

UŽITNÝ VZOR

(11) Číslo dokumentu:

33 324

(13) Druh dokumentu: **U1**

(51) Int. Cl.:

C08B 37/08 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2019-36602**
(22) Přihlášeno: **06.09.2019**
(47) Zapsáno: **25.10.2019**

(73) Majitel:
Contipro a.s., Dolní Dobrouč, CZ

(72) Původce:
Ing. Evgeniy Toropitsyn, Praha 10, Michle, CZ
PharmDr. Martin Pravda, PhD, Sruby, CZ
Ing. Lenka Kovářová, Frýdek-Místek, Frýdek, CZ
Ing. Julie Bystroňová, Karviná, Nové Město, CZ
doc. RNDr. Vladimír Velebný, CSc., Žamberk, CZ

(74) Zástupce:
Kania, Sedlák, Smola s.r.o., Mendlovo náměstí
907/1a, 603 00 Brno, Staré Brno

(54) Název užitého vzoru:
**Hydrogel na bázi zesítěného
hydroxyfenylového derivátu kyseliny
hyaluronové**

CZ 33324 U1

Hydrogel na bázi zesíťovaného hydroxyfenylového derivátu kyseliny hyaluronové

Oblast techniky

5

Technické řešení se týká hydro gelu na bázi zesíťovaného hydroxyfenylového derivátu kyseliny hyaluronové ve směsi s chondroitin sulfátem se zlepšenou mírou degradace.

Dosavadní stav techniky

Kyselina hyaluronová (též hyaluronan, HA) je polysacharid ze skupiny glykosaminoglykanů, který se skládá z disacharidických jednotek složených z D-glukuronové kyseliny a N-acetyl-D-glukosaminu. Jedná se o polysacharid, který je snadno rozpustný ve vodném prostředí, kde v závislosti na molekulové hmotnosti a koncentraci vytváří viskózní roztoky až viskoelastické hydrogely. HA je přirozenou složkou mezibuněčné hmoty tkání. Vazbou na specifické povrchové buněčné receptory je molekula hyaluronanu schopna interagovat s buňkami ve svém okolí a regulovat jejich metabolické procesy (Xu, Jha et al. 2012). Z těchto důvodů jsou materiály obsahující hyaluronan případně jeho deriváty často využívány pro výrobu přípravků používaných v biomedicínských aplikacích. Hydrogely na bázi hyaluronanu v organismu podstupují přirozenou degradaci působením specifických enzymů (hyaluronidáz), popř. působením reaktivních forem kyslíku (ROS), díky čemuž dochází po jejich implantaci do organismu k jejich postupnému vstřebání (Stem, Kogan et al. 2007).

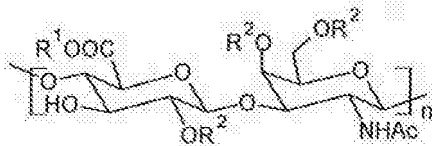
Pro dosažení mechanicky odolnějších materiálů a z důvodu zpomalení jejich biodegradace byla vyvinuta řada typů hydrogelů obsahujících kovalentně zesíťený hyaluronan. Takové hydrogely jsou využívány jako materiály pro viskosuplementaci synoviální tekutiny, augmentaci měkkých tkání, slouží jako podpůrné struktury pro kultivaci a implantaci buněk apod. (Tognana, Borrione et al. 2007, Buck II, Alam et al. 2009, Li, Raitcheva et al. 2012, Salwowska, Bebenek et al. 2016).

V minulosti byly rovněž vyvinuty různé typy derivátů hyaluronanu, které jsou schopny podstupovat přechod sol-gel za fyziologických podmínek *in situ* (Burdick and Prestwich 2011, Prestwich 2011). Pro tyto účely lze využít např. fenolické deriváty hyaluronanu. Calabro *et al.* (Calabro, Akst et al. 2008, Lee, Chung et al. 2008, Kurisawa, Lee et al. 2009) popisují ve spisech EP1587945B1 a EP1773943B1 postup přípravy fenolických derivátů hyaluronanu reakcí karboxylů přítomných ve struktuře D-glukuronové kyseliny hyaluronanu, s aminoalkyl-deriváty fenolu např. tyraminem. Produktem této reakce jsou amidy hyaluronanu (Darr and Calabro 2009).

Zesíťení fenolických derivátů hyaluronanu může být iniciováno přidávkem peroxidázy (např. křenové peroxidázy) a zředěného roztoku peroxidu vodíku. Křenová peroxidáza (Horseradish peroxidase, HRP, E.C. 1.11.1.7) je v současné době využívána jako katalyzátor organických a biotransformačních reakcí (Akkara, Senecal et al. 1991, Higashimura and Kobayashi 2002, Ghan, Shutava et al. 2004, Shutava, Zheng et al. 2004, Veitch 2004). Hydrogely na bázi hydroxyfenylových derivátů hyaluronanu mohou být využívány jako injekčně aplikovatelné matrice pro řízené uvolňování biologicky aktivních látek nebo jako materiály vhodné pro kultivaci a implantaci buněk (Kurisawa, Lee et al. 2010). Wolfová *et al.* popisují ve spisu CZ303879 konjugát hyaluronanu a tyraminu obsahující alifatický linker vložený mezi řetězec polymeru a tyramin. Přítomnost alifatického linkeru umožňuje vyšší efektivitu síťovací reakce a dodává síti vyšší elasticitu.

Chondroitin sulfát (ChS) je dalším zástupcem glykosaminoglykanů, který je často využíván pro přípravu materiálů určených pro využití v léčbě degenerativních chorob, např. osteoartrózy (OA). Řetězec ChS je tvořen disacharidickými jednotkami složenými z N-acetylgalaktosaminu (GalNAc)

a kyseliny iduronové (IdoA). Disacharidické jednotky ChS mohou být sulfatovány v poloze 4 a 6 GalNAc a popřípadě i v poloze 2 IdoA. Chondroitin sulfát je lineární, sulfatovaný a negativně-nabitý glykosaminoglykan složený z opakujících se monomerních jednotek *N*-acetyl-D-galaktosaminu a D-glukuronové kyseliny vzájemně propojených $\beta(1\rightarrow3)$ a $\beta(1\rightarrow4)$ *O*-glykosidickými vazbami (strukturní vzorec chondroitin sulfátu viz níže).



kde

- 10 R^1 je H nebo Na,
 R^2 je H, O-SO₂-OH nebo O-SO₂-ONa

Zdrojem chondroitin sulfátu jsou živočišné pojivové tkáně, kde se váže na proteiny a tvoří tak součást proteoglykanů. Sulfatace chondroitinu se uskutečňuje pomocí sulfotransferáz v různých polohách a různém zastoupení. Jedinečný vzorec sulfatace jednotlivých poloh v polymerním řetězci kóduje specifickou biologickou aktivitu chondroitin sulfátu. Ten je důležitým stavebním blokem chrupavky v kloubech, kterým dodává odolnost v tlaku a obnovuje rovnováhu ve složení kloubového maziva (Bacurle S. A., Kiselev M. G., Makarova E. S., Nogovitsin E. A. 2009. *Polymer* 50: 1805). Chondroitin sulfát se společně s glukosaminem používá jako výživový doplněk na léčení, nebo také prevenci vzniku osteoartrity u lidí (např. Flexor®, Advance Nutraceuticals, Ltd.) nebo u zvířat (např. Geloren^{dog}®, Contipro Pharma, Ltd.). Z farmaceutického hlediska se chondroitin sulfát považuje za léčivo se zpožděným nástupem účinku tlumení bolesti při degenerativním onemocnění kloubů (Aubry-Rozier B. 2012. *Revue Médicale Suisse* 14: 571).

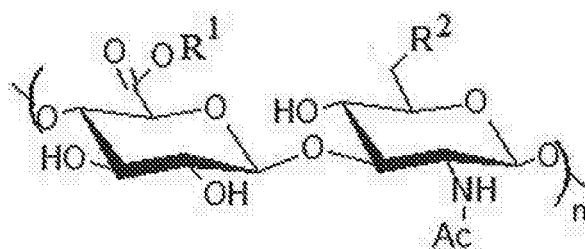
25 *In vitro* a *in vivo* studie ukázaly, že ChS inhibuje účinek hyaluronidáz. Inhibiční účinek ChS na enzymy je způsoben tvorbou elektrostatických (iontových) interakcí. Také bylo prokázáno, že ChS je schopen zachycovat ROS a tím chránit před degradací složky extracelulární matrix (Bali, Cousse et al. 2001, Xiong and Jin 2007).

