou kyselinou nebo s dichlorisokyanurátem sodným

Trichlorisokyanurová kyselina (TCC) se často používá na N-chloraci strukturně jednodušších amidů na N-chloramidy (Hiegel G. A. a kol. *Synthetic Communications*, 35, 2099-2105, 2005) většinou v nevodných rozpouštědlech. V přítomnosti vody je zase TCC často zmiňována v kombinaci se stabilními radikály typu piperidinyloxy (TEMPO) na selektivní oxidaci primárních hydroxylových skupin. Pro kyselinu hyaluronovou bylo například použití TCC s TEMPO ve vodě popsáno v patentu (Buffa R. a kol. WO2011069475A3), kde nebyla pozorována tvorba žádných chloramidů, ale jenom oxidace primární hydroxylové skupiny na aldehyd a karboxylovou kyselinu. Takže v případě substrátů obsahujících velké množství sekundárních i primárních alkoholů (polysacharidy) se při použití TCC a jeho analogů dají očekávat reakce na hydroxylových skupinách. Monosodná sůl TCC známá jako dichlorisokyanurát sodný (DCC-Na) je méně reaktivní analog TCC, který je ale lépe rozpustný ve vodě. Bylo popsáno použití DCC-Na na oxidaci několika aminů a amidů, které ale neobsahují hydroxylové skupiny (Sun X. a kol., *Ind. Eng. Chem. Res.*, 49, 22, 2010). Výsledné chloraminy byly pak polymerizovány a finální substráty byly úspěšně testovány jako antibakteriální, antifungální a antivirální substance ve formě latexové emulze (Cao Z. a kol. *App. Mat. Inter.* 1, 2, 494-504, 2009).

Z těchto výstupů lze usoudit, že použití TCC nebo jeho analogů na selektivní přípravu N-chlorovaného amidu hyaluronanu ve vodě není očekávatelné z důvodů předpokládané reakce s hydroxy skupinami hyaluronanu.

Oxidace polysacharidů s chlornanem nebo kyselinou chlornou.

Kyselina chlorná nebo její soli se často používají na oxidaci hydroxylových skupin polysacharidů zejména v kombinaci s radikály typu piperidinyloxy (TEMPO) (Bragd P. a kol. WO2002/48197, Buffa R. a kol., WO2011/069475A3). Obecně lze konstatovat, že v případě polysacharidů obsahujících amidickou skupinu, vznik příslušných chloramidů nebyl pozorován v drtivé většině případů. Starší zdroje přítomnost chloramidu hyaluronanu vůbec nezmiňují (Green S. P. a kol., *J. Rheumatology*, 17, 1670-5, 1990, Lindvall S. a kol., *Chem.-Biol. Interac.* 90, 1-12, 1994, Baker M. S. a kol., *Arthritis and Rheumatism*, 32, 4, 461-7, 1989). Jedná se o publikace, kde byly studovány degradace hyaluronanu s kyselinou chlornou nebo jejími solemi vznikajícími reakcí myeloperoxidázy (MPO) s peroxidem vodíku a s chloridy. Existují i práce, kde byly studovány degradace hlavně glykosaminoglykanů obsažených v extracelulární matrixi, za účelem simulace zánětlivých procesů. Hlavním výstupem měly být informace o samotném procesu a chemických strukturách, jejichž přítomnost se dá očekávat *in vivo*. V novějších zdrojích se už zmínky o chloramidech hyaluronanu vyskytují. Například v publikaci (Hawkins C. L. a kol., *Free Radical Biology & Medicine*, 24, 9, 1396-1410, 1998) byl studován mechanismus degradace kyseliny hyaluronové, chondroitin sulfátu a jiných i nízkomolekulových substrátů obsahujících amidickou skupinu. Jako oxidační činidlo byl použit HOCl/CIO⁻. Autoři předpokládají vznik chloramidu hyaluronanu jenom jako nestabilního intermediátu, který ale nebyl přímo detekován. Důvodem je jeho rychlé homolytické nebo redukční štěpení v obou případech za vzniku radikálů, které pak

- dál reagují cestou vedoucí k degradaci polymeru. V dalším článku (Parsons B. J. a kol., Biochem. J., 381, 175–184, 2004) je popsán vznik chloramidů hyaluronanu, chondroitin sulfátu a jiných substrátů pomocí MPO (enzymu myeloperoxidázy), peroxidu vodíku a chloridů. Autoři předpokládají, že příslušné chloramidy mají určitou životnost a detailně popisují jejich degradaci pomocí dalších činidel. Velmi zajímavý je článek (Rees M. D. a kol., J. Am. Chem. Soc., 125, 13719-13733, 2003), kde se popisují reakce mono, oligo i polysacharidů obsahujících amidickou skupinu s NaClO. Detailně je rozebrána stabilita chloramidů hyaluronanu a chondroitin sulfátu se stupněm modifikace 35% respektive 16% bez a s přítomností dalších činidel jako Cu^{2+} i v kombinaci s kyslíkem. Bylo zjištěno, že přítomnost některých kovů výrazně urychluje degradaci. I bez kovů byla pozorována rychlá degradace polymerních chloramidů hyaluronanu a chondroitin sulfátu při 50 °C. Při nižších teplotách byla degradace významně pomalejší. Bylo taky přímo pozorováno, že MPO v přítomnosti peroxidu vodíku a fyziologického množství chloridů generuje s glykosaminoglykany malé množství jejich chloramidů, z čehož autoři usuzují, že tyto chloramidy jsou generovány i *in vivo*.
- Z těchto výstupů lze předpokládat, že chloramid hyaluronanu o nízkém stupni modifikace sice je známý, ale neočekává se jeho dostatečná stabilita k tomu, aby měl tento materiál potenciál na přípravu nějakých kompozic pro použití v biomedicinských aplikacích.
- ## 20 Aplikace N-halogenovaných polymerů
- V této části jsou zmíněny výstupy, kde byly popsány i vybrané konkrétnější aplikace chloraminů nebo chloramidů.
- Přehledný článek (Hui F. a kol., Biomacromolecules, 14, 585–601, 2013) popsal přípravu, analýzu i aplikace různých materiálů obsahujících vazbu -N-halogen. Kyselina hyaluronová ale nebyla zmíněna v tomto přehledu, mezi materiály strukturně nejbližší byl popsán chitosan. Mezi chloračními činidly byly zmíněny i kyselina trichlorisokyanurová a její méně reaktivní analog dichlorisokyanurát sodný. Obecnou aplikační výhodou popsaných materiálů je efektivnost vůči široké škále mikroorganismů, dlouhodobá stabilita, regenerovatelnost, bezpečnost pro člověka a přírodu a také nízká cena. Většina popsaných aplikací používala N-chloro deriváty, kde byla obecně pozorována dobrá stabilita hlavně v případech, kdy vedle N-hal skupiny není uhlík s vodíkem (alfa vodík). Je-li alfa vodík přítomen, může docházet k eliminaci halogenovodíku a vzniku násobné iminové vazby $\text{-NHal-CH-} \rightarrow \text{-N=C-}$. Kyselina hyaluronová nebo chitosan takový alfa vodík obsahuje, takže tyto typy substrátů (aminosacharidy) mají strukturní fragment potenciálně problematický z pohledu stability.
- Příprava, analýza a testování chlorovaného chitosanu byla popsána i v článku (Cao Z. a kol., Journal of Biomedical Materials Research Part A, 85, 99-107, 2008). Materiál ve formě filmu byl úspěšně testován proti mikroorganismům *Staphylococcus aureus* a *Escherichia coli*. Bylo také pozorováno, že významně potlačuje tvorbu biofilmu. Sledována byla i stabilita při 25 °C, kde byl zaznamenán významný pokles množství aktivního chloru po jednom měsíci skladování až na 15 % původní hodnoty.
- N-chlorovaný polyuretan ve formě filmu, připravený reakcí s roztokem Cl_2 (Luo J. a kol., J Bioact Compat Polym, 30, 157-166, 2015), byl úspěšně testován proti *Staphylococcus aureus* (Gram-pozitivní bakterie), *Escherichia coli* (Gram-negativní bakterie) a *Candida albicans* (houba). Materiál výrazně potlačoval růst bakterií a taky významně inhiboval tvorbu biofilmu.
- Příprava a použití N-chloraminů široké škály substrátů byly nárokovány v tomto patentu (Heller A. a kol., WO 2008/094664). Mezi substráty byly zahrnuty i biopolymery: N-chlorovaný chitosan, N-chlorovaný polylysin a N-chlorovaná deacetylovaná kyselina hyaluronová, kde chlor se nenachází na amidu hyaluronanu, ale na jeho deacetylovaném aminu. Jako formy byly použity roztoky nebo bandáže obsahující příslušné chloraminy. Tyto materiály po topické aplikaci výrazně snižovaly bolest a svědění. Pro přípravu chloraminů byla zmíněna činidla typu HOCl,

NaClO, HClO₂, N-chlorosukcinimid, soli N-chlorsulfonamidů, molekulární chlor, thionylchlorid, fosgen, PCl₃ a PCl₅.

