

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(21) Číslo dokumentu:

2017-320

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.:

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **05.06.2017**

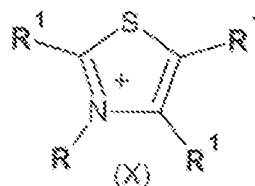
(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **16.01.2019**
(Věstník č. 3/2019)

A61K 31/728 (2006.01)
A61K 31/734 (2006.01)
A61K 31/738 (2006.01)
A61K 31/715 (2006.01)
A61K 31/41 (2006.01)
A61K 31/51 (2006.01)
A61K 33/18 (2006.01)
A61K 9/70 (2006.01)
A61L 15/28 (2006.01)
A61L 15/44 (2006.01)
A61P 31/02 (2006.01)
A61P 17/02 (2006.01)

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

(72) Původce:
Radovan Buffa, Humenné, SK
Veronika Štěpánková, Chotěnov, CZ
Ivana Basarabová, Medzilaborce, SK
Josef Chmelař, Ústí nad Orlicí, Hlávky, CZ
Kateřina Mairychová, Pardubice, Pardubičky, CZ
Vojtěch Zápotocký, Žamberk, CZ
Tomáš Pitucha, Chrudim, Chrudim I, CZ
Kateřina Knotková, Choceň, CZ
prof. Luboš Sobotka, MD, Ph.D., Hradec Králové,
Malšovice, CZ
Kristýna Lipenská, Letohrad, CZ
Vladimír Velebný, Žamberk, CZ

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



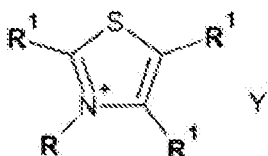
(54) Název přihlášky vynálezu:
**Antimikrobiální kompozice obsahující
polysacharid, stabilizátor a trijodid, způsob
její přípravy a použití**

(57) Anotace:
Řešení se týká tuhých forem s antimikrobiálním účinkem obsahujících polysacharid a trijodid, kde je díky přítomnosti stabilizátoru významně potlačený rozpad trijodidu na jodid a těkavý jod, dále jejich přípravy a použití. V porovnání s kapalnými formami obsahujícími trijodid lze stabilizované pevné formy díky jejich tvarové stálosti a výrazně menšímu objemu (hmotnosti) celkového materiálu, používat pro daleko širší škálu aplikací.

Antimikrobiální kompozice obsahující polysacharid, stabilizátor a trijodid, způsob její přípravy a použití

5 Oblast techniky

Vynález se týká antimikrobiální kompozice obsahující polysacharid nebo jeho derivát nebo směs polysacharidů a/nebo jejich derivátů, stabilizátor a trijodid sodný nebo draselný. Složení kompozice má za následek stabilizaci různých typů pevných forem obsahujících polysacharid a/nebo jeho chemicky modifikovaný derivát, a/nebo jejich směs, a jód ve formě trijodidového aniontu (I_3^-). Jako stabilizátory výrazně potlačující rozpad trijodidového aniontu na jód (I_2) a jodid (I^-) jsou úspěšně použity heterocyklické sloučeniny kationické povahy obecného vzorce X,



15 vzorec (X),

kde R je – alkylový, aromatický, heteroaromatický, lineární nebo rozvětvený řetězec $C_1 - C_{30}$, volitelně s obsahem N nebo O atomů

20 R^1 je – alkylový, aromatický, heteroaromatický, lineární nebo rozvětvený řetězec $C_1 - C_{30}$ volitelně s obsahem N nebo O atomů, nebo –H, přičemž R^1 ve sloučenině podle vzorce X jsou nezávisle na sobě stejné nebo odlišné,

a Y je chloridový, bromidový nebo jodidový aniont.

25

Dále se vynález týká způsobu přípravy pevných forem, kde lze použít dva postupy.

Postup 1: Trijodid a stabilizátor jsou sorbovány na povrch již hotové finální formy.

Postup 2: Trijodid a stabilizátor jsou přidány do systému před vytvořením finální formy.

30 Rozdíl mezi Postupy 1 a 2 tkví v tom, že v Postupu 2 je trijodidový aniont se stabilizátorem distribuován v objemu materiálu homogenněji, zatímco v Postupu 1 je trijodidový aniont se stabilizátorem distribuován přednostně na povrchu příslušné formy.

Pod pojmem "forma" se rozumí typy materiálů jako například tenký film, lyofilizát, vrstva ze staplových vláken, nekonečné vlákno, tkanina, splétaná textilie nebo nanovlákněná vrstva.

35

Dále se vynález týká aplikací připravených pevných forem pro oblasti, kde je vyžadován biokompatibilní a biodegradovatelný materiál s antiseptickým účinkem. Tyto oblasti zahrnují kryty ran nebo implantabilní zdravotnické prostředky.

40

Dosavadní stav techniky

45 *Alginát sodný* je anionický polysacharid se širokou škálou biomedicínských aplikací. Jeho hlavní výhodou je biokompatibilita a schopnost tvořit gely, proto se často používá při přípravě hydrogelů, v oblasti hojení ran a v tkáňovém inženýrství (Lee K. Y. a David J. Mooney D. J., *Progress in Polymer Science* 37, 1, 106–126, 2012).

50 *Karboxymethyl celulóza* je anionický polysacharid používaný hlavně v potravinářství k zahušťování a stabilizaci emulzí. U nepotravinářských výrobků našel uplatnění například u

lubrikantů, nátěrových hmot, projímadel a čisticích prostředků. Tento polysacharid se hojně používá i v oblasti hojení ran, kde je asi největší výhodou cena a zajímavé mechanické vlastnosti (Ramli A., Wong T. W., *International Journal of Pharmaceutics*, 403, 7, 73–82, 2011).

- 5 *Oxycelulóza* je celulóza oxidovaná v poloze 6 cyklu na karboxylovou kyselinu. Jedná se tedy o anionický polysacharid, který je známý hlavně svými hemostatickými účinky, a proto se hojně používá pro celou řadu medicínských a farmaceutických aplikací. Jednou z nich je i hojení ran, kde je kromě hemostatických vlastností velkou výhodou také biodegradovatelnost a sorpční vlastnosti (Bajerová M. a kol, *Advances in polymer technology*, 28,199–208, 2009).

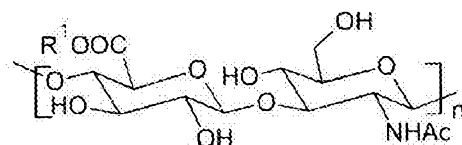
10

Hydroxyethyl celulóza je derivát celulózy modifikovaný na některých OH skupinách $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OH}$ skupinou. Není až tak dobře rozpustná v protických systémech jako například oxycelulóza, ale díky svým gelačním vlastnostem je široce používána v kosmetice, roztocích na čištění a

15

lubrikantech. Pro hojení ran se používá hlavně v kombinaci s jinými polysacharidy jako gellanová guma (Schmidt R. a Winter G., EP 1888134 A2)

Kyselina hyaluronová je nesulfatovaný glykosaminoglykan, skládající se ze dvou opakujících se jednotek D–glukuronové kyseliny a N–acetyl–D–glukosaminu.



20

kde

R^1 je H nebo Na.