30 Využití kombinace hyaluronanu a chondroitin sulfátu pro přípravu prostředku pro ochranu lidských či živočišných buněk a tkání před traumatizací popisuje dokument EP0136782 (1983). Obdobně dokument US6051560 (1992) popisuje využití směsi hyaluronanu a chondroitin sulfátu jako viskosupplementačních materiálů během oftalmologických zákroků. Patent WO030417024 popisuje viskózní kompozici obsahující terapeuticky účinné množství směsi ChS a HA pro výrobu léčiv určených pro léčbu kloubů lidí s poškozením chrupavky způsobeným chondromalacií nebo OA stupně I a II, která využívá intraartikulární podání směsi. V patentové literatuře rovněž nalezneme dokumenty, které popisují prostředek pro parenterální podání vhodný pro prevenci a léčbu poškození kloubní chrupavky u lidí či zvířat, který se skládá z terapeuticky účinného množství chondroitin sulfátu, hyaluronanu a glukosaminu (WO2004034980, 2002). Dokument EP2219595 popisuje formulaci na bázi polysacharidů, zejména glykosaminoglykanů, a jejich směsi s flavonoidy, která tvoří hydrogely s prodlouženou dobou biodegradace. Zmíněný dokument popisuje i hydrogel obsahující hyaluronan, derivát hyaluronanu zesíťovaný butanediol 1,4-diglycidyl etherem a ChS, který vykazuje zvýšenou odolnost vůči degradaci působením enzymu hyaluronidázy.

Podstata technického řešení

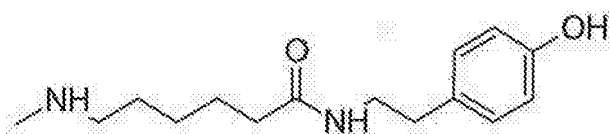
50 Technické řešení se týká hydrogelu na bázi zesíťovaného hydroxyfenylového derivátu kyseliny hyaluronové, jehož podstatou je, že obsahuje molekuly hydroxyfenylového derivátu hyaluronové

kyseliny (HA-TA) nebo jeho farmaceuticky přijatelnou sůl podle obecného vzorce I



(I),

- 5 kde n je v rozmezí 2 až 7500 a kde R^1 je H^+ nebo iont alkalické soli nebo soli alkalických zemin a R^2 je OH nebo tyraminový substituent podle obecného vzorce II:



(II),

- 10 přičemž v rámci jedné molekuly hydroxyfenylového derivátu hyaluronové kyseliny nebo jeho farmaceuticky přijatelné soli podle obecného vzorce I alespoň jeden R^2 je tyraminový substituent podle obecného vzorce II a přičemž alespoň dva tyraminové substituenty podle obecného vzorce II jsou spojeny prostřednictvím kovalentní vazby v kterékoliv ortho poloze fenylových skupin,

- 15 a dále obsahuje chondroitin sulfát nebo jeho farmaceuticky přijatelnou sůl vybranou ze skupiny obsahující alkalické soli nebo soli alkalických zemin.

- Alkalické soli nebo soli alkalických zemin hydroxyfenylového derivátu hyaluronové kyseliny podle obecného vzorce I nebo chondroitin sulfátu jsou s výhodou vybrány ze skupiny obsahující
20 Na^+ , IC^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} .

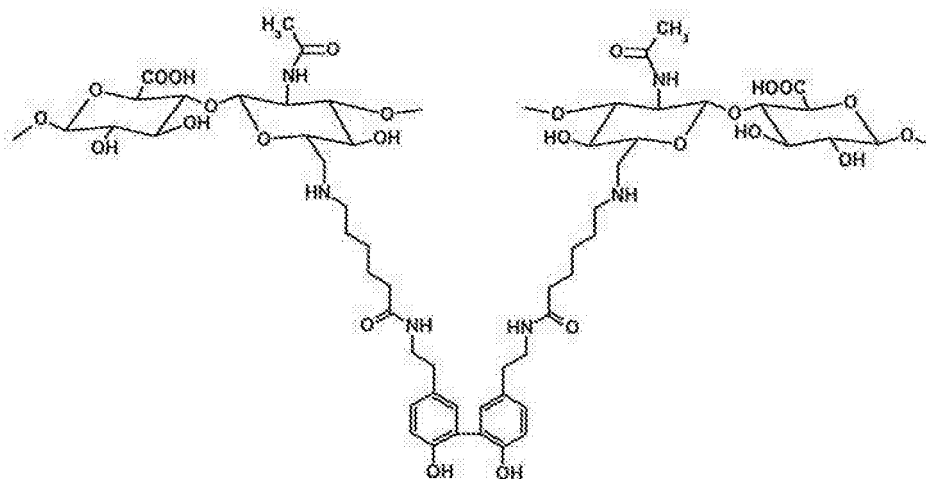
- Koncentrace chondroitin sulfátu nebo jeho farmaceuticky přijatelné soli je v rozsahu 0,5 až 50 mg/ml hydro gelu podle technického řešení, s výhodou v koncentraci 1 až 20 mg/l, výhodněji 5 mg/ml.

- 25 Obsah zesíťovaného hydroxyfenylového derivátu hyaluronanu je v rozsahu 5 až 30 mg/ml, s výhodou 10 mg/ml hydrogelu podle technického řešení.

- Podle dalšího výhodného provedení technického řešení hydrogel dále obsahuje kyselinu
30 hyaluronovou nebo její farmaceuticky přijatelnou sůl v koncentraci 1 až 20 mg/ml, s výhodou 5 až 10 mg/ml, výhodněji 5 mg/ml hydrogelu podle technického řešení.

- Kovalentní vazba může být v rámci jedné molekuly derivátu kyseliny hyaluronové podle obecného vzorce I v kterékoliv ortho poloze fenylových skupin alespoň dvou tyraminových substituentů obecného vzorce II, které se v této molekule nacházejí. Jedná se o takzvané intramolekulární zesíťování. Také může být kovalentní vazba v kterékoliv ortho poloze fenylových skupin alespoň dvou tyraminových substituentů obecného vzorce II, které se nacházejí v různých molekulách derivátu kyseliny hyaluronové podle obecného vzorce I. To představuje vzájemně propojenou síť mezi molekulami derivátu HA.

- 40 Příklad kovalentně zesíťovaného hydroxyfenylového derivátu hyaluronanu. (crossHA-TA) je schématicky ukázán níže viz vzorec III:



(III)

Takové hydrogely podle technického řešení vykazují zvýšenou odolnost vůči biodegradacím pochodům vznikajícím působením hydrolytických enzymů a reaktivních forem kyslíku.

Podle výhodného provedení je střední molekulová (M_w) hydroxyfenylového derivátu hyaluronanu podle obecného vzorce I v rozsahu 5×10^4 až $1,5 \times 10^6$ g.mol⁻¹, s výhodou $2,5 \times 10^5$ až 1×10^6 g.mol⁻¹, výhodněji 8×10^5 g.mol⁻¹. PI je v rozsahu 1 až 3.

Podle dalšího provedení vynálezu je stupeň substituce (DS) hydroxyfenylového derivátu hyaluronanu obecného vzorce I v rozsahu 0,5 až 10%, s výhodou 1 až 4%, výhodněji 1%.

Podle dalšího výhodného provedení je M_w chondroitin sulfátu rozsahu 5×10^3 až 95×10^3 g.mol⁻¹, dále výhodně 10×10^3 až 40×10^3 g.mol⁻¹.

Podle výhodného provedení hydro gel obsahuje hyaluronan (HA) nebo jeho farmaceuticky přijatelnou sůl o M_w v rozsahu 5×10^4 až $2,5 \times 10^6$ g.mol⁻¹, s výhodou $1,5 \times 10^6$ až $2,5 \times 10^6$ g.mol⁻¹, výhodněji $2,0 \times 10^6$ g.mol⁻¹.

Takové hydrogely podle technického řešení mohou být použity v kosmetice, medicíně a regenerativní medicíně, zejména pro přípravu materiálů pro regeneraci tkáně, augmentace tkáně, přípravu scaffoldů pro tkáňové inženýrství, jako matrice pro řízené uvolňování biologicky aktivních látek a léčiv a viskosuplementaci synoviální tekutiny.

Stručný popis obrázků

Obr. 1: Porovnání rychlosti degradace roztoků HA s přídavkem ChS pomocí ROS

Obr. 2: Porovnání rychlosti degradace materiálů pomocí ROS

Obr. 3: Kumulativní degradace hydrogelu [%] BTH 30 U/mg

Příklady provedení technického řešení

DS = stupeň substituce = $100 \% \cdot \text{molární množství modifikovaných disacharidických jednotek hyaluronanu} / \text{molární množství všech disacharidických jednotek derivátu hyaluronanu}$. Stupeň substituce byl stanoven pomocí ¹H NMR spektroskopii.

Hmotnostně střední molární hmotnost (M_w) a index polydisperzity (PI) byly stanoveny metodou SEC-MALLS.

- 5 Infračervená spektra připravených derivátů byla získána metodou FT-IR.

Byl použit chondroitin sulfát ve farmaceutické kvalitě pro injekční podání od Bioiberica, ES.