Obecně lze konstatovat, že chloramidy kyseliny hyaluronové s vyšším stupněm modifikace (více než 50 %) nebyly doposud popsány. Zmíněny byly jenom chloramidy s nižším stupněm modifikace (maximálně 35 %), kde nebyla popsána žádná aplikace z důvodů souvisejících s nevyhovující stabilitou. Přitom tento materiál by byl unikátní tím, že by současně splňoval následující požadavky:

- biokompatibilita a biodegradovatelnost (v těle se vyskytuje například při určitých zánětlivých procesech)
- inhibice růstu široké škály mikroorganismů, hub nebo virů (analog chloramidů a chloraminů).
- pozitivní účinky na procesy spojené s hojením (přítomnost kyseliny hyaluronové)
- možnost přípravy široké škály forem (aktivní složka je kovalentně vázaná na nosný polymer)

Tato kombinace je obecně žádoucí pro vnější i vnitřní aplikace vyžadující antimikrobiální, antivirální a současně biokompatibilní kryty ran, výplně, antiadhezní přepážky, membrány, kapsy nebo obaly.

Tento vynález řeší přípravu a použití stabilních, biokompatibilních a biodegradovatelných kompozic obsahujících chloramid hyaluronanu, které vykazují antimikrobiální, antivirální a současně i hojivé účinky. Dále popisuje přípravu široké škály forem s velkou variabilitou velikostí povrchu, mechanických, případně reologických vlastností a doby degradace.

Podstata vynálezu

Předmětem vynálezu je chlorovaný derivát kyseliny hyaluronové nebo modifikované kyseliny hyaluronové, nazývaný také chloramid hyaluronanu, který má vodík amidické skupiny -NH-CO-substituovaný atomem chloru podle strukturního vzorce -NCl-CO-, přičemž stupeň substituce je 50 až 100 %. Modifikovaná kyselina hyaluronová má některé -OH skupiny nahrazeny skupinou -O-CO-R² a/nebo některé -CH₂-OH skupiny nahrazeny za skupinu -CH=O a/nebo některé CO-OH skupiny nahrazeny skupinou -CO-OR², kde R² je lineární nebo aromatický řetězec s obsahem uhlíků C₁ – C₁₇. S výhodou je derivát kyseliny hyaluronové vybrán ze skupiny zahrnující ethylester, benzyl ester, formyl, lauroyl (C12), palmitoyl (C16), kaproyl (C6), kde molekulová hmotnost derivátu je s výhodou v rozmezí 5 až 500 kg.mol⁻¹ a stupeň modifikace je v rozsahu 1 až 100 %.

Dále se vynález týká způsobu přípravy chloramidu hyaluronanu, kde je chemická modifikace uskutečněna činidly obsahujícími chlor vázaný na dusík, s výhodou pomocí trichlorisokyanurové kyseliny nebo pomocí solí dichlorisokyanurové kyseliny. Konkrétně způsob podle vynálezu spočívá v tom, že se připraví vodný roztok výchozí kyseliny hyaluronové nebo jejího derivátu o molekulové hmotnosti v rozmezí 40 až 2200 kg.mol⁻¹, jehož koncentrace je v rozmezí 0,5 až 5 % hmotn., upraví se pH na rozmezí 2,5 až 7,5, s výhodou na rozmezí 4 až 6, například prostřednictvím kyseliny octové v množství 0,2 až 7 ekvivalentů na disacharid hyaluronanu, s výhodou 2 – 4 ekv. na disacharid hyaluronanu, a pak se přidá chlorační činidlo v množství 0,3 až 1,5 ekvivalentů na disacharid hyaluronanu a směs se nechá reagovat 5 až 72 hodin při teplotě 5 až 40 °C, načež se vzniklý chloramid izoluje vysrážením. Jako výchozí substrát lze použít kyselinu hyaluronovou, nebo její chemicky modifikovaný derivát o molekulové hmotnosti 40 až 2200 kg.mol⁻¹.

Předmětem vynálezu jsou i kompozice obsahující chloramid hyaluronanu, ve kterém je většina atomů vodíků amidické skupiny nahrazena za atomy chloru, tudíž vykazuje zvýšenou reaktivitu v oxidačních i redukčních reakcích. Finální kompozice mohou zahrnovat i modifikovanou kyselinu hyaluronovou s chemickou modifikací na karboxylové a/nebo hydroxylové skupině. Kompozice

podle vynálezu se vyznačuje antimikrobiální, antifungální a antivirovou účinností. Chloramid je v kompozici přítomen v koncentraci 10 až 99 % hmotn. a kompozice dále obsahuje aditivum vybrané ze skupiny zahrnující vodu, chlorid sodný, chlorid vápenatý, glycerol, kyselinu hyaluronovou, chondroitin sulfát, alginát sodný, oxycelulózu, karboxymethylcelulózu, hydroxyethylcelulózu nebo modifikovanou kyselinu hyaluronovou, která má některé -OH skupiny nahrazeny skupinou -O-CO-R² a/nebo některé -CH₂-OH skupiny nahrazeny skupinou -CH=O a/nebo některé -CO-OH skupiny nahrazeny skupinou -CO-OR², kde R² je lineární nebo aromatický řetězec s obsahem uhlíků C₁ – C₁₇. Kompozice může být například ve formě roztoku nebo gelu ve vodném rozpouštědle, přičemž zastoupení chloramidu hyaluronanu ve finální kompozici v přepočtu na suchý materiál je v rozsahu 10 až 100 %. Kompozice může být také ve formě pevného substrátu vybraného ze skupiny zahrnující samonosný film, lyofilizát, vrstvu ze staplových vláken (netkanou textilií), nekonečné vlákno, tkaninu, pleteninu, splétanou textilií nebo vrstvu nanovláken, přičemž zastoupení chloramidu hyaluronanu ve finální kompozici v přepočtu na suchý materiál je v rozsahu 10 až 100 %.

Chlorovaný derivát podle vynálezu, jakož i kompozici podle vynálezu lze použít pro přípravu krytů ran nebo pro přípravu implantabilních zdravotnických prostředků. Neomezujícími příklady pro tyto aplikace jsou přípravky pro prevenci vzniku srůstů po provedení anastomóz, nebo přípravky působící preventivně proti dehiscencím, nebo v kombinaci s jinými látkami prostředky pro plastiku defektů břišní stěny, nebo jako součást složení implantabilních obalů zdravotnických prostředků.

Příprava finálních kompozic pak dále zahrnuje tvorbu forem s obsahem chloramidu hyaluronanu, které mohou být připraveny v podobě:

- pevných forem, jako například samonosné filmy, lyofilizáty, vrstva ze staplových vláken (netkaná textilie), nekonečné vlákno, tkanina, pletenina, splétaná textilie nebo vrstva nanovláken, ve všech případech volitelně s obsahem dalších aditiv.
- kapalných forem, zejména vodných roztoků chloramidu, volitelně s obsahem dalších aditiv.

Neomezujícími příklady aditiv jsou například polyethylen oxid, kyselina hyaluronová, chondroitin sulfát, kyselina hyaluronová modifikovaná ve formě esterů, kyselina hyaluronová modifikovaná ve formě aldehydů, alginát sodný, karboxymethyl celulóza, oxycelulóza, hydroxyethyl celulóza, estery mastných kyselin, chlorid sodný, chlorid draselný nebo chlorid vápenatý.

Dále se vynález týká použití tohoto materiálu hlavně v oblastech, kde jsou vyžadovány následující vlastnosti, nebo jejich libovolné kombinace:

- oxidační nebo redukční nebo antimikrobiální nebo antifungální nebo antivirální aktivita
- biokompatibilita a biodegradovatelnost
- možnost přípravy různých forem s vyhovující stabilitou
- možnost řízení rychlosti biodegradace
- možnost řízení rychlosti oxidačních nebo redukčních reakcí
- významná podpora procesu hojení

Stabilní kapalně kompozice na bázi chloramidu hyaluronanu by neměly obsahovat aditiva, která s chloramidem hyaluronanu reagují. Jedná se především o sloučeniny citlivé na oxidaci (chloramid hyaluronanu se redukuje a funguje jako oxidant) anebo o silná oxidační činidla například s obsahem kyslíkových radikálů (chloramid hyaluronanu se oxiduje a funguje jako reduktant). U stabilních tuhých kompozic je možné kombinovat chloramid hyaluronanu i s aditivou, která s chloramidem hyaluronanu reagují. Jedná se ale jenom o případy, kde v procesu přípravy nepříjdou do kontaktu roztok chloramidu hyaluronanu a roztok aditiva.