25

- Tento hydrofilní polysacharid s molekulovou hmotností v rozsahu $5 \cdot 10^3$ až $1 \cdot 10^6$ g.mol⁻¹ tvoří součást kůže, pojivových tkání, synoviální tekutiny kloubů a hraje významnou roli v řadě biologických procesů jako je organizace proteoglykanů, hydratace a diferenciace buněk (Balazs E., *Structural Chemistry*, 20, 341–349, 2009; Aya K. L. a Stern R. *Wound Repair and Regeneration* 22, 579–593, 2014). Vzhledem k tomu, že se jedná o polymer tělu vlastní a tudíž biodegradovatelný, je vhodným substrátem pro tkáňové inženýrství, nebo jako nosič biologicky aktivních látek (Mortisen D. a kol. *Biomacromolecules*, 11(5), 1261–1272, 2011; Collins M. N. a Birkinshaw C, *Carbohydrate Polymers*, 92, 1262–79, 2013). Velmi známá je například injekční aplikace kyseliny hyaluronové do osteoartritických kloubů, kde bylo pozorováno výrazné zlepšení jejich funkčnosti (Muzzarelli R. A. a kol., Review: *Carbohydrate Polymers*, 89, 723–739, 2012). Tento polymer je také známý tím, že díky svým biologickým vlastnostem významně podporuje proces hojení ran (Nyman E. a kol. *J. Plast. Surg. Hand Surg.* 47(2), 89–92, 2013)

30

35

Chemické modifikace kyseliny hyaluronové a její formy

40

- 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 řešení je kovalentní spojení hydrofobního řetězce formou biodegradovatelné esterové vazby na strukturu polymeru (Kettou a spol. PV 2009–399, Buffa a kol. WO 2010/105582). Z takto modifikovaných materiálů lze pak vytvářet různé formy, jako jsou například vlákna (Ščudlová a kol. EP 2925916 A1), pleteniny a splétané textilie (Pitucha a kol., CZ 306354), samonosné filmy (Foglarová a kol. PV 2015–166; Foglarová M. a kol. *Carbohydrate Polymers* 2016, 144, 68–75) nebo vrstvy z nanovláken (Růžicková J. a kol. PV 2013–913). Netkané textilie jsou tvořeny spojením staplových mikrovláken, která jsou připravována metodou mokrého zvlákňování v nestacionární koagulační lázni. Koagulační lázeň je tvořena 100% alkoholem C₁–C₃. Vysrážená

45

50

vlákna jsou pak mletím krácena, zfiltrována na substrát, sušena a lisována. Takto je možné připravit netkané textilie z HA s molekulovou hmotností 60 až 3000 kg.mol⁻¹. Výsledná vrstva může zůstat přilnutá na substrát anebo být ze substrátu oddělena jako samonosná vrstva s plošnou hmotností vyšší než 5 g.m⁻².

5

Kyselina hyaluronová a trijodid

Formy jodu s vyšším oxidačním stupněm než -1 (I⁻) jsou dobře známy jako biokompatibilní antiseptické a dezinfekční látky. Jednou z nejrozšířenějších forem je trijodid (oxidační stupeň - 10 1/3), který podléhá vratnému rozpadu na molekulární jod (I₂) a jodid (I⁻). Molekulární jod přechází do plynného skupenství, tudíž tuhé materiály s obsahem trijodidu postupně ztrácejí své oxidační schopnosti právě díky sublimaci I₂. Z tohoto důvodu se trijodid nejvíce používá ve formě roztoků. Příkladem je takzvaný Lugolův roztok – trijodid draselný ve vodě, který je díky své biokompatibilitě a účinnosti vhodný pro širokou škálu aplikací spojených s antiseptickým nebo 15 dezinfekčním účinkem. Jeho mírnou nevýhodou je, že může způsobovat tvorbu jizev a taky dočasně změnit barvu kůže. Tyto nedostatky byly překonány přidavkem kyseliny hyaluronové, která výrazně potlačuje tvorbu jizev a obecně významně napomáhá procesu hojení. Spis CZ 12015 popisuje přípravek pro prevenci adheze bandáže, který obsahuje fyziologicky přijatelnou sůl kyseliny hyaluronové o molekulové hmotnosti 200 000 až 2 500 000, jód a jodid draselný. 20 Přípravek je ve formě sterilního vodného roztoku nebo gelu a je schopen urychlit hojení rány. Toto použití roztoku kyseliny hyaluronové a trijodidu draselného (pod komerčním názvem Hyiodine®) pro topické aplikace na hojení ran bylo publikováno i v několika pracích (Bezděková B. a kol. *Veterinářství* 54, 516–519, 2004; Franková J. a kol. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 17, 891–898, 2006; Slavkovský R. a kol. *Clinical and Experimental* 25 *Dermatology* 35, 4, 373–379, 2010). Autoři získali výborné výsledky právě díky unikátní kombinaci biokompatibilního a antimikrobiálního trijodidu a podporou hojícího procesu způsobenou přítomností biokompatibilní kyseliny hyaluronové.

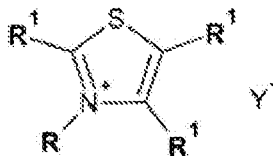
Z hlediska skladování, transportu a možných dalších aplikací *in situ* je ale významným omezením 30 použití trijodidu s polysacharidem ve formě roztoku. Jednak objem materiálu (roztoku) je výrazně větší než objem analogické pevné formy a také jiné možnosti použití *in situ* jsou díky tvarové nestálosti roztoku (jeho roztečení) značně limitované. Navíc je kapalná forma omezená formou obalu, kde díky oxidační aktivitě trijodidu je velmi obtížné používat pro delší skladování jiné typy obalových materiálů než standardní, ale křehké silikátové sklo. Snaha připravit materiál 35 s obsahem polysacharidu a trijodidu v pevné formě nebyla úspěšná z důvodu nestability samotného trijodidu v nepřítomnosti rozpouštědla. Přítomnost rozpouštědla brzdí proces sublimace molekulárního I₂ a umožňuje jeho zpětné vázání s I⁻ na formu trijodidu I₃⁻. Proto samotný Lugolův roztok při odpařování rozpouštědla rychle ztrácí aktivní složku (I₂), která sublimuje z pevného materiálu, což z pohledu dlouhodobějšího skladování nějaké finální formy s 40 obsahem trijodidu je problém zcela zásadní.

Spis CZ 22394 popisuje antimikrobiální směs pro podporu hojení ran a kryt pro podporu hojení ran s antimikrobiálním účinkem. Uvedená směs obsahuje fyziologicky aktivní sůl kyseliny hyaluronové, případně další polysacharidy a látky s antimikrobiální aktivitou, a dále elektrolyt, 45 např. jodid draselný. Směs může být ve formě chemické nebo fyzikální směsi, přičemž chemickou směsí je s výhodou vodný roztok a fyzikální směsí je s výhodou vrstva polysacharidových vláken, která ve své struktuře obsahují antimikrobiální látku. Kryt je vhodný pro hojení povrchových ran. Nevýhodou tohoto řešení je zejména nezbytná přítomnost antimikrobiální látky jiné než trijodid, což s sebou nese riziko lokálního podráždění pokožky, 50 toxicity nebo alergické reakce.

Výše uvedené nedostatky odstraňuje řešení popsané v tomto vynálezu, které popisuje přípravu pevných forem obsahujících polysacharid, trijodid a stabilizátor, který významně zpomaluje 55 sublimaci aktivního jodu z pevného materiálu. Toto řešení umožňuje daleko širší možnosti aplikace než samotný vodný roztok polysacharidu a trijodidu.

Podstata vynálezu

Předmětem vynálezu jsou formulace obsahující polysacharid a/nebo jeho chemicky modifikovaný derivát nebo směs polysacharidů a/nebo derivátů polysacharidů, trijodid sodný nebo draselný a stabilizátor obecného vzorce X,



vzorec (X),

kde R je – alkylový, aromatický, heteroaromatický, lineární nebo rozvětvený řetězec $C_1 - C_{30}$, volitelně s obsahem N nebo O atomů,

R^1 je – alkylový, aromatický, heteroaromatický, lineární nebo rozvětvený řetězec $C_1 - C_{30}$, volitelně s obsahem N nebo O atomů, nebo vodík, přičemž R^1 ve sloučenině podle vzorce X jsou nezávisle na sobě stejné nebo odlišné,

a Y je chloridový, bromidový nebo jodidový aniont.