10 Příklad 1

Syntéza tyraminovaného derivátu HA (HA-TA)

Syntéza 6-amino-*N*-[2(4hydroxyfenyl)ethyl]hexanamidu

15

6-[(*tert.* butoxykarbonyl)amino]hexanová kyselina (1,00 g, 4,3 mmol) byla rozpuštěna v 50 ml tetrahydrofuranu (THF). K roztoku kyseliny byl přidán 1,1'karbodiimidazol (0,70 g, 4,3 mmol). Směs byla zahřívána na 50 °C po dobu šedesáti minut. Poté byla reakční nádoba promyta inertním plynem. K reakční směsi byl přidán tyramin (0,59 g, 4,3 mmol). Směs byla dále zahřívána další 2 hodiny. Poté byl destilací za sníženého tlaku odstraněn THF. Odparek byl rozpuštěn v 50 ml ethylacetátu. Roztok byl promyt 150 ml čištěné vody (rozděleno do tří dílů). Organická vrstva byla vysušena nad molekulovým sítem. Ethylacetát byl odstraněn destilací za sníženého tlaku. Odparek byl rozpuštěn v 50 ml MeOH a k roztoku byly přidány 2 ml trifluoroctové kyseliny (TFA). Roztok byl zahříván 6 hodin pod zpětným chladičem. Rozpouštědlo bylo odstraněno destilací za sníženého tlaku. Odparek byl rozpuštěn v 50 ml ethylacetátu. Roztok byl promyt 150 ml čištěné vody (rozděleno do tří dílů). Organická vrstva byla vysušena nad molekulovým sítem. Ethylacetát byl odstraněn destilací za sníženého tlaku, $m = 0,75$ g (70 % teorie)

30 ^1H NMR (D_2O , ppm) δ : 1,17 (m, 2 H, γ -CH₂-hexanové kyseliny); 1,48(m, 2 H, β -CH₂-hexanové kyseliny); 1,58 (m, 2 H, δ -CH₂-hexanové kyseliny); 2,17 (t, 2 H, -CH₂-CO-); 2,73 (m, 2 H, -CH₂-Ph); 2,91 (m, 2 H, -CH₂-NH₂); 3,42 (m, 2 H, -CH₂-NH-CO-); 6,83 (d, 2 H, arom); 7,13 (d, 2 H, arom).

35 ^{13}C NMR(D_2O , ppm) δ : 24 (γ -C-hexanové kyseliny); 26 (δ -C-hexanové kyseliny); 33 (β -C-hexanové kyseliny); 35 (-C-CO-); 39 (-C-NH₂); 40 (C-Ph); 63 (-C-NH-CO-); 115 (C3 arom); 126 (Cl arom); 130 (C2 arom.); 153 (C4 arom); 176 (-CO-).

40 Příprava aldehydického derivátu (HA-CHO)

Hylaaronan (10,00 g, $M_w = 2 \times 10^6$ g.mol⁻¹) byl rozpuštěn v 750 ml 2,5% (w/w) roztoku Na₂HPO₄ · 12 H₂O. Roztok byl vychlazen na 5 °C. K vzniklému roztoku bylo přidáno 2,60 g NaBr a 0,05 g 4-acetamido-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxylu. Po důkladné homogenizaci roztoku byly k reakční směsi přidány 3 ml roztoku NaClO (10-15 % dostupného Cl₂). Reakce pokračovala za stálého míchání 15 min. Reakce byla ukončena přidávkem 100 ml 40% roztoku propan-2-olu. Produkt byl přečištěn ultrafiltrací a izolován precipitací propan-2-olem.

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

^1H NMR (D_2O) δ : 2,01 (s, 3 H, CH₃-), 3,37 - 3,93 (m, skelet hyaluronanu), 4,46 (s, 1H, anomer), 4,54 (s, 1H anomer., -O-CH(OH)-), 5,27 (geminální glykol -CH-(OH)₂).

- 55 a) Příprava tyraminovaného derivátu HA s C₆ spacerem ($M_w \approx 3 \times 10^5$ g.mol⁻¹, DS ≈ 2 %)

Aldehydický derivát HA ($\approx 3 \times 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$, DS = 9 %) (5,00 g) byl rozpuštěn v 500 ml demineralizované vody. Pomocí kyseliny octové bylo pH roztoku upraveno na 3. K roztoku HA-CHO byl přidán 6-amino-*N*-[2-(4-hydroxyfenyl)ethyl]hexanamid (meziprodukt (I)) (1,25 g, 5 mmol). Směs byla míchána 2 hodiny při laboratorní teplotě. Poté byl do reakční směsi přidán
 5 komplex pikolin-boran (0,270 g, 2,5 mmol). Směs byla míchána dalších 12 hodin při laboratorní teplotě. Produkt byl přečištěn ultrafiltrací a izolován z retentátu precipitací propan-2-olem. Precipitát byl zbaven vlhkosti a zbytkového propan-2-olu sušením v horkovzdušné sušárně (40 °C, 3 dny).

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

^1H NMR (D_2O) δ : 1,25 (t, 2 H, γ - CH_2 - aminohexanové kyseliny), 1,48 (m, 2 H, δ - CH_2 -aminohexanové kyseliny) 1,51 (m, 2 H, β - CH_2 - aminohexanové kyseliny), 2,01 (s, 3 H, CH_3 -),
 15 2,65 (m, 2H, Ph- CH_2 -), 2,73 (m, 2H, ε - CH_2 - aminohexanové kyseliny), 3,37 - 3,93 (m, skelet hyaluronanu), 4,46 (s, 1H, anomer), 4,54 (s, 1H anomer., -O-CH(OH)-), 6,59 (d, 2H, arom.), 7,01 (d, 2H. arom).

SEC MALLS: M_w - $2,78 \times 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$
 20 DS (^1H NMR): 2,1 %

b) Příprava tyraminovaného derivátu HA s C_6 spacerem ($M_w \approx 8 \times 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$, DS ≈ 1 %) Aldehydický derivát HA ($M_w \approx 8 \times 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$, DS ≈ 5 %) (5,00 g) byl rozpuštěn v 500 ml demineralizované vody. Pomocí kyseliny octové bylo pH roztoku upraveno na 3. K roztoku HA-CHO byl přidán 6-amino-*N*-[2-(4-hydroxyfenyl)ethyl]hexanamid (meziprodukt (I)) (0,625 g, 2,5 mmol). Směs byla míchána 2 hodiny při laboratorní teplotě. Poté byl do reakční směsi přidán
 25 komplex pikolin-boran (0,270 g, 2,5 mmol). Směs byla míchána dalších 12 hodin při laboratorní teplotě. Produkt byl přečištěn ultrafiltrací a izolován z retentátu precipitací propan-2-olem. Precipitát byl zbaven vlhkosti a zbytkového propan-2-olu sušením v horkovzdušné sušárně (40 °C, 3 dny).

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

35 ^1H NMR (D_2O) δ : 1,25 (t, 2 H, γ - CH_2 - aminohexanové kyseliny), 1,48 (m, 2 H, δ - CH_2 -aminohexanové kyseliny) 1,51 (m, 2 H, β - CH_2 - aminohexanové kyseliny), 2,01 (s, 3 H, CH_3 -), 2,65 (m, 2H, Ph- CH_2 -), 2,73 (m, 2H, ε - CH_2 - aminohexanové kyseliny), 3,37 - 3,93 (m, skelet hyaluronanu), 4,46 (s, 1H, anomer), 4,54 (s, 1H anomer., -O-CH(OH)-), 6,59 (d, 2H, arom.), 7,01 (d, 2H. arom).

40 SEC MALLS: $M_w = 8,09 \times 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$
 PS (^1H NMR): 1,1 %

c) Příprava tyraminovaného derivátu HA s C_6 spacerem ($M_w \approx 1,5 \times 10^6 \text{ g.mol}^{-1}$. DS $\approx 0,5$ %) Aldehydický derivát HA ($M_w \approx 1,5 \times 10^6 \text{ g.mol}^{-1}$, DS $\approx 0,5$ %) (5,00 g) byl rozpuštěn v 500 ml demineralizované vody. Pomocí kyseliny octové bylo pH roztoku upraveno na 3. K roztoku HA-CHO byl přidán 6-amino-*N*-[2-(4-hydroxyfenyl)ethyl]hexanamid (meziprodukt (I)) (0,625 g, 2,5 mmol). Směs byla míchána 2 hodiny při laboratorní teplotě. Poté byl do reakční směsi přidán
 45 komplex pikolin-boran (0,270 g, 2,5 mmol). Směs byla míchána dalších 12 hodin při laboratorní teplotě. Produkt byl přečištěn ultrafiltrací a izolován z retentátu precipitací propan-2-olem. Precipitát byl zbaven vlhkosti a zbytkového propan-2-olu sušením v horkovzdušné sušárně (40 °C, 3 dny).