Kontrolu řízení rychlosti biodegradace finální kompozice lze docílit buď kombinací chloramidu

hyaluronanu s aditivu s pomalejší degradabilitou, například s alginátem sodným nebo karboxymethyl celulózu nebo s chemicky modifikovanou kyselinou hyaluronovou, a/nebo síťováním samotného chloramidu hyaluronanu například pomocí vícevalentních kationtů typu Ca^{2+} .

5

Kontrolu řízení rychlosti uvolňování oxidující složky lze docílit změnou fyzikálních vlastností finální kompozice, jako například bobtnání, a to pomocí přidavku aditiv, která jsou méně polární. Jako neomezující příklad méně polárního aditiva je chemicky modifikovaný derivát kyseliny hyaluronové, který má některé -OH skupiny nahrazeny skupinou -O-CO-R², a/nebo -CO-OH skupiny nahrazeny skupinou -CO-OR², kde R² je - lineární nebo aromatický řetězec s obsahem uhlíků C₁ – C₁₇.

10

Finální kompozice lze použít v biomedicínských aplikacích například jako kryty ran, přípravky proti akné, antibakteriální výplně, antiadhezni přepážky, membrány, kapsy nebo obaly.

15

Tento vynález řeší přípravu a použití stabilních, biokompatibilních a biodegradovatelných kompozic obsahujících chloramid hyaluronanu, které vykazují antimikrobiální, antivirální a současně i hojivé účinky. Stabilita materiálu je popsána v příkladu 16. Dále popisuje přípravu široké škály forem s velkou variabilitou velikosti povrchu, mechanických případně reologických vlastností a doby degradace.

20

Realizace řešení popsaného v tomto vynálezu není technologicky komplikované a nevyžaduje použití méně dostupných chemikálií, rozpouštědel nebo izolačních postupů.

25

Objasnění výkresů

Obr. 1A, 1B - Antimikrobiální aktivita kompozice ve formě lyofilizátu na bázi chloramidu hyaluronanu připraveného podle Příkladu 25.

30

Obrázky zobrazují inhibici růstu mikroorganismů *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida Albicans*, *Pseudomona aeruginosa*, *Staphylococcus epidermis* v přítomnosti rozpustných lyofilizátů na bázi chloramidu hyaluronanu připravených podle příkladu 25 (Obr. 1A) v porovnání s kontrolou, kterou byl lyofilizát z nativní kyseliny hyaluronové (Obr. 1B).

35

Postup stanovení antimikrobiální aktivity je popsán v příkladu 43.

Obr. 2 - Antimikrobiální aktivita kompozice ve formě filmu na bázi chloramidu hyaluronanu připraveného podle Příkladu 32.

40

Obrázky zobrazují inhibici růstu mikroorganismů *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* a *Staphylococcus aureus* v přítomnosti nerozpustného filmu na bázi chloramidu hyaluronanu s aditivem, jímž je hyaluronan esterifikovaný laurovou kyselinou, film připravený podle příkladu 32, v porovnání s kontrolou připravenou podle příkladu 31.

45

Postup stanovení antimikrobiální aktivity je popsán v příkladu 43.

50

Příklady uskutečnění vynálezu

DS = stupeň substituce = 100 % * (molární množství modifikovaných jednotek polymeru) / (molární množství všech jednotek polymeru)

55

Zde používaný výraz ekvivalent (ekv) se vztahuje, není-li uvedeno jinak, na opakující se jednotku

příslušného polysacharidu, například na disacharid kyseliny hyaluronové. Procenta se uvádějí jako hmotnostní procenta, pokud není uvedeno jinak. Molekulová hmotnost polymerů je hmotnostně střední stanovená pomocí metody SEC-MALLS.

5 Příklad 1

Příprava ethylesteru hyaluronanu

Do roztoku hyaluronanu (1 g, 300 kg.mol⁻¹) ve 40 ml vody se přidal NaOH až do pH = 9. Pak se přidalo 20 ml dimethylsulfoxidu a 0,08 ml ethyljodidu a směs se míchala 3 dny při 45 °C. Výsledná směs pak byla srážena 140 ml 100% isopropanolu, odfiltrovaná tuhá látka byla promyta isopropanolem a sušena ve vakuu. Produkt (897 mg) byl analyzován pomocí NMR. DS esteru 6 % (stanoveno NMR, lit. Kettou S. a kol. CZ PV 2009-399).

15 Příklad 2

Příprava benzylesteru hyaluronanu

Do roztoku hyaluronanu (1 g, 300 kg.mol⁻¹) ve 40 ml vody se přidal NaOH až do pH = 9. Pak se přidalo 20 ml dimethylsulfoxidu a 0,08 ml benzylbromidu a směs se míchala 4 dny při 20 °C. Výsledná směs pak byla srážena 140 ml 100% isopropanolu, odfiltrovaná tuhá látka byla promyta isopropanolem a sušena ve vakuu. Finální produkt získaný v množství 920 mg byl analyzován pomocí NMR. DS esteru 3 % (stanoveno NMR, lit. Kettou a kol. PV 2009-399).

25 Příklad 3

Příprava lauroyl hyaluronanu

Do roztoku hyaluronanu (5 g, 250 kg.mol⁻¹) ve 100 ml destilované vody bylo přidáno 70 ml tetrahydrofuranu, 4 ekvivalenty triethylaminu a 0,1 ekvivalentu 4-dimethylaminopyridinu. Paralelně byla rozpuštěna kyselina laurová (4 ekvivalenty) v 30 ml tetrahydrofuranu a 7 ml triethylaminu a do tohoto roztoku bylo přidáno 4,8 ml ethylchloroformiátu při 0-5 °C po dobu 15 minut. Vniklá suspenze byla přefiltrována do roztoku hyaluronanu a reakční směs byla míchána 5 hodin při 20 °C. Výsledný roztok byl pak srážen přidávkem 400 ml 100% isopropanolu, promyt 80% isopropanolem, pak 100% isopropanolem. Sraženina byla pak sušena při 40 °C, 2 dny. Stupeň substituce byl stanoven z NMR na 37 %.

Příklad 4

40 Příprava formyl hyaluronanu

Do jednoprocenního vodného roztoku HA (1 g, 200 kg.mol⁻¹) s obsahem NaCl 1%, KBr 1%, N-acetylamino-TEMPO (0,01 ekv) a NaHCO₃ (20 ekv.) se postupně přidával vodný roztok NaClO (0,5 ekv) pod dusíkem. Směs se míchala 12 h při teplotě 10 °C, pak se přidal 0,1 g etanolu a směs byla míchána ještě 1 hodinu. Výsledný roztok pak byl zředěn destilovanou vodou na 0,2% a dialyzován oproti směsi (0,1% NaCl, 0,1% NHCO₃) 3-krát 5 litrů (1 x denně) a pak oproti destilované vodě 7-krát 5 litrů (2 x denně). Výsledný roztok byl pak odpařen a analyzován. DS 9 % (stanoveno z NMR)

50 Příklad 5

Příprava chloramidu hyaluronanu

5 g hyaluronanu (Mw 2200 kg.mol⁻¹) bylo rozpuštěno ve 250 ml destilované vody. Pak byly přidány 2 ml kyseliny octové a po 15 minutách míchání při 20 °C bylo přidáno 3,2 g (1 ekv.)

sodné soli dichlorisokyanurové kyseliny. Směs byla pak 24 hodin míchána při 20 °C, pak srážena 2,5 litrem isopropanolu a filtrována. Tuhý podíl byl promyt 2 litry isopropanolu a sušen ve vakuu 20 hodin. DS 82 % (stanoveno z NMR).

5 Příklad 6

Příprava chloramidu hyaluronanu

10 5 g hyaluronanu (M_w 40 kg.mol⁻¹) bylo rozpuštěno ve 100 ml destilované vody. Pak byly přidány 2 ml kyseliny octové a po 15 minutách míchání při 20 °C bylo přidáno 3,2 g (1 ekv.) sodné soli dichlorisokyanurové kyseliny. Směs byla pak 24 hodin míchána při 20 °C, pak srážena 2,5 litrem isopropanolu a filtrována. Tuhý podíl byl promyt 2 litry isopropanolu a sušen ve vakuu 20 hodin. DS 83 % (stanoveno z NMR).

15 Příklad 7

Příprava chloramidu hyaluronanu

20 5 g hyaluronanu (M_w 2200 kg.mol⁻¹) bylo rozpuštěno v 1000 ml destilované vody. Pak byly přidány 2 ml kyseliny octové a po 15 minutách míchání při 20 °C bylo přidáno 3,2 g (1 ekv.) sodné soli dichlorisokyanurové kyseliny. Směs byla pak 24 hodin míchána při 20 °C, pak srážena 2,5 litrem isopropanolu a filtrována. Tuhý podíl byl promyt 2 litry isopropanolu a sušen ve vakuu 20 hodin. DS 72 % (stanoveno z NMR).