Finální materiály jsou připravené v podobě různých pevných forem jako například samonosné filmy, lyofilizát, vrstva ze staplových vláken (netkaná textilie), nekonečné vlákno, tkanina, pletenina, splétaná textilie nebo vrstva nanovláken.

Použitý polysacharid nebo jeho chemicky modifikovaný derivát mají molekulovou hmotnost v rozmezí $5 \cdot 10^3$ až $1 \cdot 10^6$ g.mol⁻¹, zdrojem trijodidového aniontu je jodid draselný nebo sodný a molekulární jod I₂.

Polysacharid zahrnuje například:

- kyselinu hyaluronovou, alginát sodný, oxycelulózu, karboxymethylcelulózu, hydroxyethylcelulózu, nebo 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 $C_1 - C_{15}$,
- nebo směsi různých polysacharidů a/nebo derivátů polysacharidů s volitelným poměrem jednotlivých složek. Mimoto kompozice nebo finální zdravotnický prostředek může obsahovat i další látky, například (ale nejen) polyethylenoxid, kyselinu octovou atd.

Dále se vynález týká způsobu přípravy, kde lze na zavedení stabilizovaného trijodidu použít dva přístupy.

Postup 1 – nános: Prvním přístupem je příprava roztoku stabilizátoru podle obecného vzorce X a trijodidu sodného nebo draselného ve směsi rozpouštědel etanol/voda, načež se tento roztok aplikuje na hotovou formu zdravotnického prostředku na bázi polysacharidu nebo jeho derivátu a/nebo směsi polysacharidů a/nebo jejich derivátů. Doba aplikace je s výhodou v rozmezí 10 minut až 72 hodin při teplotě v rozmezí 5 až 40 °C. Aplikace se s výhodou může provést buď nástřikem roztoku na zdravotnický prostředek, nebo ponořením zdravotnického prostředku do roztoku, s výhodou na 5 až 15 hodin. Konkrétněji lze postup provést tak, že se 0,2 až 10% roztok (w/w) trijodidu a stabilizátoru X v molárním poměru 1/1 až 1/5, s výhodou 1/1,1 ve směsi rozpouštědel etanol / voda v objemovém poměru 3/1 až 9/1, aplikuje na povrch již hotové finální formy polysacharidu nebo jeho derivátu nebo směsi polysacharidů, a to s výhodou buď sprejovým nástřikem roztoku trijodidu a stabilizátoru, nebo ponořením finální formy

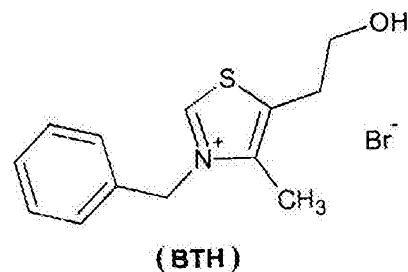
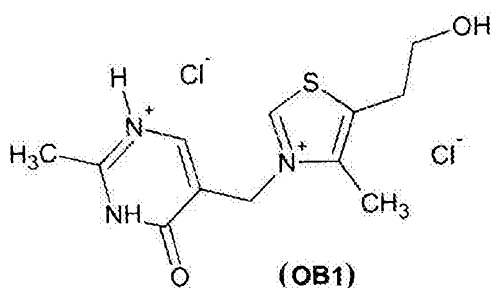
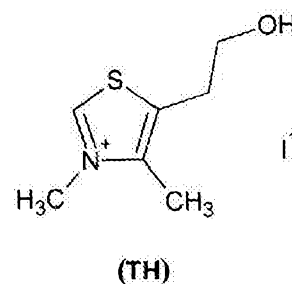
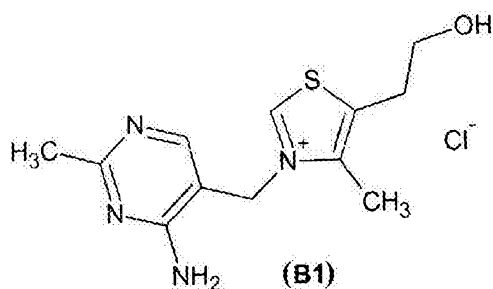
polysacharidu nebo jeho derivátu nebo směsi polysacharidů a/nebo derivátů do roztoku trijodidu a stabilizátoru.

- Postup 2: Druhý přístup spočívá ve vytvoření směsi obsahující systém polysacharidu a/nebo derivátu polysacharidu a/nebo jejich směsi, trijodid draselný nebo sodný a stabilizátor obecného vzorce X, načež se ze směsi vytvoří finální forma kompozice. Konkrétněji se postupuje tak, že se trijodid v koncentraci 0,2 až 10 % (počítáno na celkovou hmotnost všech polysacharidů a/nebo jejich derivátů) a stabilizátor X v molárním poměru trijodid/stabilizátor v rozsahu 1/1 až 1/5, s výhodou 1/1,1, přidají do 0,2 až 6% (w/w) roztoku polysacharidu nebo jeho derivátu nebo směsi polysacharidů a/nebo derivátů ve vodě a kyselině octové v objemovém poměru 20/1 až 200/1 s výhodou 100/1. Po důkladné homogenizaci a případně po přidavku dalších látek se vytvoří finální forma kompozice.

- Aplikací Postupu 2 vzniká materiál, kde je trijodidový aniont se stabilizátorem homogenněji distribuován v celém objemu materiálu. Tento postup lze použít například pro přípravu materiálu ve formě lyofilizátu.

- Aplikací Postupu 1 vzniká materiál, kde je trijodidový aniont se stabilizátorem hlavně na nebo v blízkosti povrchu příslušné formy. Tento postup lze použít pro rozmanité formy: samonosné filmy, lyofilizát, vrstva ze staplových vláken (netkané textilie), nekonečné vlákno, tkanina, pletenina, splétaná textilie nebo vrstva nanovláken.

- Jako stabilizátory obecného vzorce X mohou být použity například tyto chemické sloučeniny: Thiamin B1, oxythiamin hydrochlorid OB1, 5-(2-hydroxyethyl)-3,4-dimethylthiazolium jodid TH a 3-benzyl-5-(2-hydroxyethyl)-4-methylthiazolium bromid BTH.



vzorec (B1), (TH), (OB1), (BTH)

- Účinnost stabilizátorů byla jasně prokázána při pokusech o přípravu lyofilizátů s obsahem I_3^- bez přítomnosti thiazoliových solí. Obsah aktivního jodu po procesu lyofilizace (vysoké vakuum) byl řádově 100krát nižší než u analogických lyofilizátů, které stabilizátor obsahovaly.

- Vynález se také týká zdravotnického prostředku, který obsahuje antimikrobiální kompozici definovanou výše a je ve formě krytu ran nebo implantovatelného zdravotnického prostředku.

Objasnění výkresů

Obr. 1, 2 – Porovnání antimikrobiální aktivity lyofilizátů na bázi hyaluronové kyseliny (HA) připravených Postupem 2 (trijodid a stabilizátor distribuovány homogenněji). Jako kontroly byly testovány materiály bez trijodidu (HA–TH, HA–BTH, HA–B1 a HA), které nevykázaly inhibiční aktivitu. Materiály s antimikrobiální látkou trijodid (HA–TH–I₃, HA–BTH–I₃ a HA–B1–I₃) inhibovaly růst mikroorganismů. Všechny materiály byly testovány pro kmeny *Escherichia coli* (obr. 1) a *Staphylococcus aureus* (obr. 2).