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

55

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

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

DS (^1H NMR): 0,5 %

d) Příprava tyraminovaného derivátu HA s C_6 spacerem ($M_w \approx 5 \times 10^4 \text{ g.mol}^{-1}$, DS ≈ 10 %) Aldehydický derivát HA ($M_w \approx 5 \times 10^4 \text{ g.mol}^{-1}$, DS ≈ 10 %) (5,00 g) byl rozpuštěn v 500 ml demineralizované vody. Pomocí kyseliny octové bylo pH roztoku upraveno na 3. K roztoku HA-CHO byl přidán 6-amino-*N*-[2-(4-hydroxyfenyl)ethyl]hexanamid (meziprodukt (I)) (0,625 g, 2,5 mmol). Směs byla míchána 2 hodiny při laboratorní teplotě. Poté byl do reakční směsi přidán komplex pikolin-boran (0,270 g, 2,5 mmol). Směs byla míchána dalších 12 hodin při laboratorní teplotě. Produkt byl přečištěn ultrafiltrací a izolován z retentátu precipitací propan-2-olem. Precipitát byl zbaven vlhkosti a zbytkového propan-2-olu sušením v horkovzdušné sušárně (40 °C, 3 dny).

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

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

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

DS (^1H NMR): 10%

Příklad 2

Příprava hydrogelů na bázi hydroxyfenylového derivátu HA-TA o koncentraci 20 mg/ml

Hydrogely byly připraveny smícháním dvou prekurzorových roztoků A a B, pro jejichž přípravu byl použit vodný roztok NaCl (9 g/l). Pro přípravu prekurzorových roztoků byl použit hydroxyfenylový derivát HA-TA o $M_w = 2,78 \times 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$ a DS 2,1%. Složení roztoků je uvedeno v následující tabulce (Tabulka 1).

Roztok A		Roztok B	
HRP.....	0,48 U/ml	H_2O_2	2,0 mmol/l
HA-TA	20 mg/ml	HA-TA	20 mg/ml
NaCl.....	9 g/l	NaCl	9 g/l

Tabulka 1: Složení prekurzorových roztoků pro přípravu hydrogelů na bázi hydroxyfenylového derivátu HA-TA o koncentraci 20 mg/ml

Smícháním roztoku A a roztoku B v poměru 1:1 byly připraveny hydrogely s finálním složením, uvedeným v následující tabulce (Tabulka 2), kde crossHA-TA je kovalentně zesítěným hydroxyfenylovým derivátem hyaluronanu.

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

Tabulka 2: Finální složení hydrogelů na bázi hydroxyfenylového derivátu HA-TA o koncentraci 20 mg/ml

5 Příklad 3

Příprava hydrogelů, obsahující ChS o koncentraci 0,5 mg/ml

- 10 Hydrogely byly připraveny smícháním dvou prekurzorových roztoků A a B, pro jejichž přípravu byl použit vodný roztok NaCl (9 g/l). Pro přípravu prekurzorových roztoků byl použit hydroxyfenylový derivát HA-TA o $M_w = 2,78 \times 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$ a DS 2,1% a ChS o $M_w = 10 \times 10^3 - 40 \times 10^3 \text{ g.mol}^{-1}$. Složení roztoků je uvedeno v následující tabulce (Tabulka 3).

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

- 15 Tabulka 3: Složení prekurzorových roztoků pro přípravu hydrogelu obsahující ChS o koncentraci 0,5 mg/ml

- 20 Smícháním roztoku A a roztoku B v poměru 1:1 byly připraveny hydrogely s finálním složením, uvedeným v následující tabulce (Tabulka 4), kde crossHA-TA je kovalentně zesítěným hydroxyfenylovým derivátem hyaluronanu.

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

Tabulka 4: Finální složení hydrogelů obsahující ChS o koncentraci 0,5 mg/ml

25 Příklad 4

Příprava hydrogelů, obsahující ChS o koncentraci 3,3 mg/ml

- 30 Hydrogely byly připraveny smícháním dvou prekurzorových roztoků A a B, pro jejichž přípravu byl použit vodný roztok NaCl (9 g/l). Pro přípravu prekurzorových roztoků byl použit hydroxyfenylový derivát HA-TA o $M_w = 2,78 \times 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$ a DS 2,1% a ChS o $M_w = 10 \times 10^3 - 40 \times 10^3 \text{ g.mol}^{-1}$. Složení roztoků je uvedeno v následující tabulce (Tabulka 5).

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

Tabulka 5: Složení prekursorových roztoků pro přípravu hydrogelů obsahující ChS o koncentraci 3,3 mg/ml

Smícháním roztoku A a roztoku B v poměru 1:1 byly připraveny hydrogely s finálním složením, uvedeným v následující tabulce (Tabulka 6), kde crossHA-TA je kovalentně zesítěným hydroxyfenylovým derivátem hyaluronanu.

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

Tabulka 6: Finální složení hydrogelů obsahující ChS o koncentraci 3,3 mg/ml

Příklad 5

Příprava hydrogelů, obsahující ChS o koncentraci 10 mg/ml

Hydrogely byly připraveny smícháním dvou prekursorových roztoků A a B, pro jejichž přípravu byl použit vodný roztok NaCl (9 g/l). Pro přípravu prekursorových roztoků byl použit hydroxyfenylový derivát HA-TA o $M_w = 2,78 \times 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$ a DS 2,1% a ChS o $M_w = 10 \times 10^3 - 40 \times 10^3 \text{ g.mol}^{-1}$. Složení roztoků je uvedeno v následující tabulce (Tabulka 7).

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

Tabulka 7: Složení prekursorových roztoků pro přípravu hydrogelů obsahující ChS o koncentraci 10 mg/ml

Smícháním roztoku A a roztoku B v poměru 1:1 byly připraveny hydrogely s finálním složením, uvedeným v následující tabulce (Tabulka 8), kde crossHA-TA je kovalentně zesítěným hydroxyfenylovým derivátem hyaluronanu.

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

Tabulka 8: Finální složení hydrogelů obsahující ChS o koncentraci 10 mg/ml

Příklad 6

Příprava hydrogelů, obsahující ChS o koncentraci 50 mg/ml

Hydrogely byly připraveny smícháním dvou prekurzorových roztoků A a B, pro jejichž přípravu byl použit vodný roztok NaCl (9 g/l). Pro přípravu prekurzorových roztoků byl použit hydroxyfenylový derivát HA-TA o $M_w = 2,78 \times 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$ a DS 2,1% a ChS o $M_w = 10 \times 10^3 - 40 \times 10^3 \text{ g.mol}^{-1}$. Složení roztoků je uvedeno v následující tabulce (Tabulka 9).

Roztok A	Roztok B
HRP0,48 U/ml	H ₂ O ₂2,0 mmol/l
HA-TA..... 20 mg/ml	HA-TA.....20 mg/ml
ChS 50 mg/ml	ChS 50 mg/ml
NaCl..... 9 g/l	NaCl.....9 g/l

Tabulka 9: Složení prekurzorových roztoků pro přípravu hydrogelů obsahující ChS o koncentraci 50 mg/ml

Smícháním roztoku A a roztoku B v poměru 1:1 byly připraveny hydrogely s finálním složením, uvedeným v následující tabulce (Tabulka 10), kde crossHA-TA je kovalentně zesítěným hydroxyfenylovým derivátem hyaluronanu.

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

Tabulka 10: Finální složení hydrogelů obsahující ChS o koncentraci 50 mg/ml

Příklad 7

Příprava hydrogelů, obsahující HA o koncentraci 5 mg/ml

Příprava hydrogelů, obsahujících nezesítěnou kyselinu hyaluronovou zahrnovala 3 základní

kroky:

1) Příprava hydrogelů obsahujícího zesítěný derivát crossHA-TA

- 5 Hydrogel obsahující zesítěný derivát crossHA-TA byl připraven smícháním dvou prekurzorových roztoků A a B, které byly připraveny rozpuštěním jednotlivých složek ve fosfátem pufovaném fyziologickém roztoku (PBS). Pro přípravu prekurzorových roztoků byl použit hydroxyfenylový derivát HA-TA o $M_w = 8,09 \times 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$ a DS 1,1 %. Složení roztoků je uvedeno v následující tabulce (Tabulka 11).

10

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

Tabulka 11: Složení prekurzorových roztoků pro přípravu zesítěného derivátu crossHA-TA

- 15 Smícháním roztoku A a roztoku B v poměru 1:1 byl připraven hydrogel o složení uvedeném v následující tabulce (Tabulka 12).

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

Tabulka 12: Složení zesítěného derivátu crossHA-TA

- 20 2) Příprava roztoku hyaluronanu

Roztok HA o koncentraci 5 mg/ml byl připraven rozpouštěním nativního hyaluronanu o $M_w 1,91 \times 10^6 \text{ g.mol}^{-1}$ v PBS.

- 25 3) Homogenizace hydrogelu a roztoku hyaluronanu

Finální hydrogel byl připraven smícháním zesítěného derivátu crossHA-TA a roztoku HA v poměru 1:1 s následnou homogenizací směsi. Finální složení materiálu je uvedeno v následující tabulce (Tabulka 13).