25 Příklad 8

Příprava chloramidu hyaluronanu

30 5 g hyaluronanu (M_w 2200 kg.mol⁻¹) bylo rozpuštěno ve 250 ml destilované vody. Pak bylo přidáno 0,14 ml kyseliny octové (0,2 ekv) a po 15 minutách míchání při 20 °C bylo přidáno 3,2 g (1 ekv.) sodné soli dichlorisokyanurové kyseliny. Směs byla pak 24 hodin míchána při 20 °C, pak srážena 2,5 litrem isopropanolu a filtrována. Tuhý podíl byl promyt 2 litry isopropanolu a sušen ve vakuu 20 hodin. DS 53% (stanoveno z NMR).

35 Příklad 9

Příprava chloramidu hyaluronanu

40 5 g hyaluronanu (M_w 180 kg.mol⁻¹) bylo rozpuštěno ve 250 ml destilované vody. Pak byly přidány 3 ml kyseliny octové a po 15 minutách míchání při 20 °C bylo přidáno 3,2 g (1 ekv.) sodné soli dichlorisokyanurové kyseliny. Směs byla pak 24 hodin míchána při 20 °C, pak srážena 2,5 litrem isopropanolu a filtrována. Tuhý podíl byl promyt 2 litry isopropanolu a sušen ve vakuu 20 hodin. DS 53 % (stanoveno z NMR).

45 Příklad 10

Příprava chloramidu hyaluronanu

50 5 g hyaluronanu (M_w 2200 kg.mol⁻¹) bylo rozpuštěno ve 250 ml destilované vody. Pak bylo přidáno 5 ml kyseliny octové (7 ekv) a po 15 minutách míchání při 20 °C bylo přidáno 3,2 g (1 ekv.) sodné soli dichlorisokyanurové kyseliny. Směs byla pak 24 hodin míchána při 20 °C, pak srážena 2,5 litrem isopropanolu a filtrována. Tuhý podíl byl promyt 2 litry isopropanolu a sušen ve vakuu 20 hodin. DS 95 % (stanoveno z NMR).

Příklad 11

Příprava chloramidu hyaluronanu

5

5 g hyaluronanu (M_w 2200 kg.mol⁻¹) bylo rozpuštěno ve 250 ml destilované vody. Pak byly přidány 2 ml kyseliny octové a po 15 minutách míchání při 20 °C bylo přidáno 1,07 g (0,33 ekv.) sodné soli dichlorisokyanurové kyseliny. Směs byla pak 24 hodin míchána při 20 °C, pak srážena 2,5 litrem isopropanolu a filtrována. Tuhý podíl byl promyt 2 litry isopropanolu a sušen ve vakuu 20 hodin. DS 51 % (stanoveno z NMR).

10

Příklad 12

Příprava chloramidu hyaluronanu

15

5 g hyaluronanu (M_w 2200 kg.mol⁻¹) bylo rozpuštěno ve 250 ml destilované vody. Pak byly přidány 2 ml kyseliny octové a po 15 minutách míchání při 20 °C bylo přidáno 4,8 g (1,5 ekv.) sodné soli dichlorisokyanurové kyseliny. Směs byla pak 24 hodin míchána při 20 °C, pak srážena 2,5 litrem isopropanolu a filtrována. Tuhý podíl byl promyt 2 litry isopropanolu a sušen ve vakuu 20 hodin. DS 96 % (stanoveno z NMR).

20

Příklad 13

Příprava chloramidu hyaluronanu

25

5 g hyaluronanu (M_w 2200 kg.mol⁻¹) bylo rozpuštěno ve 250 ml destilované vody. Pak byly přidány 2 ml kyseliny octové a po 15 minutách míchání při 20 °C bylo přidáno 2,91 g (1 ekv.) trichlorisokyanurové kyseliny. Směs byla pak 24 hodin míchána při 20 °C, pak srážena 2,5 litrem isopropanolu a filtrována. Tuhý podíl byl promyt 2 litry isopropanolu a sušen ve vakuu 20 hodin. DS 97 % (stanoveno z NMR).

30

Příklad 14

Příprava chloramidu hyaluronanu

35

5 g hyaluronanu (M_w 2200 kg.mol⁻¹) bylo rozpuštěno ve 250 ml destilované vody. Pak byly přidány 2 ml kyseliny octové a po 15 minutách míchání při 20 °C bylo přidáno 0,87 g (0,3 ekv.) trichlorisokyanurové kyseliny. Směs byla pak 24 hodin míchána při 20 °C, pak srážena 2,5 litrem isopropanolu a filtrována. Tuhý podíl byl promyt 2 litry isopropanolu a sušen ve vakuu 20 hodin. DS 71 % (stanoveno z NMR).

40

Příklad 15

Příprava chloramidu hyaluronanu

45

5 g hyaluronanu (M_w 2200 kg.mol⁻¹) bylo rozpuštěno ve 250 ml destilované vody. Pak byly přidány 2 ml kyseliny octové a po 15 minutách míchání při 20 °C bylo přidáno 3,2 g (1 ekv.) sodné soli dichlorisokyanurové kyseliny. Směs byla pak 5 hodin míchána při 20 °C, pak srážena 2,5 litrem isopropanolu a filtrována. Tuhý podíl byl promyt 2 litry isopropanolu a sušen ve vakuu 20 hodin. DS 52 % (stanoveno z NMR).

50

Příklad 16

Příprava chloramidu hyaluronanu

55

5 g hyaluronanu (M_w 2200 kg.mol⁻¹) bylo rozpuštěno ve 250 ml destilované vody. Pak byly přidány 2 ml kyseliny octové a po 15 minutách míchání při 20 °C bylo přidáno 3,2 g (1 ekv.) sodné soli dichlorisokyanurové kyseliny. Směs byla pak 48 hodin míchána při 20 °C, pak srážena 2,5 litrem isopropanolu a filtrována. Tuhý podíl byl promyt 2 litry isopropanolu a sušen ve vakuu 20 hodin. DS 85% (stanoveno z NMR). NMR roztok (7 mg produktu v 0,7 ml D₂O) byl měřen po dalších 5 dnech stání při 20 °C. DS bylo stanoveno na 84%. Tuhý podíl ve formě prášku stál při 20 °C 100 dnů, pak byl vzorek rozpuštěn v D₂O. DS bylo stanoveno na 84 %.

Příklad 17

Příprava chloramidu hyaluronanu

5 g hyaluronanu (M_w 2200 kg.mol⁻¹) bylo rozpuštěno ve 250 ml destilované vody. Pak byly přidány 2 ml kyseliny octové a po 15 minutách míchání při 20 °C bylo přidáno 3,2 g (1 ekv.) sodné soli dichlorisokyanurové kyseliny. Směs byla pak 72 hodin míchána při 5 °C, pak srážen litrem isopropanolu a filtrována. Tuhý podíl byl promyt 2 litry isopropanolu a sušen ve vakuu 20 hodin. DS 64 % (stanoveno z NMR).

Příklad 18

Příprava chloramidu hyaluronanu

5 g hyaluronanu (M_w 2200 kg.mol⁻¹) bylo rozpuštěno ve 250 ml destilované vody. Pak byly přidány 2 ml kyseliny octové a po 15 minutách míchání při 20 °C bylo přidáno 3,2 g (1 ekv.) sodné soli dichlorisokyanurové kyseliny. Směs byla pak 5 hodin míchána při 40 °C, pak srážena litrem isopropanolu a filtrována. Tuhý podíl byl promyt 2 litry isopropanolu a sušen ve vakuu 20 hodin. DS 75 % (stanoveno z NMR).

Příklad 19

Příprava chloramidu hyaluronanu

5 g hyaluronanu (M_w 300 kg.mol⁻¹) bylo rozpuštěno ve 250 ml destilované vody. Pak byly přidány 2 ml kyseliny octové a po 15 minutách míchání při 20 °C bylo přidáno 2,56 g (0,8 ekv.) sodné soli dichlorisokyanurové kyseliny. Směs byla pak 24 hodin míchána při 20 °C, pak srážena 2,5 litrem isopropanolu a filtrována. Tuhý podíl byl promyt 2 litry isopropanolu a sušen ve vakuu 20 hodin. DS 79 % (stanoveno z NMR).

Příklad 20

Příprava chloramidu hyaluronanu

5 g hyaluronanu (M_w 300 kg.mol⁻¹) bylo rozpuštěno ve 350 ml destilované vody. Pak byly přidány 2 ml kyseliny octové a po 5 minutách míchání při 20 °C bylo přidáno 2,56 g (0,8 ekv.) sodné soli dichlorisokyanurové kyseliny. Směs byla pak 22 hodin míchána při 17 °C, pak srážena 2,5 litrem isopropanolu a filtrována. Tuhý podíl byl promyt 2 litry isopropanolu a sušen ve vakuu 20 hodin. DS 66 % (stanoveno z NMR).