Obr. 3 – Porovnání hojícího účinku lyofilizátů HA–vitamin B1–trijodid připraveného v příkladu 13 (v obrázku je část rány hojená tímto přípravkem označená jako HyB₁) a lyofilizátů na bázi hyaluronanu s obsahem antimikrobiálního oktenidinu (v obrázku označený jako SL) v časech 0, 2 a 5 dnů na pacientovi s otevřenou ranou na dolní končetině (postup popsáný v příkladu 42). Obrázek ukazuje srovnatelnou účinnost obou materiálů.

Příklady uskutečnění vynálezu

DS = stupeň substituce polysacharidu = 100% * (molární množství modifikované jednotky polysacharidu) / (molární množství opakujících se jednotek polysacharidu)
Zde používaný výraz ekvivalent (ekv) se vztahuje na opakující se jednotku příslušného polysacharidu, není-li uvedeno jinak.

Procenta se uvádějí jako hmotnostní procenta, pokud není uvedeno jinak.
Množství aktivního jodu v % – vyjadřuje ekvivalent míry oxidační aktivity materiálu, která je ekvivalentní oxidační aktivitě materiálu s příslušným hmotnostním procentem I₂. Stanoveno standardní redoxní titrací s thiosíranem sodným.

Molekulová hmotnost polysacharidů je hmotnostně střední stanovena pomocí metody SEC–MALLS.

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 a kol. PV 2009–399).

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. Produkt (920 mg) byl analyzován pomocí NMR. DS esteru 3 % (stanoveno NMR, lit. Kettou a kol. PV 2009–399).

Příklad 3

Příprava lauroyl hyaluronanu

- 5 Do roztoku hyaluronanu (5 g, $250 \text{ kg} \cdot \text{mol}^{-1}$) 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 ethyl-chloroformiátu při 0 až 5°C po dobu 15 minut. Vniklá suspenze byla přefiltrována do roztoku hyaluronanu a reakce byla míchána 5
- 10 hodin při 20°C . Výsledný roztok byl pak srážen přidavkem 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 %.

15 Příklad 4

Příprava palmitoyl hyaluronanu

- 20 Do roztoku hyaluronanu (10 g, $250 \text{ kg} \cdot \text{mol}^{-1}$) v 300 ml destilované vody bylo přidáno 300 ml tetrahydrofuranu. Poté bylo do roztoku přidáno 2,5 ekvivalentů triethylaminu, 0,04 ekvivalentu 4-dimethylaminopyridinu a 2 ekvivalenty anhydridu kyseliny palmitové. Výsledný roztok byl míchán při laboratorní teplotě 3 hodiny. Roztok byl pak srážen 1 litrem 100% isopropanolu, promyt 80% isopropanolem a sušen při 40°C 2 dny. Stupeň substituce byl 30 % (stanoveno NMR).

25

Příklad 5

Příprava roztoku thiamin- KI_3 v etanol/voda 3/1

30

150 mg I_2 a 225 mg KI bylo rozpuštěno v 21 ml ethanolu. 210 mg thiamin hydrochloridu bylo rozpuštěno v 7 ml destilované vody. Oba roztoky byly smíchány při teplotě 20°C a skladovány při teplotě 0 až 5°C .

35

Příklad 6

Příprava roztoku thiamin- KI_3 v etanol/voda 6/1

- 40 150 mg I_2 a 225 mg KI bylo rozpuštěno v 25,7 ml ethanolu. 210 mg thiamin-hydrochloridu bylo rozpuštěno v 4,3 ml destilované vody. Oba roztoky byly smíchány při teplotě 20°C a skladovány při teplotě 0 až 5°C .

45 Příklad 7

Příprava roztoku thiamin- KI_3 v etanol/voda 9/1

- 50 150 mg I_2 a 225 mg KI bylo rozpuštěno v 27 ml ethanolu. 210 mg thiamin-hydrochloridu bylo rozpuštěno v 3 ml destilované vody. Oba roztoky byly smíchány při teplotě 20°C a skladovány při teplotě 0 až 5°C .

Příklad 8

Příprava roztoku thiamin–NaI₃ v etanol/voda 3/1

- 5 150 mg I₂ a 203 mg NaI bylo rozpuštěno v 21 ml ethanolu. 210 mg thiamin–hydrochloridu bylo rozpuštěno v 7 ml destilované vody. Oba roztoky byly smíchány při teplotě 20 °C a skladovány při teplotě 0 až 5 °C.

10 Příklad 9

Příprava roztoku thiamin–NaI₃ v etanol/voda 6/1

- 15 150 mg I₂ a 203 mg NaI bylo rozpuštěno v 25,7 ml ethanolu. 210 mg thiamin–hydrochloridu bylo rozpuštěno v 4,3 ml destilované vody. Oba roztoky byly smíchány při teplotě 20 °C a skladovány při teplotě 0 až 5 °C.

20 Příklad 10

Příprava roztoku thiamin–NaI₃ v etanol/voda 9/1

- 25 150 mg I₂ a 203 mg NaI bylo rozpuštěno v 27 ml ethanolu. 210 mg thiamin–hydrochloridu bylo rozpuštěno v 3 ml destilované vody. Oba roztoky byly smíchány při teplotě 20 °C a skladovány při teplotě 0 až 5 °C.

Příklad 11

30 Příprava lyofilizátů ethylester hyaluronanu–thiamin–I₃ (HA–B1–I₃)

- Do roztoku derivátu hyaluronanu připraveného podle příkladu 1 (0,4 g) ve 100 ml destilované vody a 0,5 ml kyseliny octové se přidalo 40 mg KI a 27 mg I₂ a směs se míchala 24 hodin při laboratorní teplotě. Do vzniklého roztoku byl pak přidán roztok 38 mg thiamin–hydrochloridu v 1 ml destilované vody a roztok byl po homogenizaci hned zamražen na –50 °C a lyofilizován. Množství aktivního jodu bylo stanoveno pomocí redukční titrace s thiosíranem sodným na 4,2 %.

40 Příklad 12

Příprava lyofilizátů benzylester hyaluronanu–thiamin–I₃ (HA–B1–I₃)

- 45 Do roztoku derivátu hyaluronanu připraveného podle příkladu 2 (0,4 g) v 100 ml destilované vody a 5 ml kyseliny octové se přidalo 40 mg KI a 27 mg b a směs se míchala 24 hodin při laboratorní teplotě. Do vzniklého roztoku byl pak přidán roztok 38 mg thiamin–hydrochloridu v 1 ml destilované vody a roztok byl po homogenizaci hned zamražen na –50 °C a lyofilizován. Množství aktivního jodu bylo stanoveno pomocí redukční titrace s thiosíranem sodným na 4%.

50

Příklad 13

Příprava lyofilizátů hyaluronan–thiamin–I₃ (HA–B1–I₃)

- 5 Do roztoku hyaluronanu (0,4 g, 500 kg.mol⁻¹) v 100 ml destilované vody a 1 ml kyseliny octové se přidalo 40 mg KI a 27 mg I₂ a směs se míchala 24 hodin při laboratorní teplotě. Do vzniklého roztoku byl pak přidán roztok 38 mg thiamin–hydrochloridu v 1 ml destilované vody a roztok byl po homogenizaci hned zamražen na –50 °C a lyofilizován. Množství aktivního jodu bylo stanoveno pomocí redukční titrace s thiosíranem sodným na 4 %.