30

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

5 Tabulka 13: Finální složení hydrogelu, obsahující HA o koncentraci 5 mg/ml

Příklad 8

10 Příprava hydrogelů, obsahující HA o koncentraci 20 mg/ml

Příprava hydrogelů, obsahujících nezesíťenou kyselinu hyaluronovou zahrnovala 3 základní kroky:

15 1) Příprava hydrogelů obsahujícího zesíťený derivát crossHA-TA

Hydrogel obsahující zesíťený derivát crossHA-TA byl připraven smícháním dvou
prekurzorových roztoků A a B, které byly připraveny rozpuštěním jednotlivých složek ve
fosfátem pufovaném fyziologickém roztoku (PBS). Pro přípravu prekurzorových roztoků byl
20 použit hydroxyfenylový derivát HA-TA o $M_w = 8,09 \times 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$ a DS 1,1 %. Složení roztoků
je uvedeno v následující tabulce (Tabulka 14).

Roztok A	Roztok B
HRP..... 12,8 mU/ml	H ₂ O ₂0,6 mmol/l
HA-TA 20 mg/ml	HA-TA.....20 mg/ml
NaCl.....8 g/l	NaCl.....8 g/l
KCl0,2 g/l	KCl.....0,2 g/l
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O 2,85 g/l	Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O 2,85 g/l
KH ₂ PO ₄ 0,2 g/l	KH ₂ PO ₄ 0,2 g/l

Tabulka 14: Složení prekurzorových roztoků pro přípravu zesíťeného derivátu crossHA-TA

25

Smícháním roztoku A a roztoku B v poměru 1:1 byl připraven hydrogel o složení uvedeném v
následující tabulce (Tabulka 15).

30

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

5

Tabulka 15: Složení zesíťeného derivátu crossHA-TA

2) Příprava roztoku hyaluronanu

- 10 Roztok HA o koncentraci 40 mg/ml byl připraven rozpouštěním nativního hyaluronanu o Mw $1,91 \times 10^6$ g.mol⁻¹ v fosfátovém pufru (PBS).

3) Homogenizace hydrogelu a roztoku hyaluronanu

- 15 Finální hydrogel byl připraven smícháním zesíťeného derivátu crossHA-TA a roztoku HA v poměru 1:1 s následnou homogenizací směsi. Finální složení materiálu je uvedeno v následující tabulce (Tabulka 16).

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

- 20 Tabulka 16: Finální složení hydrogelu, obsahující HA o koncentraci 20 mg/ml

Příklad 9

- 25 Příprava hydrogelů, obsahující HA o koncentraci 5 mg/ml a ChS o koncentraci 5 mg/ml

Příprava hydrogelů, obsahujících nezesíťenou kyselinu hyaluronovou a chondroitin sulfát zahrnovala 3 základní kroky:

- 30 1) Příprava hydrogelů obsahujícího zesíťený derivát crossHA-TA

- Hydrogel obsahující zesítný derivát crossHA-TA byl připraven smícháním dvou prekurzorových roztoků A a B, které byly připraveny rozpuštěním jednotlivých složek ve fosfátem pufrovaném fyziologickém roztoku (PBS). Pro přípravu prekurzorových roztoků byl použit hydroxyfenylový derivát HA-TA o $M_w = 8,09 \times 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$ a DS 1,1 %. Složení roztoků je uvedeno v následující tabulce (Tabulka 17).

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

Tabulka 17: Složení prekurzorových roztoků pro přípravu zesítného derivátu crossHA-TA

- Smícháním roztoku A a roztoku B v poměru 1:1 byl připraven hydrogel o složení uvedeném v následující tabulce (Tabulka 18).

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

Tabulka 18: Složení zesítného derivátu crossHA-TA

2) Příprava roztoku s obsahem hyaluronanu a chondroitin sulfátu

- Roztok HA o koncentraci 10 mg/ml a ChS o koncentraci 10 mg/ml byl připraven rozpouštěním nativního hyaluronanu o $M_w 1,91 \times 10^6 \text{ g.mol}^{-1}$ a chondroitin sulfátu ChS o $M_w = 10 \times 10^3 - 40 \times 10^3 \text{ g.mol}^{-1}$ v fosfátovém pufru (PBS).

3) Homogenizace hydrogelu a roztoku s obsahem hyaluronanu a chondroitin sulfátu

- Finální hydrogel byl připraven smícháním zesítného derivátu crossHA-TA a roztoku HA a ChS v poměru 1:1 s následnou homogenizací směsi. Finální složení materiálu je uvedeno v následující tabulce (Tabulka 19).

Finální složení	
HRP	0,12 U/ml

crossHA-TA.....	10 mg/ml
HA	5 mg/ml
ChS	5 mg/ml
NaCl.....	Bg/1
KCl.....	0,2 g/1
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	2,85 g/1
KH ₂ PO ₄	0,2 g/1

Tabulka 19: Finální složení hydrogelu, HA o koncentraci 5 mg/ml a ChS o koncentraci 5 mg/ml

5 Příklad 10

Příprava hydrogelů, obsahující HA o koncentraci 5 mg/ml a ChS o koncentraci 10 mg/ml

10 Příprava hydrogelů, obsahujících nezesíťnou kyselinu hyaluronovou a chondroitin sulfát zahrnovala 3 základní kroky:

1) Příprava hydrogelu obsahujícího zesíťný derivát crossHA-TA

15 Hydrogel obsahující zesíťný derivát crossHA-TA byl připraven smícháním dvou prekurzorových roztoků A a B, které byly připraveny rozpuštěním jednotlivých složek ve fosfátem pufovaném fyziologickém roztoku (PBS). Pro přípravu prekurzorových roztoků byl použit hydroxyfenylový derivát HA-TA o $M_w = 8,09 \times 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$ a DS 1,1 %. Složení roztoků je uvedeno v následující tabulce (Tabulka 20).

Roztok A	Roztok B
HRP..... 12,8 mU/ml	H ₂ O ₂0,6 mmol/l
HA-TA 20 mg/ml	HA-TA 20 mg/ml
NaCl..... 8 g/1	NaCl 8 g/1
KCl 0,2 g/1	KCl 0,2 g/1
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O 2,85 g/1	Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O 2,85 g/1
KH ₂ PO ₄ 0,2 g/1	KH ₂ PO ₄ 0,2 g/1

20

Tabulka 20: Složení prekurzorových roztoků pro přípravu zesíťného derivátu crossHA-TA

Smícháním roztoku A a roztoku B v poměru 1:1 byl připraven hydrogel o složení uvedeném v následující tabulce (Tabulka 21).

25

30

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

5 Tabulka 21: Složení zesíťného derivátu crossHA-TA

2) Příprava roztoku s obsahem hyaluronanu a chondroitin sulfátu

10 Roztok HA o koncentraci 10 mg/ml a ChS o koncentraci 20 mg/ml byl připraven rozpouštěním nativního hyaluronanu o Mw 1,91 x 10⁶ g.mol⁻¹ a chondroitin sulfátu o Mw = 10 x 10³ - 40 x 10³ g.mol⁻¹ v fosfátovém pufru (PBS).

3) Homogenizace hydrogelu a roztoku s obsahem hyaluronanu a chondroitin sulfátu

15 Finální hydrogel byl připraven smícháním zesíťného derivátu crossHA-TA a roztoku HA a ChS v poměru 1:1 s následnou homogenizací směsi. Finální složení materiálu je uvedeno v následující tabulce (Tabulka 22).

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

20 Tabulka 22: Finální složení hydrogelu, HA o koncentraci 5 mg/ml a ChS o koncentraci 10 mg/ml

Příklad 11

Příprava hydrogelů na bázi hydroxyfenylového derivátu HA-TA o koncentraci 5 mg/ml

25

Hydrogely byly připraveny smícháním dvou prekurzorových roztoků A a B, pro jejichž přípravu byl použit vodný roztok NaCl (9 g/l). Pro přípravu prekurzorových roztoků byl použit hydroxyfenylový derivát HA-TA o Mw = 1,5 x 10⁶ g.mol⁻¹ a DS 0,5%. Složení roztoků je uvedeno v následující tabulce (Tabulka 23).

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

- 5 Tabulka 23: Složení prekursorových roztoků pro přípravu hydrogelů na bázi hydroxyfenylového derivátu HA-TA o koncentraci 5 mg/ml

Smícháním roztoku A a roztoku B v poměru 1:1 byly připraveny hydrogely s finálním složením, uvedeným v následující tabulce (Tabulka 24), kde crossHA-TA je kovalentně zesítěným hydroxyfenylovým derivátem hyaluronanu.

Složení hydrogelů	
HRP	0,06 U/ml
crossHA-TA	5 mg/ml
NaCl	9 g/l

Tabulka 24: Finální složení hydrogelů na bázi hydroxyfenylového derivátu HA-TA o koncentraci 5 mg/ml

15

Příklad 12

Příprava hydrogelů na bázi hydroxyfenylového derivátu HA-TA o koncentraci 30 mg/ml

- 20 Hydrogely byly připraveny smícháním dvou prekursorových roztoků A a B, pro jejichž přípravu byl použit vodný roztok NaCl (9 g/l). Pro přípravu prekursorových roztoků byl použit hydroxyfenylový derivát HA-TA o $M_w = 5 \times 10^4$ g.mol⁻¹ a DS 10%. Složení roztoků je uvedeno v následující tabulce (Tabulka 25).