Příklad 21

Příprava chloramidu hyaluronanu

5 g hyaluronanu (M_w 300 kg.mol⁻¹) bylo rozpuštěno ve 250 ml destilované vody. Pak byly přidány 2 ml kyseliny octové a po 15 minutách míchání při 5 °C bylo přidáno 2,56 g (0,8 ekv.) sodné soli dichlorisokyanurové kyseliny. Směs byla pak 24 hodin míchána při 5 °C, pak srážena

2,5 litrem isopropanolu a filtrována. Tuhý podíl byl promyt 2 litry isopropanolu a sušen ve vakuu 20 hodin. DS 50 % (stanoveno z NMR).

Příklad 22

5

Příprava chloramidu ethyl esteru hyaluronanu

0,5 g ethylesteru hyaluronanu připraveného podle příkladu 1 bylo rozpuštěno ve 25 ml destilované vody. Pak byly přidány 0,2 ml kyseliny octové a po 15 minutách míchání při 20 °C bylo přidáno 0,32 g (1 ekv.) sodné soli dichlorisokyanurové kyseliny. Směs byla pak 24 hodin míchána při 20 °C, pak srážena 250 ml isopropanolu a filtrována. Tuhý podíl byl promyt 0,2 litry isopropanolu a sušen ve vakuu 20 hodin. DS 80 % (stanoveno z NMR).

15

Příklad 23

Příprava chloramidu benzyl esteru hyaluronanu

0,5 g benzylesteru hyaluronanu připraveného podle příkladu 2 bylo rozpuštěno ve 25 ml destilované vody. Pak byly přidány 0,2 ml kyseliny octové a po 15 minutách míchání při 20 °C bylo přidáno 0,32 g (1 ekv.) sodné soli dichlorisokyanurové kyseliny. Směs byla pak 24 hodin míchána při 20 °C, pak srážena 0,25 litru isopropanolu a filtrována. Tuhý podíl byl promyt 0,2 litry isopropanolu a sušen ve vakuu 20 hodin. DS 78 % (stanoveno z NMR).

25

Příklad 24

Příprava chloramidu formyl hyaluronanu

0,5 g formylu hyaluronanu připraveného podle příkladu 4 bylo rozpuštěno ve 25 ml destilované vody. Pak byly přidány 0,2 ml kyseliny octové a po 15 minutách míchání při 20 °C bylo přidáno 0,32 g (1 ekv.) sodné soli dichlorisokyanurové kyseliny. Směs byla pak 24 hodin míchána při 20 °C, pak srážena 0,25 litru isopropanolu a filtrována. Tuhý podíl byl promyt 0,2 litry isopropanolu a sušen ve vakuu 20 hodin. DS 75 % (stanoveno z NMR).

35

Příklad 25

Příprava lyofilizátu chloramidu hyaluronanu

Roztok 0,2 g chloramidu hyaluronanu připraveného podle příkladu 5 v 10 ml destilované vody byl po homogenizaci hned zamražen při -50 °C a lyofilizován. DS bylo stanoveno pomocí NMR na 70 %.

Příklad 26

Příprava lyofilizátu chloramidu ethyl esteru hyaluronanu

Roztok 0,2 g chloramidu ethyl esteru hyaluronanu připraveného podle příkladu 22 v 10 ml destilované vody byl po homogenizaci hned zamražen při -50 °C a lyofilizován. DS bylo stanoveno pomocí NMR na 68 %.

Příklad 27

Příprava lyofilizátu chloramidu benzyl esteru hyaluronanu

Roztok 0,2 g chloramidu benzyl esteru hyaluronanu připraveného podle příkladu 23 v 10 ml destilované vody byl po homogenizaci hned zamražen při -50 °C a lyofilizován. DS bylo

stanoveno pomocí NMR na 67 %.

Příklad 28

5 Příprava netkané textilie ze staplových vláken z chloramidu hyaluronanu

K přípravě 2 % roztoku byl použit chloramid hyaluronanu (příklad 14) se stupněm substituce 71 % NMR. Tato složka byla navážena a v potřebném množství doplněna destilovanou vodou. Celá směs byla promíchávána na míchačce při pokojové teplotě, při nastavených otáčkách 500 RPM po dobu míchání 24 hodin. Výsledný roztok byl čirý, mírně viskózní. Způsob přípravy staplových vláken je založen na srážení polymerního roztoku v proudu mobilní koagulační lázně obsahující 100 % isopropanol. Roztok byl dávkován při pokojové teplotě skrz extruzní trysky do proudu koagulační lázně skrz zvlákňovací trubice (1 trubice/průměr 8 mm), při nastavené průtočné rychlosti lázně 1,15 m/s. Srážením bylo docíleno tvorby staplových vláken. Vzniklá vlákna byla unášena v proudu lázně a zachytávána na separačních hřebínkách, přenesena do zrací lázně s obsahem 100 % isopropanolu. Surová vlákna ve zrací lázni byla hned pomleta v mixéru s rotujícími čepelemi při poměru 0,5 g vláken na 350 ml zrací lázně. Výsledná vlákenná disperze byla přefiltrována přes porézní substrát přes filtrační rám. V daném experimentu byl použit rám o velikosti 64 cm². Přefiltrovaná vlákna byla pomocí PAD pleteniny přenesena na sušicí zařízení s fixací netkané textilie. Před vložením na sušicí zařízení byly pomocí válečku odstraněny zbytky srážedla. Netkaná textilie byla sušena při teplotě 40 °C po dobu 30 minut. Výsledná vrstva byla ze substrátu oddělena jako samostatná vrstva a zvážena na analytických vahách. Plošná hmotnost textilie činila 50,2 g/m². Stupeň substituce byl u vzniklé netkané textilie stanoven pomocí NMR na 64 %.

25 Příklad 29

Příprava nanovláknenné vrstvy z chloramidu hyaluronanu

Pro přípravu nanovláknenné vrstvy s obsahem kyseliny hyaluronové byl připraven vodný roztok s následujícím složením. Koncentrace chloramidu hyaluronanu připraveného postupem 5 v sušině byla 37,5 %, koncentrace nativního hyaluronanu o molekulové hmotnosti 80 kg.mol⁻¹ byla 37,5 %, polyethylenoxid o molekulové hmotnosti 600 kg.mol⁻¹ tvořil 25 %. Celková koncentrace sušiny byla 5 %. Roztok byl naplněn do stříkačky a elektrostaticky zvlákněn na deskový kolektor za použití bezjehlové lineární trysky, napětí 50 kV a vzdálenosti 16 cm mezi emitorem a kolektorem. Vlákná mají rozměr 110 ± 27 nm. DS bylo stanoveno pomocí NMR na 30 %.

Příklad 30

40 Příprava samonosného filmu z chloramidu hyaluronanu

Příprava filmu probíhala ve specializovaném sušicím zařízení, kde byl film sušen v uzavřeném prostoru. Zařízení je vybaveno spodní a horní deskou s regulovatelnou teplotou. Zařízení je blíže popsáno v (Foglarová a kol. PV2015-166; Foglarová M. a kol. *Carbohydrate Polymers* 2016, 144, 68-75). Navážka 200 mg chloramidu hyaluronanu popsaného v příkladu 5 byla rozpuštěna ve 20 ml demi-vody a nechána míchat 2 hodiny. Poté byl roztok nadávkován do sušicího zařízení na podložku (hydrofobizované sklo) a usušen v uzavřeném prostoru při teplotě spodní desky 50 °C a teplotě horní desky 20 °C. Doba sušení byla 18 hodin. Po usušení byl film sejmut z podložky a uchován pro další použití. DS bylo stanoveno pomocí NMR na 60 %.

50 Příklad 31

Příprava samonosného filmu z lauroyl hyaluronanu a nativního hyaluronanu (4/1)

55 Příprava filmu probíhala v zařízení popsaném v příkladu 30. Navážka 160 mg lauroyl derivátu

hyaluronanu sodného popsaného v příkladu 3 byla rozpuštěna v 16 ml vodného roztoku 2-propanolu (50 % w/w) a nechána míchat 18 hodin. Navážka 40 mg nativního hyaluronanu o molekulové hmotnosti 330 kg.mol^{-1} byla rozpuštěna ve 4 ml demi-vody a nechána míchat 18 hodin. Oba roztoky byly poté smíseny a nechány míchat 30 minut. Poté byl výsledný směsný roztok nadávkován do sušicího zařízení na podložku (hydrofobizované sklo) a usušen v uzavřeném prostoru při teplotě spodní desky 50°C a teplotě horní desky 20°C . Doba sušení byla 7 hodin. Po usušení byl film sejmут z podložky a uchován pro další použití.