10

Příklad 14

Příprava lyofilizátů hyaluronan–thiamin–I₃ (HA–B1–I₃)

15

- Do roztoku hyaluronanu (0,4 g, 500 kg.mol⁻¹) v 200 ml destilované vody a 2 ml kyseliny octové se přidalo 40 mg KI a 27 mg I₂ a směs se míchala 24 hodin při laboratorní teplotě. Do vzniklého roztoku byl pak přidán roztok 179 mg thiamin–hydrochloridu v 3 ml destilované vody a roztok byl po homogenizaci hned zamražen na –50 °C a lyofilizován. Množství aktivního jodu bylo stanoveno pomocí redukční titrace s thiosíranem sodným na 3,5 %.

20

Příklad 15

- 25 Příprava lyofilizátů hyaluronan–thiamin–I₃ (HA–B1–I₃)

Do roztoku hyaluronanu (0,4 g, 500 kg.mol⁻¹) v 100 ml destilované vody a 1 ml kyseliny octové se přidalo 40 mg KI a 27 mg I₂ a směs se míchala 24 hodin při laboratorní teplotě. Do vzniklého roztoku byl pak přidán roztok 36 mg thiamin–hydrochloridu v 1 ml destilované vody a roztok byl po homogenizaci hned zamražen na –50 °C a lyofilizován. Množství aktivního jodu bylo stanoveno pomocí redukční titrace s thiosíranem sodným na 3,5 %.

30

Příklad 16

35

Příprava lyofilizátů hyaluronan–thiamin–I₃ (HA–B1–I₃)

Do roztoku hyaluronanu (0,4 g, 80 kg.mol⁻¹) v 20 ml destilované vody a 0,1 ml kyseliny octové se přidalo 40 mg KI a 27 mg I₂ a směs se míchala 24 hodin při laboratorní teplotě. Do vzniklého roztoku byl pak přidán roztok 36 mg thiamin hydrochloridu v 1 ml destilované vody a směs byla po homogenizaci hned zamražena na –50 °C a lyofilizována. Množství aktivního jodu bylo stanoveno pomocí redukční titrace s thiosíranem sodným na 2 %.

40

- 45 Příklad 17

Příprava lyofilizátů hyaluronan–thiamin–I₃ (HA–B1–I₃) nános

Hyaluronan ve formě lyofilizátů byl úplně ponořen do roztoku NaI₃ v etanol/voda 3/1 (příklad 8) na 24 hodin při teplotě 20 °C. Pak byl lyofilizát ponořen do isopropanolu na 2 sekundy, vybrán a vysušen přiložením filtračního papíru z obou stran materiálu. Množství aktivního jodu bylo stanoveno pomocí redukční titrace s thiosíranem sodným na 1,5 %.

50

Příklad 18

Příprava lyofilizátů hyaluronan–thiamin–I₃ (HA–B1–I₃) nános

- 5 Hyaluronan ve formě lyofilizátů byl úplně ponořen do roztoku NaI₃ v etanol/voda 9/1 (příklad 10) na 24 hodin při teplotě 40 °C. Pak byl lyofilizát ponořen do isopropanolu na 2 sekundy, vybrán a vysušen přiložením filtračního papíru z obou stran materiálu. Množství aktivního jodu bylo stanoveno pomocí redukční titrace s thiosíranem sodným na 2 %.

10

Příklad 19

Příprava lyofilizátů hyaluronan–thiamin–I₃ (HA–B1–I₃) nános

- 15 Hyaluronan ve formě lyofilizátů byl úplně ponořen do roztoku KI₃ v etanol/voda 6/1 (příklad 6) na 10 minut při teplotě 40 °C. Pak byl lyofilizát ponořen do isopropanolu na 2 sekundy, vybrán a vysušen přiložením filtračního papíru z obou stran materiálu. Množství aktivního jodu bylo stanoveno pomocí redukční titrace s thiosíranem sodným na 1,5 %.

20

Příklad 20

Příprava lyofilizátů hyaluronan–thiamin–I₃ (HA–B1–I₃) nános

- 25 Hyaluronan ve formě lyofilizátů byl úplně ponořen do roztoku KI₃ v etanol/voda 9/1 (příklad 7) na 48 hodin při teplotě 5 °C. Pak byl lyofilizát ponořen do isopropanolu na 2 sekundy, vybrán a vysušen přiložením filtračního papíru z obou stran materiálu. Množství aktivního jodu bylo stanoveno pomocí redukční titrace s thiosíranem sodným na 2 %.

30

Příklad 21

Příprava lyofilizátů hyaluronan–thiamin–I₃ (HA–B1–I₃) nános

- 35 Hyaluronan ve formě lyofilizátů byl úplně ponořen do roztoku KI₃ v etanol/voda 3/1 (příklad 5) na 10 hodin při teplotě 20 °C. Pak byl lyofilizát ponořen do isopropanolu na 2 sekundy, vybrán a vysušen přiložením filtračního papíru z obou stran materiálu. Množství aktivního jodu bylo stanoveno pomocí redukční titrace s thiosíranem sodným na 1 %.

40

Příklad 22

Příprava lyofilizátů hyaluronan–thiazolium jodid–I₃ (HA–TH–I₃).

- 45 Do roztoku hyaluronanu (0,4 g, 500 kg.mol⁻¹) ve 100 ml destilované vody a 1 ml kyseliny octové se přidalo 40 mg KI a 27 mg b a směs se míchala 24 hodin při laboratorní teplotě. Do vzniklého roztoku byl pak přidán roztok 35 mg 5–(2–hydroxyethyl)–3,4–dimethylthiazolium jodidu v 1 ml destilované vody a roztok byl po homogenizaci hned zamražen na –50 °C a lyofilizován. Množství aktivního jodu bylo stanoveno pomocí redukční titrace s thiosíranem sodným na 3 %.

50

Příklad 23

Příprava lyofilizátů hyaluronan–benzylthiazolium bromid–I₃ (HA–BTH–I₃)

- 5 Do roztoku hyaluronanu (0,4 g, 500 kg.mol⁻¹) ve 100 ml destilované vody a 1 ml kyseliny octové se přidalo 40 mg KI a 27 mg I₂ a směs se míchala 24 hodin při laboratorní teplotě. Do vzniklého roztoku byl pak přidán roztok 37 mg 3–benzyl–5–(2–hydroxyethyl)–4–methylthiazolium bromidu v 1 ml destilované vody a roztok byl po homogenizaci hned zamražen na –50 °C a lyofilizován. Množství aktivního jodu bylo stanoveno pomocí redukční titrace s thiosíranem sodným na 3,5 %.

Příklad 24

- 15 Příprava lyofilizátů hyaluronan–oxythiamin–I₃ (HA–OB1–I₃)

- Do roztoku hyaluronanu (0,4 g, 500 kg.mol⁻¹) ve 100 ml destilované vody a 1 ml kyseliny octové se přidalo 4,0 mg KI a 2,7 mg I₂ a směs se míchala 24 hodin při laboratorní teplotě. Do vzniklého roztoku byl pak přidán roztok 45 mg oxythiamin–hydrochloridu v 1 ml destilované vody a roztok
20 byl po homogenizaci hned zamražen na –50 °C a lyofilizován. Množství aktivního jodu bylo stanoveno pomocí redukční titrace s thiosíranem sodným na 0,5 %.