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

- 25 Tabulka 25: Složení prekursorových roztoků pro přípravu hydrogelů na bázi hydroxyfenylového derivátu HA-TA o koncentraci 30 mg/ml

Smícháním roztoku A a roztoku B v poměru 1:1 byly připraveny hydrogely s finálním složením, uvedeným v následující tabulce (Tabulka 26), kde crossHA-TA je kovalentně zesítěným hydroxyfenylovým derivátem hyaluronanu.

Složení hydrogelů	
HRP	0,6 U/ml
crossHA-TA	30 mg/ml

NaCl..... 9 g/l

Tabulka 26: Finální složení hydrogelů na bázi hydroxyfenylového derivátu HA-TA o koncentraci 30 mg/ml

5

Příklad 13

Degradace roztoků HA s přidavkem ChS pomocí ROS

- 10 Pro porovnání rychlosti degradace roztoků HA s ChS působením ROS byly připraveny roztoky hyaluronanu v fosfátovém pufru (PBS) s různou koncentrací ChS. Pro přípravu roztoků byla použita kyselina hyaluronová o $M_w 1,91 \times 10^6 \text{ g.mol}^{-1}$ a ChS o $M_w = 10 \times 10^3 - 40 \times 10^3 \text{ g.mol}^{-1}$. Roztok A obsahoval 20 mg/ml HA, roztok B 20 mg/ml HA a 0,5 mg/ml ChS, roztok C 20 mg/ml HA a 1 mg/ml ChS, roztok D 20 mg/ml HA a 3 mg/ml ChS, roztok E 20 mg/ml HA a 5 mg/ml ChS, roztok E 20 mg/ml HA a 20 mg/ml ChS.

15

Provedení experimentu degradace

- 20 Rychlost degradace byla vyjádřena jako procentuální pokles viskozity roztoků při smykové rychlosti $0,1 \text{ s}^{-1}$ oproti počáteční hodnotě. Měření poklesu viskozity se provádělo na reometru Kinexus Malvern v konfiguraci cone-plate. Byl použit kužel o průměru 40 mm s vrcholovým úhlem 1° . Degradace materiálu probíhala v 10 ml stříkačkách, kde do 9 ml materiálu bylo přidáno 0,5 ml roztoku CuSO_4 o koncentraci 0,25 mmol/l a následně 0,5 ml roztoku H_2O_2 o koncentraci 2,5 mmol/l. Během probíhající degradace hydrogelů byly v předem daných časových intervalech odebírány vzorky materiálu, u kterých byla naměřena viskozita při teplotě 25°C a smykové rychlosti $0,1 \text{ s}^{-1}$. Celková doba degradace činila 3 h.

25

- Obr. 1 znázorňuje degradaci řetězců hyaluronanu, která je vyjádřena procentuálním poklesem viskozity roztoků v čase. Z Obr. 1 je vidět vliv koncentrace ChS na rychlost degradace hyaluronanu. Se zvyšující se koncentrací ChS klesá rychlost degradace HA působením ROS. Viskozita roztoku A, který neobsahoval ChS se po 3 hodinách poklesla o 97 % oproti počáteční hodnotě před degradací, roztoku B (s přidavkem 0,5 mg/ml ChS) už o 89 %, roztoku C, do kterého bylo přidáno 1 mg/ml ChS o 84 %, roztoku D (20 mg/ml HA + 3 mg/ml ChS) o 46 %, roztoku E (20 mg/ml HA + 5 mg/ml ChS) o 25 % a roztoku F (20 mg/ml HA + 20 mg/ml ChS) pouze o 8%.

35

Příklad 14

Degradace hydrogelů na bázi zesítněného derivátu crossHA-TA působením ROS

40

Pro porovnání rychlosti degradace hydrogelů působením ROS byly připraveny 3 typy materiálů.

Materiál A je roztok HA o koncentraci 20 mg/ml, který byl připraven rozpouštěním HA o $M_w 1,91 \times 10^6 \text{ g.mol}^{-1}$ v PBS.

45

Materiály B je směs zesítněného derivátu crossHA-TA a nezesítněné HA, který byl připraven dle příkladu 7.

Materiály C a D se skládaly z nezesítněné HA, CHS a crossHA-TA a byly připraveny podle příkladů 9 a 10.

50

Rychlost degradace byla vyjádřena jako procentuální pokles viskozity materiálů při smykové rychlosti $0,1 \text{ s}^{-1}$ oproti počáteční hodnotě. Měření poklesu viskozity se provádělo na reometru

Kinexus Malvern v konfiguraci cone-plate. Byl použit kužel o průměru 40 mm s vrcholovým úhlem 1°. Degradace materiálu probíhala v 10 ml stříkačkách, kde do 9 ml materiálu bylo přidáno 0,5 ml roztoku CuSO_4 o koncentraci 0,25 mmol/l a následně 0,5 ml roztoku H_2O_2 o koncentraci 2,5 mmol/l. Po určitých časech degradace se odebíraly vzorky, u kterých byla naměřena viskozita při teplotě 25 °C a smykové rychlosti 0,1 s⁻¹. Celková doba degradace činila 3 h. Z Obr. 2 je zřejmé, že přítomnost ChS v připravených hydrogelech (C - 5 mg/ml ChS; D - 10 mg/ml ChS) zvyšuje jejich odolnost vůči působení ROS.

10 Příklad 15

Enzymatická degradace hydrogelů na bázi zesítěného derivátu crossHA-TA

Pro zjištění vlivu přítomnosti ChS na rychlost degradace hydrogelů na bázi crossHA-TA působením bovinní testikulární hyaluronidázy byly připraveny 3 typy hydrogelů:

- A - hydrogely bez přídavku chondroitin sulfátu, které byly připraveny dle postupu v příkladu 2
- B - hydrogely s přídavkem ChS o koncentraci 3,3 mg/ml, které byly připraveny dle postupu v příkladu 4
- 20 C - hydrogely s přídavkem ChS o koncentraci 10 mg/ml, které byly připraveny dle postupu v příkladu 5.

Rychlost degradace byla vyjádřena jako nárůst koncentrace produktů degradace, způsobené BTH, vyjádřený v procentech.

Hydrogely byly ponořeny do degradačního média (roztok hyaluronidázy BTH o aktivitě 30 U/mg v roztoku hovězího sérového albuminu (BSA) o koncentraci 0,1 mg/ml v 0,01 mol/l octanovém pufru (OP) pH 5,3). Degradace hydrogelů probíhala v inkubátoru při 37° C za současného míchání. Po určitých časových intervalech se odebíraly vzorky degradačního média s produkty degradace hydrogelů. Koncentrace disacharidických jednotek HA v degradačním médiu byla stanovena spektrofotometricky jako koncentrace N-acetylglukosaminu. Obr. 3 znázorňuje nárůst koncentrace degradačních produktů hydrogelů v médiu v čase. Z Obr. je zřejmé, že přítomnost ChS v hydrogelech na bázi crossHA-TA vede ke snížení rychlosti degradace materiálu působením hyaluronidázy.

Odkazy:

- Aubry-Rozier B. 2012. *Revue Médicale Suisse* 14: 571
- 40 Akkara, J. A., K. J. Senecal and D. L. Kaplan (1991). "Synthesis and characterization of polymers produced by horseradish peroxidase in dioxane." *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* 29(11): 1561-1574.
- Bali, J.-P., H. Cousse and E. Neuzil (2001). "Biochemical basis of the pharmacologic action of chondroitin sulfates on the osteoarticular system." *Seminars in Arthritis and Rheumatism* 31(1): 58-68.
- 45 Baeurle S. A., Kiselev M. G., Makarova E. S., Nogovitsin E. A. 2009. *Polymer* 50: 1805
- 50 Buck Ii, D. W., M. Alam and J. Y. S. Kim (2009). "Injectable fillers for facial rejuvenation: a review." *Journal of Plastic. Reconstructive & Aesthetic Surgery* 62(1): 11-18.
- Burdick, J. A. and G. D. Prestwich (2011). "Hyaluronic Acid Hydrogels for Biomedical Applications." *Advanced Materials* 23(12): H41-H56.