Příklad 32

Příprava samonosného filmu z lauroyl hyaluronanu a chloramidu hyaluronanu (3/1)

Příprava filmu probíhala v zařízení popsaném v příkladu 30. Navážka 150 mg lauroyl derivátu hyaluronanu sodného popsaného v příkladu 3 byla rozpuštěna v 15 ml vodného roztoku 2-propanolu (50 % w/w) a nechána míchat 18 hodin. Navážka 50 mg chloramidu hyaluronanu popsaného v příkladu 5 byla rozpuštěna v 5 ml demi-vody a nechána míchat 2 hodiny. Oba roztoky byly poté smíseny a nechány míchat 30 minut. Poté byl výsledný směsný roztok nadávkován do sušicího zařízení na podložku (hydrofobizované sklo) a usušen v uzavřeném prostoru při teplotě spodní desky 50°C a teplotě horní desky 20°C . Doba sušení byla 7 hodin. Po usušení byl film sejmут z podložky a uchován pro další použití. DS chloramidu hyaluronanu ve výsledném materiálu bylo stanoveno pomocí NMR na 25 %.

Příklad 33

Příprava samonosného filmu z lauroyl hyaluronanu a chloramidu hyaluronanu (4/1)

Příprava filmu probíhala v zařízení popsaném v příkladu 30. Navážka 160 mg lauroyl derivátu hyaluronanu sodného popsaného v příkladu 3 byla rozpuštěna v 16 ml vodného roztoku 2-propanolu (50 % w/w) a nechána míchat 18 hodin. Navážka 40 mg chloramidu hyaluronanu popsaného v příkladu 5 byla rozpuštěna ve 4 ml demi-vody a nechána míchat 2 hodiny. Oba roztoky byly poté smíseny a nechány míchat 30 minut. Poté byl výsledný směsný roztok nadávkován do sušicího zařízení na podložku (hydrofobizované sklo) a usušen v uzavřeném prostoru při teplotě spodní desky 50°C a teplotě horní desky 20°C . Doba sušení byla 7 hodin. Po usušení byl film sejmут z podložky a uchován pro další použití. DS chloramidu hyaluronanu ve výsledném materiálu bylo stanoveno pomocí NMR na 20 %.

Příklad 34

Příprava pleteniny z vláken z chloramidu hyaluronanu

Pro tvorbu vlákna byl jako vstupní surovina použit chloramid hyaluronanu připravený dle postupu 14. Rozpuštěním tohoto polymeru v demineralizované vodě byl připraven roztok o koncentraci 4,7 %. Po rozpuštění byl roztok převeden do injekční stříkačky a odplyněn pomocí centrifugy. Roztok byl dávkován rychlostí $200 \mu\text{l/min}$ do srážecí lázně složené ze směsi kyselina mléčná a isopropanol 1:4. Vláknو bylo navíjeno rychlostí $1,45 \text{ m/min}$. Následně bylo vlákno promyto v isopropylalkoholu a zasušeno. Jemnost vlákna byla 9 tex, pevnost $1,0 \text{ N}$ a tažnost 11 %. DS chloramidu bylo stanoveno pomocí NMR na 34 %. Pro tvorbu pleteniny byla sdružena a zakroucena tři vlákna na prstencovém stroji při podávání 10 m/min a otáčkách vřetene 3000 min^{-1} ; výsledný zákrut měl hodnotu 300 m^{-1} . Z nití byla na dvoulůžkovém osnovním pletacím stroji vyrobena oboulící pletenina v trikotové vazbě s uzavřenými očky. Výsledný pruh pleteniny měl šířku 10 mm, plošnou hmotnost 99 g.m^{-2} a hustotu oček 36 cm^{-2} .

Příklad 35

Příprava pleteniny z vláken z lauroyl hyaluronanu a chloramidu hyaluronanu (4/1)

Pro tvorbu vlákna byla jako vstupní surovina použita kombinace 400 mg lauroyl hyaluronanu připraveného podle příkladu 3 a 100 mg chloramidu hyaluronanu připraveného dle příkladu 14. Navážka chloramidu hyaluronanu byla rozpuštěna v 6 mL demi vody, následně bylo přilito 5,1 mL isopropanolu a přidána navážka lauroyl hyaluronanu (DS dle NMR 91 %, MW 300-350 kDa). Byl připraven roztok o koncentraci 4,5 %, který byl převeden do injekční stříkačky a odplyněn pomocí centrifugy. Následně byl roztok dávkován rychlostí 200 $\mu\text{L}/\text{min}$ do srážecí lázně složené ze směsi kyselina mléčná a isopropanol 1:4. Vláknem bylo navíjeno rychlostí 1,32 m/min. Následně bylo vlákno promyto v isopropylalkoholu, stabilizováno v acetonu a zasušeno. Jemnost vláknem byla 8 tex, pevnost 0,7 N a tažnost 16 %. Pro tvorbu pleteniny byla sdružena a zakroucena tři vlákna na prstencovém stroji při podávání 10 m/min a otáčkách vřetene 3000 min^{-1} ; výsledný zákrut měl hodnotu 300 m^{-1} . Z nití byla na dvoulůžkovém osnovním pletacím stroji vyrobena oboulícni pletenina v trikotové vazbě s uzavřenými očky. Výsledný pruh pleteniny měl šířku 10 mm, plošnou hmotnost 91 $\text{g}\cdot\text{m}^{-2}$ a hustotu oček 36 cm^{-2} .

Příklad 36

Příprava lyofilizátu oxycelulóza/chloramid hyaluronanu

Roztok oxycelulózy (0,3 g, Mw 50 $\text{kg}\cdot\text{mol}^{-1}$) a chloramidu hyaluronanu (0,1 g) připraveného podle postupu 5 ve 100 ml destilované vody byl po homogenizaci hned zamražen při $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ a lyofilizován. DS chloramidu hyaluronanu bylo stanoveno pomocí NMR na 24 %.

Příklad 37

Příprava lyofilizátu alginát/ chloramid hyaluronanu

Roztok alginátu (0,3 g, Mw 40 $\text{kg}\cdot\text{mol}^{-1}$) a chloramidu hyaluronanu (0,1 g) připraveného podle postupu 5 ve 100 ml destilované vody byl po homogenizaci hned zamražen při $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ a lyofilizován. DS chloramidu hyaluronanu bylo stanoveno pomocí NMR na 26 %.

Příklad 38

Příprava lyofilizátu karboxymethylcelulóza/ chloramid hyaluronanu

Roztok karboxymethyl celulózy (0,3 g, Mw 30 $\text{kg}\cdot\text{mol}^{-1}$) a chloramidu hyaluronanu (0,03 g) připraveného podle postupu 5 ve 100 ml destilované vody byl po homogenizaci hned zamražen při $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ a lyofilizován. DS chloramidu hyaluronanu bylo stanoveno pomocí NMR na 3 %.

Příklad 39

Příprava lyofilizátu chondroitin sulfát/ chloramid hyaluronanu

Roztok chondroitin sulfátu (0,03 g, Mw 45 $\text{kg}\cdot\text{mol}^{-1}$) a chloramidu hyaluronanu (0,3 g) připraveného podle postupu 5 ve 100 ml destilované vody byl po homogenizaci hned zamražen při $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ a lyofilizován. DS chloramidu hyluronanu bylo stanoveno pomocí NMR na 75 %.

Příklad 40

Příprava lyofilizátu hydroxyethyl celulóza/ chloramid hyaluronanu

Roztok hydroxyethyl celulózy (0,3 g, Mw 45 $\text{kg}\cdot\text{mol}^{-1}$) a chloramidu hyaluronanu (0,1 g) připraveného podle postupu 5 ve 100 ml destilované vody byl po homogenizaci hned zamražen při $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ a lyofilizován. DS chloramidu hyaluronanu bylo stanoveno pomocí NMR na 25 %.

Příklad 41

Příprava lyofilizátu formyl hyaluronan / chloramid hyaluronanu

- 5 Roztok formyl hyaluronanu (0,3 g, M_w 45 kg.mol⁻¹) připraveného podle příkladu 4 a chloramidu hyaluronanu (0,1 g) připraveného podle příkladu 5, ve 100 ml destilované vody byl po homogenizaci hned zamražen při -50 °C a lyofilizován. DS chloramidu hyaluronanu bylo stanoveno pomocí NMR na 25 %.

10 Příklad 42

Příprava lyofilizátu chloramid hyaluronanu síťovaného s CaCl₂

- 15 Do roztoku chloramidu hyaluronanu (0,1 g) připraveného podle postupu 5 ve 100 ml destilované vody bylo přidáno 0,01g CaCl₂.2H₂O a směs se míchala 1 hodinu při 20 °C. Po homogenizaci byl výsledný viskózní roztok zamražen při -50 °C a lyofilizován. DS chloramidu hyaluronanu bylo stanoveno pomocí NMR na 64 %.