Příklad 25

- 25 Příprava netkané textilie ze staplových vláken hyaluronan–thiamin–I₃ (HA–B1–I₃) nános

- 1% vodný roztok HA byl vytlačen skrz tryšku s vnitřním průměrem 0,6 mm do nestacionární koagulační lázně tvořené 100% isopropanolem o pokojové teplotě obtékající tryšku rychlostí
30 3 m.s⁻¹. Roztok je vysrážen do podoby vláken o délce 3 až 4 cm. Surová vlákna jsou krácena v mixéru po dobu 30 s při poměru 1 g vláken na 1 l koagulační lázně. Výsledná vláknenná disperze s délkou vláken 3 až 4 mm je zfiltrována přes substrát tvořený PAD pleteninou a vysušena na sušící desce umožňující tvarovou fixaci vzniklé textilie v průběhu sušení. Výsledná vrstva byla ze substrátu oddělena jako samonosná vrstva. Takto vzniklá textilie byla zformátována na
35 požadovanou velikost a ponořena do roztoku NaI₃ + B1 v etanol/voda 9/1 (příklad 10). Textilie byla umístěna na třpačku a vystavena působení roztoku NaI₃ + B1 60 minut při teplotě 20 °C a otáčkách třpačky 80 kmitů.min⁻¹. Takto upravená textilie je vysušena při laboratorní teplotě. Množství aktivního jodu bylo stanoveno pomocí redukční titrace s thiosíranem sodným na 1,8 %.

Příklad 26

- 45 Příprava netkané textilie ze staplových vláken z palmitoyl hyaluronanu–thiamin–I₃ (HA–B1–I₃) nános

- 1% roztok palmitoylu HA (příprava popsána v příkladu 4) rozpuštěného ve směsi vody a isopropanolu s objemovým poměrem 1:1 byl vytlačen skrz tryšku s vnitřním průměrem 0,6 mm do nestacionární koagulační lázně tvořené 90% isopropanolem o pokojové teplotě obtékající
50 tryšku rychlostí 3 m/s. Roztok je vysrážen do podoby vláken o délce 3 až 4 cm. Surová vlákna jsou dále dehydratována ve 100% acetonu a krácena v mixéru po dobu 10 sekund při poměru 0,9 g vláken na 1 l 100% isopropanolu. Výsledná vláknenná disperze s délkou vláken 3 až 4 mm je zfiltrována přes substrát tvořený PAD pleteninou a vysušena při teplotě 40 °C na sušící desce umožňující tvarovou fixaci vzniklé textilie v průběhu sušení. Výsledná vrstva byla ze substrátu
55 oddělena jako samonosná vrstva. Takto vzniklá textilie byla zformátována na požadovanou

velikost a ponořena do roztoku $\text{NaI}_3 + \text{B1}$ v etanol/voda 9/1 (příklad 10). Textilie byla umístěna na třepačku a vystavena působení roztoku $\text{NaI}_3 + \text{B1}$ 70 minut při teplotě 20 °C a otáčkách třepačky 80 kmitů/min. Takto upravená textilie je vysušena při laboratorní teplotě. Množství aktivního jodu bylo stanoveno pomocí redukční titrace s thiosíranem sodným na 1,5 %.

5

Příklad 27

Příprava nanovláknenné vrstvy hyaluronan–thiamin– I_3 (HA–B1– I_3) nános

10

Pro přípravu nanovláknenné vrstvy s obsahem kyseliny hyaluronové byl připraven vodný roztok s následujícím složením. Koncentrace HA o molekulové hmotnosti 82 kg.mol^{-1} v sušině byla 80 %, polyethylenoxid o molekulové hmotnosti 400 kg.mol^{-1} tvořil 5 %, polyvinylalkohol o molekulové hmotnosti 200 kg.mol^{-1} tvořil 15 %, celková koncentrace sušiny byla 6 %. Roztok byl naplněn do stříkačky a elektrostaticky zvlákněn na deskový kolektor za použití bezjehlové lineární trysky, napětí 45 kV a vzdálenosti 18 cm mezi emitorem a kolektorem. Vlákná mají rozměr 110 ± 27 nm. Tento materiál byl úplně ponořen do roztoku $\text{NaI}_3 + \text{B1}$ v etanol/voda 6/1 (příklad 9) na 48 hodin při teplotě 20 °C. Pak byl vybrán a ponořen do isopropanolu na 2 sekundy, vybrán a vysušen při laboratorní teplotě. Množství aktivního jodu bylo stanoveno pomocí redukční titrace s thiosíranem sodným na 8 %.

20

Příklad 28

Příprava samonosného filmu z hyaluronan–thiamin– I_3 (HA–B1– I_3) nános

25

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 240 mg hyaluronanu sodného o molekulové hmotnosti 330 kg.mol^{-1} byla rozpuštěna ve 24 ml demi-vody a ponechána míchat minimálně 18 hodin. 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 20 hodin. Po usušení byl film sejmут z podložky a uchován pro další použití. Tento materiál byl pak úplně ponořen do roztoku $\text{NaI}_3 + \text{B1}$ v etanol/voda 6/1 (příklad 9) na 72 hodin při teplotě 20 °C. Pak byl vybrán a ponořen do isopropanolu na 2 sekundy, vybrán a vysušen při laboratorní teplotě. Množství aktivního jodu bylo stanoveno pomocí redukční titrace s thiosíranem sodným na 0,1 %.

35

40

Příklad 29

Příprava samonosného filmu z palmitoyl hyaluronanu–thiamin– I_3 (palmHA–B1– I_3) nános

Zařízení pro přípravu filmů je popsáno v příkladu 27. Navážka 240 mg palmitoyl derivátu hyaluronanu sodného popsaného v příkladu 4 byla rozpuštěna ve 24 ml vodného roztoku 2–propanolu (50% w/w) a nechána míchat minimálně 18 hodin. 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 40 °C. Doba sušení byla 20 hodin. Po usušení byl film sejmут z podložky a uchován pro další použití. Tento materiál byl pak úplně ponořen do roztoku $\text{NaI}_3 + \text{B1}$ v etanol/voda 6/1 (příklad 9) na 72 hodin při teplotě 20 °C. Pak byl vybrán a ponořen do isopropanolu na 2 sekundy, vybrán a vysušen při laboratorní teplotě. Množství aktivního jodu bylo stanoveno pomocí redukční titrace s thiosíranem sodným na 0,2 %.

55

Příklad 30

Příprava samonosného filmu z lauroyl hyaluronanu–thiamin–I₃ (laurHA–B1–I₃) nános

- 5 Zařízení pro přípravu filmu je popsáno v příkladu 27. Navážka 240 mg lauroyl derivátu hyaluronanu sodného popsaného v příkladu 3 byla rozpuštěna ve 24 ml vodného roztoku 2–propanolu (50% w/w) a nechána míchat minimálně 18 hodin. 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 40 °C. Doba sušení byla 20 hodin. Po usušení byl film
- 10 sejmut z podložky a uchován pro další použití. Tento materiál byl pak úplně ponořen do roztoku NaI₃ + B1 v etanol/voda 6/1 (příklad 9) na 24 hodin při teplotě 20 °C. Pak byl vybrán a ponořen do isopropanolu na 2 sekundy, vybrán a vysušen při laboratorní teplotě. Množství aktivního jodu bylo stanoveno pomocí reduktivní titrace s thiosíranem sodným na 0,3 %.

15

Příklad 31

Příprava vrstvy ze staplových vláken hyaluronan–thiamin–I₃ (HA–B1–I₃) nános

- 20 Netkaná textilie byla vytvořena spojením staplových mikrovláken, která jsou připravována metodou mokrého zvlákňování v nestacionární koagulační lázni. Byla použita kyselina hyaluronová o molekulové hmotnosti 1000 kg.mol⁻¹. Koagulační lázeň je tvořena isopropanolem. Vysrážená vlákna byla pak mletím krácená, zfiltrována na substrát, sušena a lisována. Výsledná vrstva byla ze substrátu oddělena jako samonosná vrstva. Tento materiál byl pak úplně ponořen
- 25 do roztoku NaI₃ + B1 v etanol/voda 9/1 (příklad 10) na 1 hodinu při teplotě 20 °C. Pak byl vysušen při laboratorní teplotě. Množství aktivního jodu bylo stanoveno pomocí reduktivní titrace s thiosíranem sodným na 1,8 %.