55

- Calabro, A., L. Akst, D. Alam, J. Chan, A. B. Darr, K. Fukamachi, R. A. Gross, D. Haynes, K. Kamohara, D. P. Knott, H. Lewis, A. Melamud, A. Miniaci and M. Strome (2008). Hydroxyphenyl cross-linked macromolecular network and applications thereof. United States, The Cleveland Clinic Foundation (Cleveland, OH, US).
- 5 Darr, A. and A. Calabro (2009). "Synthesis and characterization of tyramine-based hyaluronan hydrogels." *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 20(1): 33-44.
- Ghan, R., T. Shutava, A. Patel, V. T. John and Y. Lvov (2004). "Enzyme-Catalyzed
10 Polymerization of Phenols within Polyelectrolyte Microcapsules." *Macromolecules* 37(12): 4519-4524.
- Higashimura, H. and S. Kobayashi (2002). *Oxidative Polymerization*. John Wiley & Sons, Inc.
- 15 Kurisawa, M., F. Lee and J. E. Chung (2009). Formation of Hydrogel in the Presence of Peroxidase and Low Concentration of Hydrogen Peroxide
- Kurisawa, M., F. Lee, L.-S. Wang and J. E. Chung (2010). "Injectable enzymatically crosslinked hydrogel system with independent tuning of mechanical strength and gelation rate for drug delivery and tissue engineering." *Journal of Materials Chemistry* 20(26): 5371-5375.
- 20 Lee, F., J. E. Chung and M. Kurisawa (2008). "An injectable enzymatically crosslinked hyaluronic acid-tyramine hydrogel system with independent tuning of mechanical strength and gelation rate." *Soft Matter* 4: 880-887.
- Li, P., D. Raitcheva, M. Hawes, N. Moran, X. Yu, F. Wang and G. L. Matthews (2012). "Hylan G-F 20 maintains cartilage integrity and decreases osteophyte formation in osteoarthritis through both anabolic and anti-catabolic mechanisms." *Osteoarthritis and Cartilage* 20(11): 1336-1346.
- 25 Prestwich, G. D. (2011). "Hyaluronic acid-based clinical biomaterials derived for cell and molecule delivery in regenerative medicine." *J Control Release* 155(2): 193-199.
- 30 Salwowska, N. M., A. Bebenek, D. A. Zqdlo and D. L. Weislo-Dziadecka (2016). "Physiochemical properties and application of hyaluronic acid: a systematic review." *Journal of Cosmetic Dermatology* 15(4): 520-526.
- 35 Shutava, T., Z. Zheng, V. John and Y. Lvov (2004). "Microcapsule modification with peroxidase-catalyzed phenol polymerization." *Biomacromolecules* 5(3): 914-921.
- Stern, R., G. Kogan, M. J. Jedrzejas and L. Soltés (2007). "The many ways to cleave hyaluronan." *Biotechnology advances* 25(6): 537-557.
- 40 Tognana, E., A. Borriore, C. De Luca and A. Pavesio (2007). "Hyalograft C: hyaluronan-based scaffolds in tissue-engineered cartilage." *Cells Tissues Organs* 186(2): 97-103.
- Veitch, N. C. (2004). "Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme." *Phytochemistry* 65(3): 249-259.
- 45 Volpi, N. (2019). "Chondroitin Sulfate Safety and Quality." *Molecules (Basel, Switzerland)* 24(8): 1447.
- 50 Xiong, S.-L. and Z.-Y. Jin (2007). "THE FREE RADICAL-SCAVENGING PROPERTY OF CHONDROITIN SULFATE FROM PIG LARYNGEAL CARTILAGE IN VITRO." *Journal of Food Biochemistry* 31(1): 28-44.
- Xu, X., A. K. Jha, D. A. Harrington, M. C. Farach-Carson and X. Jia (2012). "Hyaluronic Acid-Based Hydrogels: from a Natural Polysaccharide to Complex Networks." *Soft matter* 8(12):

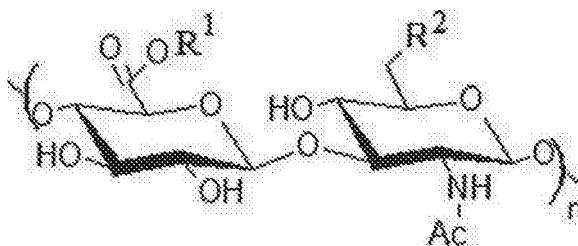
3280-3294.

NÁROKY NA OCHRANU

5

1. Hydrogel na bázi zesíťovaného hydroxyfenylového derivátu kyseliny hyaluronové, vyznačující se tím, že obsahuje molekuly hydroxyfenylového derivátu hyaluronové kyseliny (HA-TA) nebo jeho farmaceuticky přijatelnou sůl podle obecného vzorce I

10

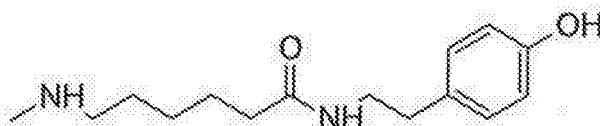


(I),

kde n je v rozmezí 2 až 7500 a kde R^1 je H^+ nebo iont alkalické soli nebo soli alkalických zemin

15

a R^2 je OH nebo tyraminový substituent podle obecného vzorce II:



(II),

20

příčemž v rámci jedné molekuly hydroxyfenylového derivátu hyaluronové kyseliny nebo jeho farmaceuticky přijatelné soli podle obecného vzorce I je alespoň jeden R^2 tyraminový substituent podle obecného vzorce II a příčemž alespoň dva tyraminové substituenty podle obecného vzorce II jsou spojeny prostřednictvím kovalentní vazby v kterékoliv ortho poloze fenylových skupin,

25

a dále obsahuje chondroitin sulfát nebo jeho farmaceuticky přijatelnou sůl vybranou ze skupiny obsahující alkalické soli nebo soli alkalických zemin.

2. Hydrogel podle nároku 1, vyznačující se tím, že alkalické soli nebo soli alkalických zemin jsou vybrány ze skupiny obsahující Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} .

30

3. Hydrogel podle nároku 1 nebo nároku 2, vyznačující se tím, že koncentrace chondroitin sulfátu nebo jeho farmaceuticky přijatelné soli je v rozsahu 0,5 až 50 mg/ml hydrogelu, s výhodou v koncentraci 1 až 20 mg/ml, výhodněji 5 mg/ml.

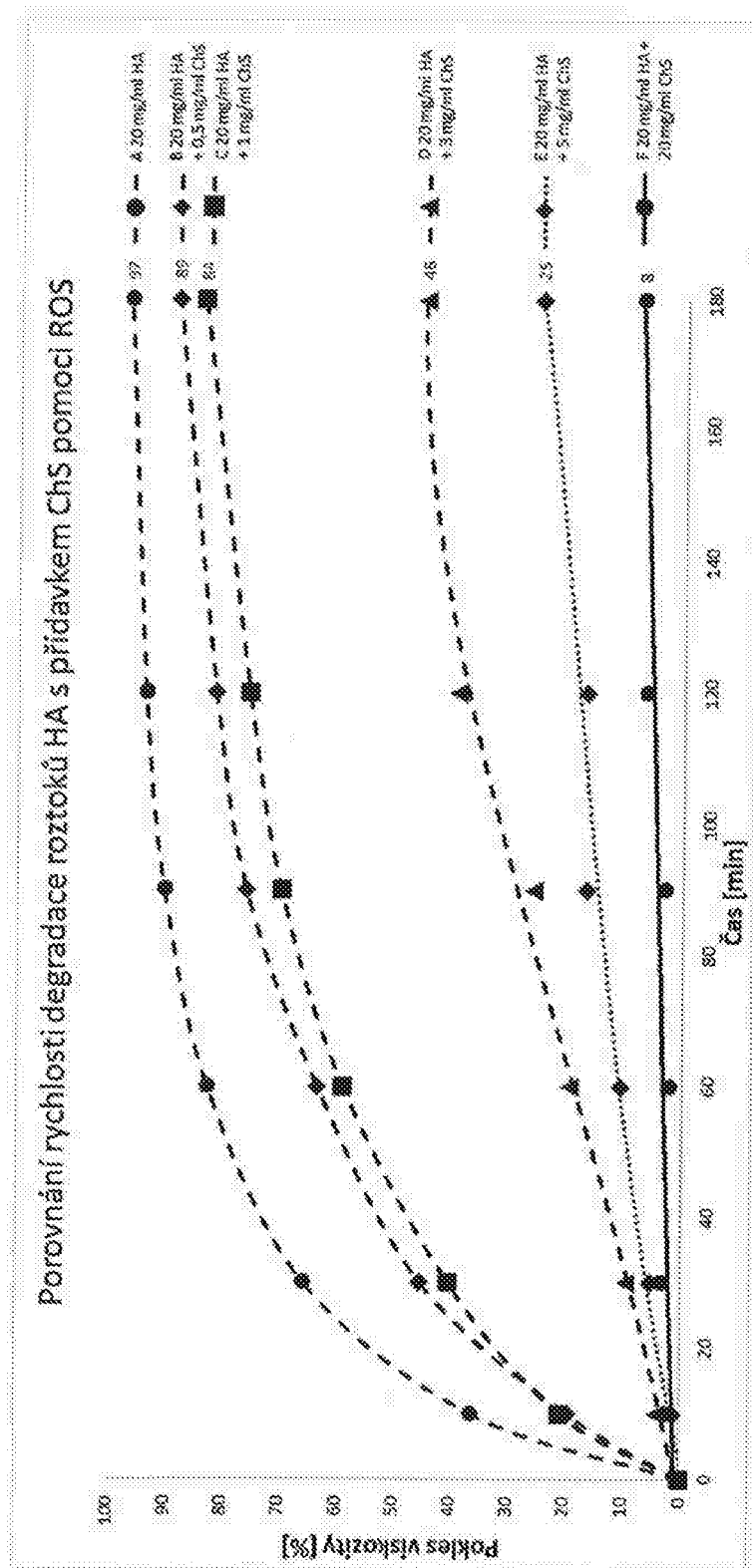
35

4. Hydrogel podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3, vyznačující se tím, že obsah zesíťovaného hydroxyfenylového derivátu hyaluronanu je v rozsahu 5 až 30 mg/ml, s výhodou 10 mg/ml hydrogelu.