Příklad 43

20

Testování antimikrobiální a antifungální aktivity *in vitro* (obrázek 1 a 2):

- Suspenze jednotlivých testovaných mikroorganismů byly připraveny o přibližné koncentraci 10⁵ CFU/ml. Na povrch tryptonsojového agaru v Petriho miskách bylo vyočkováno 100 µl suspenze (přibližný počet mikroorganismů aplikovaných na miskou byl 10⁴ CFU). Suspenze byla
25 rovnoměrně rozetřena po povrchu celé misky sterilní kličkou. Po vsáknutí suspenze do agaru byly na jeho povrch sterilně přeneseny testované vzorky ve formě čtverečků. Misky s testovacími kmeny bakterií byly uloženy ke kultivaci při 37 °C na dobu 24 hodin. Byly testovány lyofilizáty s chloramidem hyaluronanu připravené podle příkladu 25 a samonosné filmy s obsahem
30 chloramidu hyaluronanu připravené podle příkladu 32, přičemž jako kontroly byly použity analogické čtverečky bez obsahu chloramidu hyaluronanu. Byly připraveny čtverečky o hmotnosti 8-12 mg a přibližných rozměrech 15 mm x 15 mm. Pro testování účinnosti byla zvolena difúzní plotnová metoda (2D uspořádání). Ke kultivaci byla použita neselektivní půda (trypton-sojový agar). Vzorky čtverečků byly testovány na mikroorganismech – *Bacillus subtilis*,
35 *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida Albicans* (plíseň), *Pseudomona aeruginosa*, *Staphylococcus epidermis*. Z Obrázků 1 a 2 je patrná výrazně vyšší inhibice růstu bakterií u kompozic podle vynálezu s obsahem chloramidu hyaluronanu ve srovnání s kontrolou bez chloramidu hyaluronanu.

40 Příklad 44

Testování antivirální aktivity jako test redukce plaků:

- 45 Počet opakování – 5, testovaná látka připravena podle příkladu 19, testovaný vir CVB3 (Nancy) v koncentraci 3x10E7, 5 PFU/ml, buňkový substrát VERO

Postup:

- 50 Na buňkový substrát na Petriho miskách byl po dobu 30 minut adsorbován vir naředěný 10⁷ krát v objemu 1,5 mL, v negativních kontrolách bylo použito PBS bez viru. Vir byl odsát a buňky provrstveny testovanou látkou (případně HA a PBS v negativních kontrolách), inkubace 5 hodin při 37 °C a 5 % CO₂. Buňky byly opláchnuty PBS a převrstveny médiem EMEM s 5 % inaktivovaného FBS a 0,75 % agarózy. Inkubace 4 dny 37 °C a 5 % CO₂. Médium bylo odstraněno a buňky barveny krystalovou violetí, pak byly spočítány plaky. Antivirová aktivita je
55 v testu úměrná redukci počtu plaků.

popis skupiny	inkubace s testovanou látkou	PFU na PM					průměr	SD
kontrola buněk s PBS	PBS	0	0	0	0	0	0	0
kontrola buněk s HA	HA 1 % v PBS	0	0	0	0	0	0	0
kontrola toxicity	Chloramid HA 1 % v PBS	0	0	0	0	0	0	0
kontrola viru s PBS	PBS	13	9	7	14	10	10,6	2,88
kontrola viru s HA	HA 1 % v PBS	10	6	14	12	10	10,4	2,97
test 1	Chloramid HA 0,1 % v PBS	5	7	10	8	9	7,8	1,92
test 2	Chloramid HA 0,5 % v PBS	8	5	8	7	8	7,2	1,3
test 3	Chloramid HA 1 % v PBS	4	1	2	3	3	2,6	1,14

5 FBS - fetální bovinní sérum, VERO - stabilizovaná buňková linie derivovaná z ledviny Cercopithecus aethiops, EMEM - Eaglovo minimální esenciální médium, $3 \times 10^7,5$ PFU/ml je koncentrace viru použitého na přípravu infekční suspenze - 3×10 na 7,5 plak tvořících jednotek na ml, PFU/ml je jednotka množství viru, kde PFU jsou plak tvořící jednotky, PM - Petriho miska, SD – směrodatná odchylka.

10 Z výsledků je patrné, že přítomnost chloramidu hyaluronanu inhibuje růst virů (test 1, 2 a 3) v porovnání se standardem „kontrola virů s HA“, přičemž vyšší koncentrace chloramidu inhibuje intenzivněji.

15 PATENTOVÉ NÁROKY

1. Chlorovaný derivát kyseliny hyaluronové nebo modifikované kyseliny hyaluronové nazývaný chloramid, který má vodík amidické skupiny -NH-CO- substituovaný atomem chloru podle strukturního vzorce -NCl-CO-, přičemž stupeň substituce je 50 až 100 %, a přičemž modifikovaná kyselina hyaluronová je kyselina hyaluronová, která má -OH skupiny z části nahrazeny skupinou -O-CO-R² a/nebo -CH₂-OH skupiny z části nahrazeny skupinou -CH=O a/nebo -CO-OH skupiny z části nahrazeny skupinou -CO-OR², kde R² je lineární řetězec s obsahem uhlíků C₁ – C₁₇ nebo aromatický řetězec s maximálním obsahem uhlíků C₁₇.

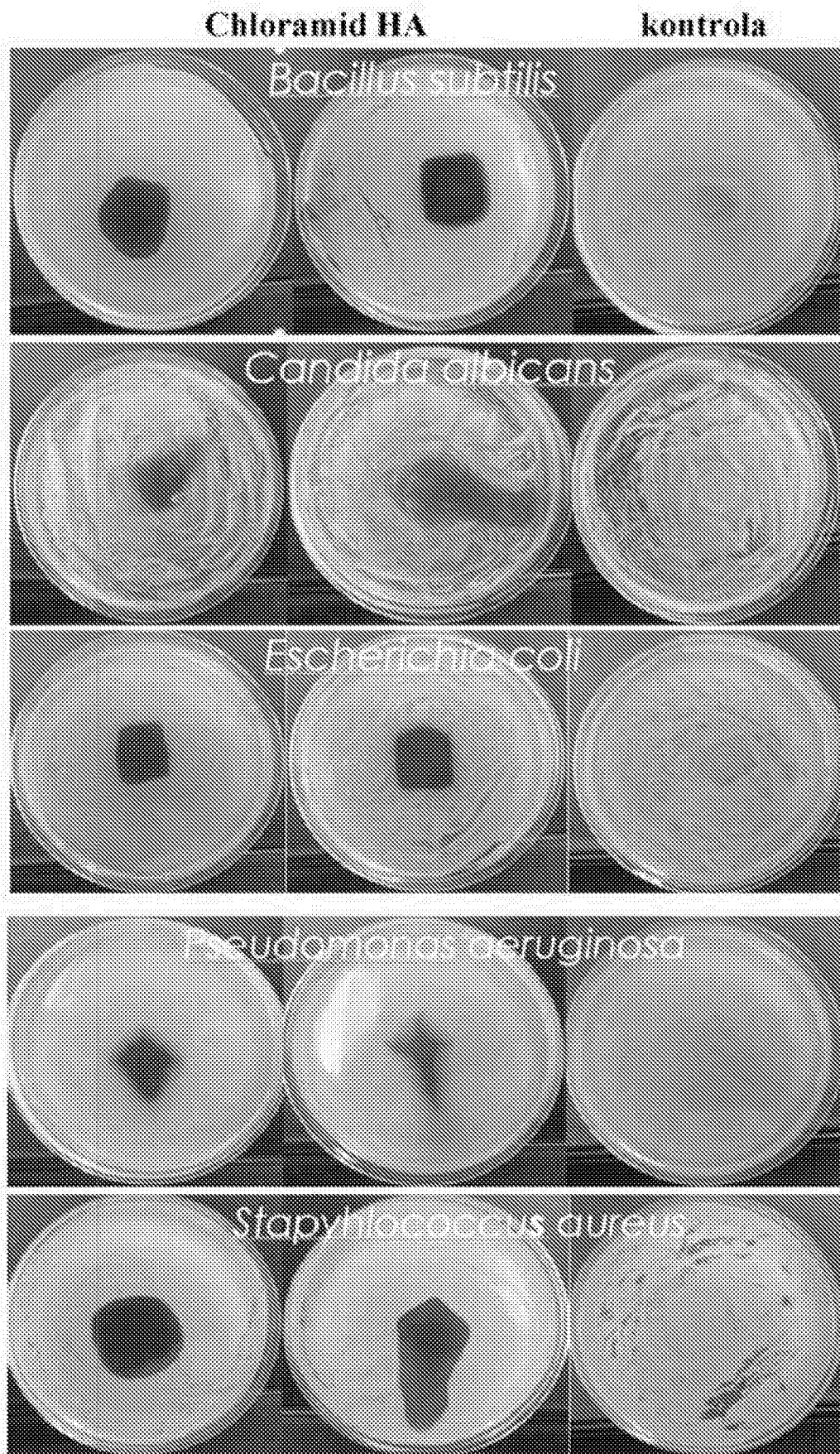
2. Chlorovaný derivát podle nároku 1, kde modifikovaná kyselina hyaluronová je vybrána ze skupiny zahrnující ethylester, benzyl ester, formyl, lauroyl (C12), palmitoyl (C16), kaproyl (C6).