30 Příklad 32

Příprava pleteniny z vláken hyaluronan–thiamin–I₃ (HA–B1–I₃) nános

- Pro tvorbu pleteniny bylo použito nekonečné vlákno z hyaluronanu o molekulové hmotnosti
- 35 600 kg.mol⁻¹ jemnost vlákna byla 10 tex, pevnost 1,1 N a tažnost 9,8 %. Tři vlákna byla sdružena a zakroucena 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 obouliční pletenina v trikotové vazbě s uzavřenými očky. Pletenina byla následně vyprána v ethanolu při teplotě 40 °C po dobu 20 min. Výsledný pruh pleteniny měl šířku 11 mm,
- 40 plošnou hmotnost 99 g.m⁻² a hustotu oček 36 cm⁻². Tento materiál byl pak úplně ponořen do roztoku KI₃ + B1 v etanol/voda 6/1 (příklad 6) na 24 hodin při teplotě 20 °C. Pak byl vybrán a ponořen do isopropanolu na 2 sekundy, vybrán a vysušen při laboratorní teplotě. Množství aktivního jodu bylo stanoveno pomocí reduktivní titrace s thiosíranem sodným na 0,1 %.

45

Příklad 33

Příprava pleteniny z vláken palmitoyl hyaluronan–thiamin–I₃ (palmHA–B1–I₃) nános

- 50 Pro tvorbu pleteniny bylo použito nekonečné vlákno z palmitoyl hyaluronanu o molekulové hmotnosti 320 kg.mol⁻¹ a stupni substituce 30 % (stanoveno pomocí NMR); jemnost vlákna byla 9 tex, pevnost 0,6 N a tažnost 21 %. Tři vlákna byla sdružena a zakroucena 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 obouliční pletenina v trikotové
- 55 vazbě s uzavřenými očky. Pletenina byla následně vyprána v ethanolu při teplotě 40 °C po dobu

20 min. Výsledný pruh pleteniny měl šířku 11 mm, plošnou hmotnost 91 g.m^{-2} a hustotu oček 36 cm^{-2} . Tento materiál byl pak úplně ponořen do roztoku $\text{KI}_3 + \text{B1}$ v etanol/voda 9/1 (příklad 7) na 15 hodin při teplotě 20°C . Pak byl vybrán a ponořen do isopropanolu na 2 sekundy, vybrán a vysušen při laboratorní teplotě. Množství aktivního jodu bylo stanoveno pomocí redukční titrace s thiosíranem sodným na 0,3 %.

Příklad 34

10 Příprava lyofilizátů alginát–thiamin– I_3

Do roztoku alginátu sodného ($0,4 \text{ g}$, 400 kg.mol^{-1}) ve 100 ml destilované vody a 1 ml kyseliny octové se přidalo 40 mg KI a 27 mg I_2 a směs se míchala 24 hodin při laboratorní teplotě. Do vzniklého roztoku byl pak přidán roztok 38 mg thiamin–hydrochloridu v 1 ml destilované vody a roztok byl po homogenizaci hned zamražen na -50°C a lyofilizován. Množství aktivního jodu bylo stanoveno pomocí redukční titrace s thiosíranem sodným na 4,4 %.

Příklad 35

20 Příprava lyofilizátů oxycelulóza–thiamin– I_3

Do roztoku oxycelulózy ($0,4 \text{ g}$, 50 kg.mol^{-1}) ve 100 ml destilované vody a 1 ml kyseliny octové se přidalo 40 mg KI a 27 mg I_2 a směs se míchala 24 hodin při laboratorní teplotě. Do vzniklého roztoku byl pak přidán roztok 38 mg thiamin–hydrochloridu v 1 ml destilované vody a roztok byl po homogenizaci hned zamražen na -50°C a lyofilizován. Množství aktivního jodu bylo stanoveno pomocí redukční titrace s thiosíranem sodným na 3,3 %.

30 Příklad 36

Příprava lyofilizátů hydroxyethylcelulóza–thiamin– I_3

Do roztoku hydroxyethylcelulózy ($0,4 \text{ g}$, 720 kg.mol^{-1}) ve 100 ml destilované vody a 1 ml kyseliny octové se přidalo 40 mg KI a 27 mg I_2 a směs se míchala 24 hodin při laboratorní teplotě. Do vzniklého roztoku byl pak přidán roztok 38 mg thiamin–hydrochloridu v 1 ml destilované vody a roztok byl po homogenizaci hned zamražen na -50°C a lyofilizován. Množství aktivního jodu bylo stanoveno pomocí redukční titrace s thiosíranem sodným na 6,1 %.

Příklad 37

45 Příprava lyofilizátů karboxymethylcelulóza–thiamin– I_3

Do roztoku karboxymethylcelulózy ($0,4 \text{ g}$, 250 kg.mol^{-1}) ve 100 ml destilované vody a 1 ml kyseliny octové se přidalo 40 mg KI a 27 mg I_2 a směs se míchala 24 hodin při laboratorní teplotě. Do vzniklého roztoku byl pak přidán roztok 38 mg thiamin–hydrochloridu v 1 ml destilované vody a roztok byl po homogenizaci hned zamražen na -50°C a lyofilizován. Množství aktivního jodu bylo stanoveno pomocí redukční titrace s thiosíranem sodným na 4,6 %.

Příklad 38

Příprava lyofilizátů oxycelulóza/hyaluronan–thiamin–I₃

- 5 Do roztoku oxycelulózy (0,3 g, 50 kg.mol⁻¹) a kyseliny hyaluronové (0,1 g, 500 kg.mol⁻¹) ve 100 ml destilované vody a 1 ml kyseliny octové se přidalo 40 mg KI a 27 mg I₂ a směs se míchala 24 hodin při laboratorní teplotě. Do vzniklého roztoku byl pak přidán roztok 38 mg thiamin–hydrochloridu v 1 ml destilované vody a roztok byl po homogenizaci hned zamražen na –50 °C a lyofilizován. Množství aktivního jodu bylo stanoveno pomocí redukční titrace s thiosíranem sodným na 4 %.

Příklad 39

- 15 Příprava lyofilizátů alginát/hyaluronan–thiamin–I₃

- Do roztoku alginátu sodného (0,3 g, 400 kg.mol⁻¹) a kyseliny hyaluronové (0,1 g, 500 kg.mol⁻¹) ve 100 ml destilované vody a 1 ml kyseliny octové se přidalo 40 mg KI a 27 mg I₂ a směs se míchala 24 hodin při laboratorní teplotě. Do vzniklého roztoku byl pak přidán roztok 38 mg thiamin–hydrochloridu v 1 ml destilované vody a roztok byl po homogenizaci hned zamražen na –50 °C a lyofilizován. Množství aktivního jodu bylo stanoveno pomocí redukční titrace s thiosíranem sodným na 4,3 %.

- 25 Příklad 40

Příprava lyofilizátů karboxymethylcelulóza/hyaluronan–thiamin–I₃

- 30 Do roztoku karboxymethyl celulózy (0,3 g, 250 kg.mol⁻¹) a kyseliny hyaluronové (0,1 g, 500 kg.mol⁻¹) ve 100 ml destilované vody a 1 ml kyseliny octové se přidalo 40 mg KI a 27 mg I₂ a směs se míchala 24 hodin při laboratorní teplotě. Do vzniklého roztoku byl pak přidán roztok 38 mg thiamin–hydrochloridu v 1 ml destilované vody a roztok byl po homogenizaci hned zamražen na –50 °C a lyofilizován. Množství aktivního jodu bylo stanoveno pomocí redukční titrace s thiosíranem sodným na 4,2 %.