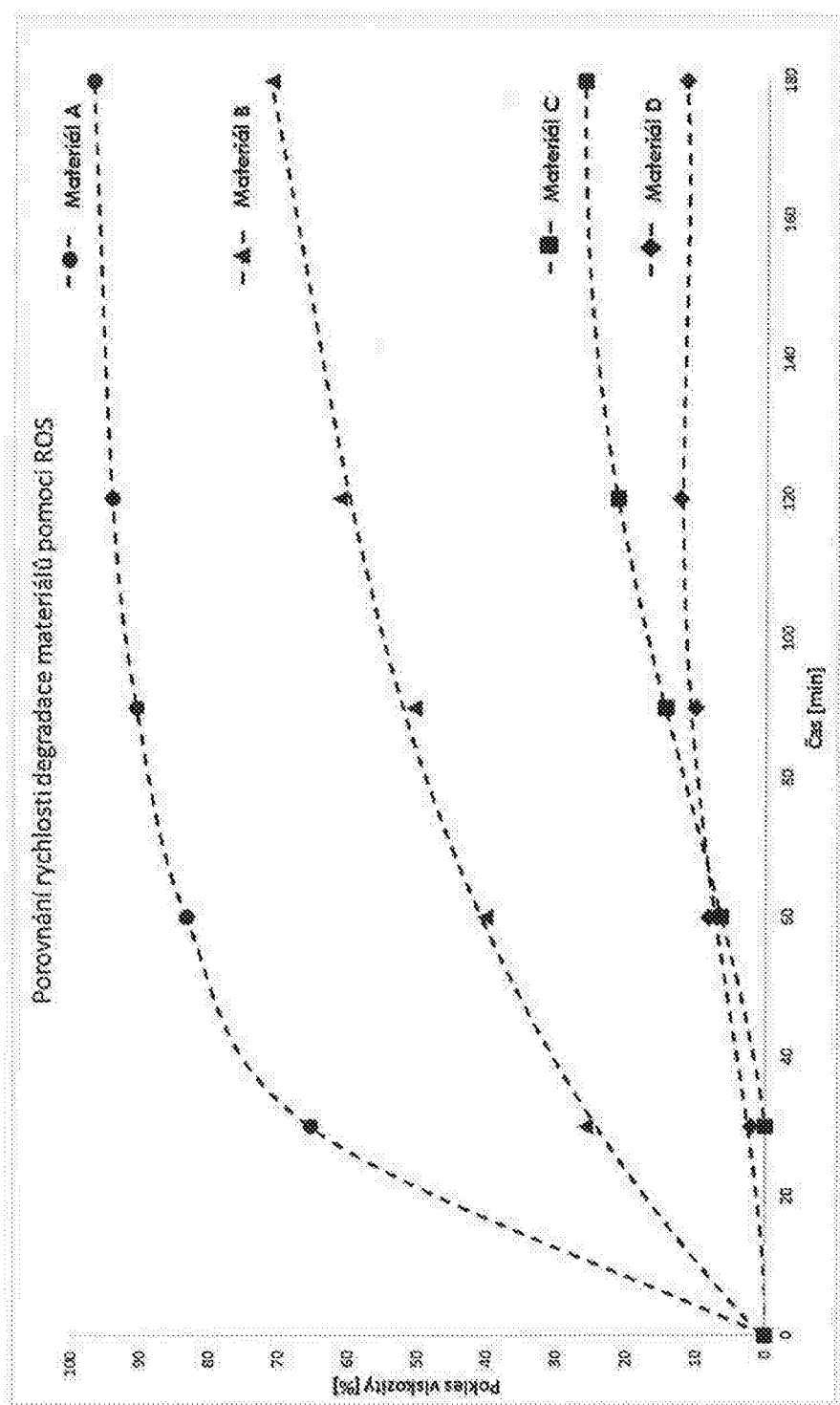
5. Hydrogel podle kteréhokoliv z nároků 1 až 4, vyznačující se tím, že dále obsahuje kyselinu hyaluronovou nebo její farmaceuticky přijatelnou sůl v koncentraci 1 až 20 mg/ml hydrogelu, s výhodou 5 až 10 mg/ml, výhodněji 5 mg/ml hydrogelu.

40

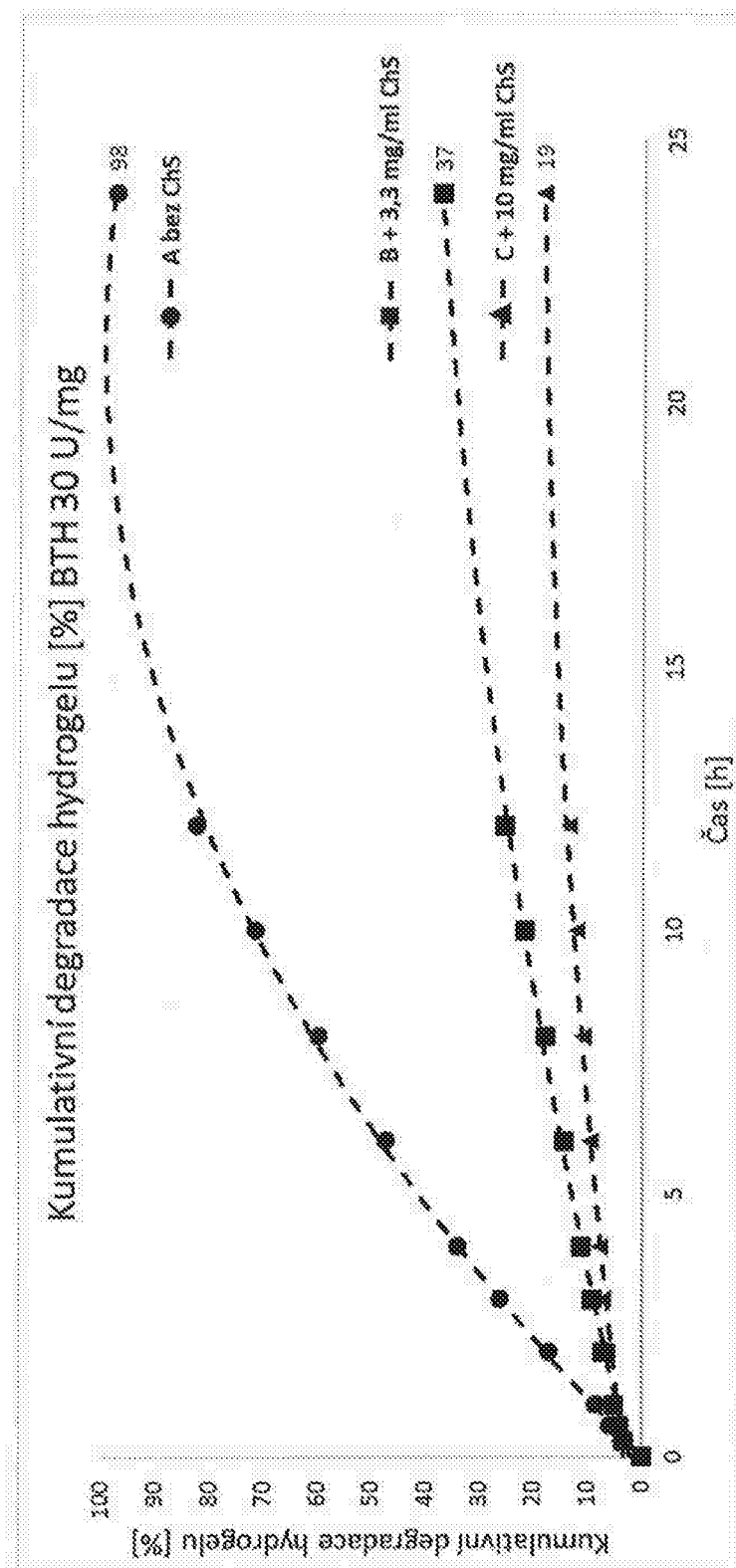
3 výkresy



Obr. 1



Obr. 2



Obr. 3