3. Chlorovaný derivát podle kteréhokoli z nároků 1 až 2, kde jeho molekulová hmotnost je v rozmezí 5 až 500 kg.mol⁻¹.

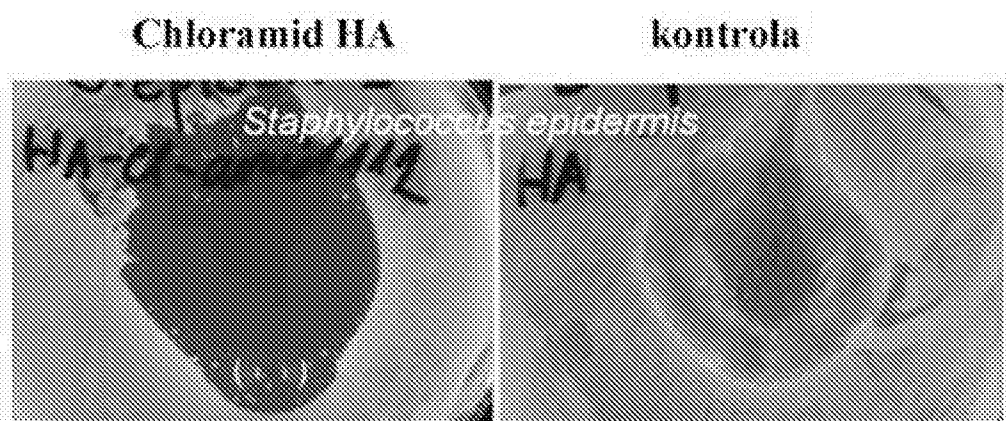
4. Způsob přípravy chloramidu hyaluronanu nebo chloramidu modifikované kyseliny hyaluronové definovaného v kterémkoli z nároků 1 až 3, **vyznačující se tím**, že se připraví vodný roztok výchozí kyseliny hyaluronové nebo jejího modifikovaného derivátu o molekulové

- hmotnosti v rozmezí 40 až 2200 kg.mol⁻¹, jehož koncentrace je v rozmezí 0,5 až 5 % hmotn., upraví se pH na rozmezí 2,5 až 7,5 a pak se přidá kyselina trichlorisokyanurová nebo sodná sůl kyseliny dichlorisokyanurové v množství 0,3 až 1,5 ekvivalentů na disacharid hyaluronanu a směs se nechá reagovat 5 až 72 hodin při teplotě 5 až 40 °C, načež se vzniklý chloramid izoluje vysrážením.
5. Způsob přípravy podle nároku 4, **vyznačující se tím**, že se pH upraví na rozmezí 4 až 6.
6. Způsob přípravy podle nároku 4, **vyznačující se tím**, že úprava pH se provede přidáním kyseliny octové v množství 0,2 až 7 ekvivalentů na disacharid hyaluronanu.
7. Antimikrobiální, antifungální a antivirová kompozice, **vyznačující se tím**, že obsahuje derivát definovaný v kterémkoli z nároků 1 až 3 v koncentraci 10 až 99 % hmotn. a aditivum vybrané ze skupiny zahrnující vodu, chlorid sodný, chlorid vápenatý, glycerol, kyselinu hyaluronovou, chondroitin sulfát, alginát sodný, oxycelulózu, karboxymethylcelulózu, hydroxyethylcelulózu nebo modifikovanou kyselinu hyaluronovou, která má -OH skupiny z části nahrazeny skupinou -O-CO-R² a/nebo -CH₂-OH skupiny z části nahrazeny skupinou -CH=O a/nebo -CO-OH skupiny z části nahrazeny skupinou -CO-OR², kde R² je lineární řetězec s obsahem uhlíků C₁ – C₁₇ nebo aromatický řetězec s maximálním obsahem uhlíků C₁₇.
8. Kompozice podle nároku 7, **vyznačující se tím**, že je ve formě roztoku nebo gelu ve vodném rozpouštědle.
9. Kompozice podle nároku 7, **vyznačující se tím**, že je ve formě pevného substrátu vybraného ze skupiny zahrnující samonosný film, lyofilizát, vrstvu ze staplových vláken - netkanou textilii, nekonečné vlákno, tkaninu, pleteninu, splétanou textilii nebo vrstvu nanovláken.
10. Použití chlorovaného derivátu definovaného v kterémkoli z nároků 1 až 3 pro přípravu krytů ran nebo pro přípravu implantabilních zdravotnických prostředků.
11. Použití kompozice definované v nárocích 7 až 9 pro přípravu krytů ran nebo pro přípravu implantabilních zdravotnických prostředků.

3 výkresy



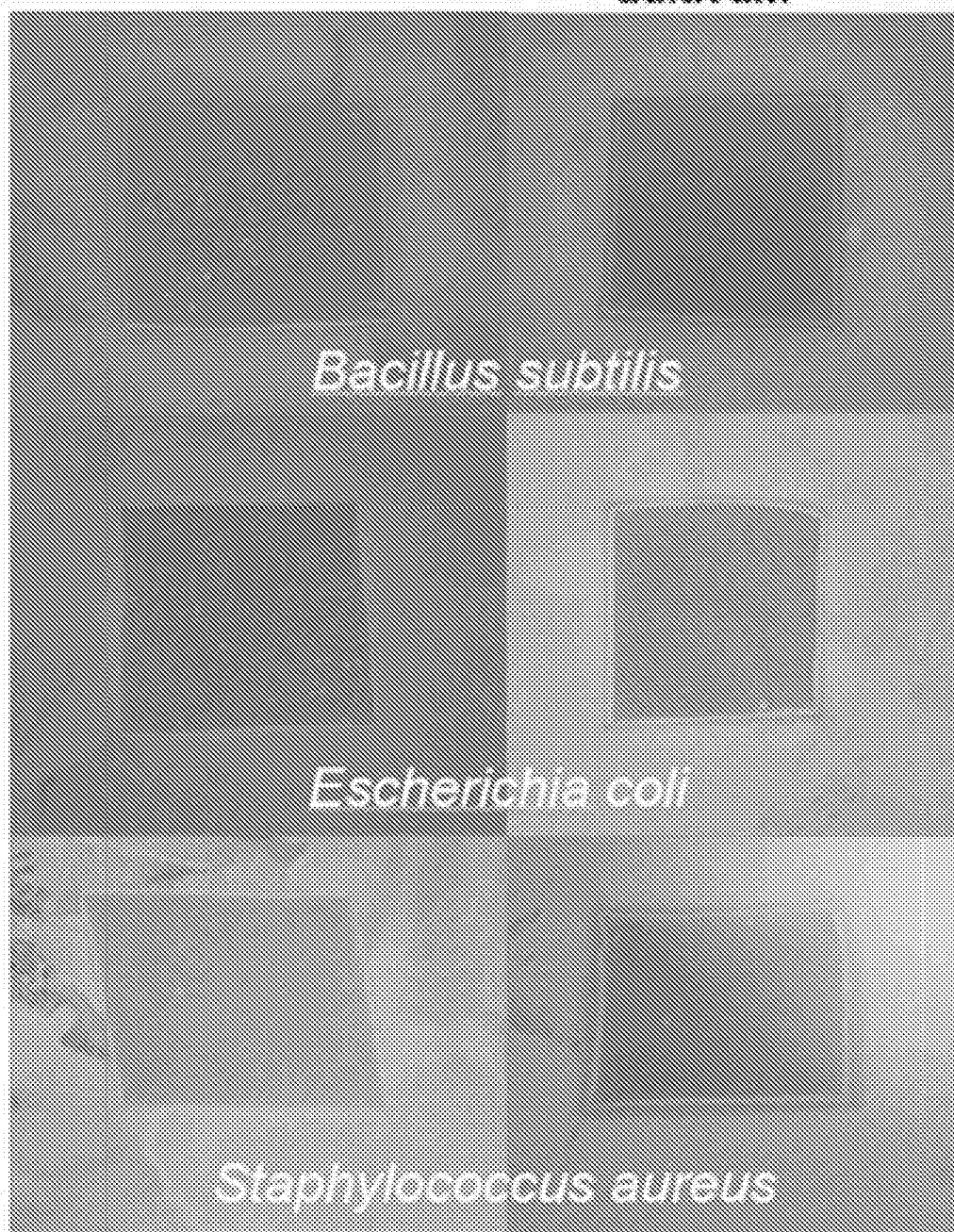
Obr. 1A



Obr. 1B

kontrola

Chloramid HA
+ aditivum



Obr. 2