35

Příklad 41

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

40

- Suspenze jednotlivých testovaných mikroorganismů byly připraveny o přibližné koncentraci 10⁵ CFU/ml. Na povrch trypton sojového agar v Petriho miskách bylo vyočkováno 100 μl suspenze (přibližný počet mikroorganismů aplikovaných na misku byl 10⁴ CFU). Suspenze byla 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 antimikrobiální látkou HA–B1–I₃, HA–TH–I₃ a HA–BTH–I₃, (připraveny podle příkladů 13,22,23), přičemž jako kontroly byly použity analogické lyofilizáty bez aktivní látky HA–TH, HA–BTH a samotná HA. Byly připraveny čtverečky o hmotnosti 15 až 20 mg a přibližných rozměrech 15 x 15 x 2 mm s obsahem trijodidu draselného 0,7 až 1,3 mg nebo bez jeho obsahu. Pro testování účinnosti byla zvolena difúzní plotnová metoda (2D uspořádání). Ke kultivaci byla použita neselektivní půda (trypton–sojový agar). Vzorky čtverečků byly testovány na 2 mikroorganismech – *Escherichia coli* (G– tyčinka) a *Staphylococcus aureus* (G+ koky). Z Obrázků 1 a 2 je jasné patrná výrazně vyšší účinnost lyofilizátů podle vynálezu ve srovnání s lyofilizáty bez trijodidu, resp. se samotnou HA.

55

Příklad 42

Testování snášenlivosti a vlivu na hojení rány (obrázek 3).

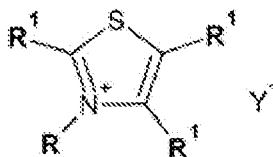
- 5 Cílem jednotýdenního sledování bylo porovnání efektu lyofilizátů HA-B1-I₃ (připraven podle příkladu 13) na průběh hojení rány. Studie byla zaměřena především na toleranci preparátu a srovnání jeho efektivity se standardním prostředkem pro hojení ran s prokázaným účinkem, což je krytí obsahující aktivní vrstvu, která je kombinací hyaluronanu a antimikrobiální látky oktenidinu (HA-oktenidin). Pro testování byla použita bandáž totožného složení jako u krytí HA-oktenidin, ale aktivní vrstva byla nahrazena lyofilizátem HA-B1-I₃. Studie byla provedena na nemocném, kde polovina rány byla vždy ošetřena bandáží obsahující lyofilizát HA-B1-I₃, (v obrázku 3 označena jako HyB₁) druhá polovina pak standardním krytím HA-oktenidin.

- 15 U pacienta byla bandáž tolerována bez negativních subjektivních i objektivních problémů. Průběh hojení během sledovaného týdenního období byl srovnatelný s hojením při použití preparátu HA-oktenidin. Známky infekčních nebo zánětlivých komplikací nebyly na ranách krytých preparátem HA-oktenidin i lyofilizátem HA-B1-I₃ zaznamenány. Je tedy možné konstatovat, že vliv nového komplexu HA-B1-I₃ je srovnatelný se standardně používaným krytím HA-oktenidin. Přípravek podle vynálezu je ve srovnání s přípravkem s oktenidinem výhodný zejména proto, že jód je ve srovnání s oktenidinem podstatně biokompatibilnější, a tudíž mnohem vhodnější např. pro implantovatelné materiály.

PATENTOVÉ NÁROKY

25

1. Antimikrobiální kompozice, **vyznačující se tím**, že obsahuje:
jeden nebo více polysacharidů a/nebo jeden nebo více chemicky modifikovaných derivátů polysacharidů,
30 stabilizátor obecného vzorce X,



vzorec (X),

35

kde R je – alkylový, aromatický, heteroaromatický, lineární nebo rozvětvený řetězec C₁ – C₃₀, volitelně s obsahem N nebo O atomů,

- 40 R¹ je – alkylový, aromatický, heteroaromatický, lineární nebo rozvětvený řetězec C₁ – C₃₀, volitelně s obsahem N nebo O atomů, nebo –H, přičemž R¹ ve stabilizátoru jsou nezávisle na sobě stejné nebo odlišné,

a Y je chloridový, bromidový nebo jodidový anion,

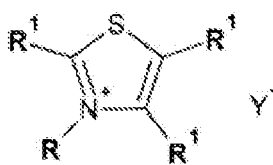
- 45 a trijodid sodný nebo draselný.

2. Kompozice podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že polysacharid nebo jeho chemicky modifikovaný derivát mají molekulovou hmotnost v rozmezí 5.10³ až 1.10⁶g.mol⁻¹ a jsou vybrány ze skupiny zahrnující kyselinu hyaluronovou, alginát sodný, oxycelulózu, karboxymethylcelulózu, hydroxyethylcelulózu nebo modifikovanou

50

kyselinu hyaluronovou, která má některé $-OH$ skupiny nahrazeny skupinou $-O-CO-R^2$ a/nebo některé $-CO-OH$ skupiny nahrazeny skupinou $-CO-OR^2$, kde R^2 je lineární nebo aromatický řetězec s obsahem uhlíků $C_1 - C_{15}$ nebo jejich směs.

- 5 3. Kompozice podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že stabilizátor je vybrán ze skupiny zahrnující thiamin, oxythiamin–hydrochlorid, 5–(2–hydroxyethyl)–3,4–dimethylthiazolium jodid a 3–benzyl–5–(2–hydroxyethyl)–4–methylthiazolium bromid.
- 10 4. Kompozice podle kteréhokoli z nároků 1 až 3, **vyznačující se tím**, že je v pevné formě vybrané ze skupiny zahrnující lyofilizát, samonosný film, netkanou textilií, nekonečné vlákno, tkaninu, pleteninu, splétanou textilií nebo vrstvu nanovláken.
- 15 5. Způsob přípravy kompozice definované v kterémkoli z nároků 1 až 4, **vyznačující se tím**, že stabilizátor obecného vzorce X



vzorec (X),

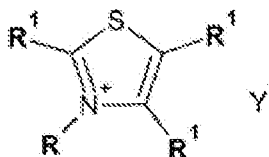
- 20 kde R je – alkylový, aromatický, heteroaromatický, lineární nebo rozvětvený řetězec $C_1 - C_{30}$,
volitelně s obsahem N nebo O atomů

R¹ je – alkylový, aromatický, heteroaromatický, lineární nebo rozvětvený řetězec C₁–C₃₀, volitelně s obsahem N nebo O atomů, nebo – H, přičemž R¹ ve stabilizátoru jsou nezávisle na sobě stejné nebo odlišné.

a Y je chloridový, bromidový nebo jodidový aniont,

a trijodid sodný nebo draselný se přidají do systému obsahujícího polysacharid a/nebo jeho chemicky modifikovaný derivát a/nebo směs polysacharidů a/nebo derivátů polysacharidů, načež se vytvoří finální forma kompozice.

- 35 6. Způsob přípravy kompozice podle nároku 5, **vyznačující se tím**, že trijodid sodný
polysacharidů a jejich derivátů, a stabilizátor obecného vzorce X, kde molární poměr
stabilizátor/trijodid je v rozsahu 1/1 až 5/1, s výhodou 1,1/1, jsou přidány do 0,2 až 6
40 % hmotn. roztoku polysacharidu a/nebo jeho chemicky modifikovaného derivátu
a/nebo směsi polysacharidů a/nebo jejich derivátů ve směsi rozpouštědel
voda/kyselina octová v objemovém poměru 20/1 až 200/1 s výhodou 100/1, a ze
vzniklé směsi je pak připravena příslušná finální forma kompozice.
7. Způsob přípravy kompozice definované v kterémkoli z nároků 1 až 4, **vyznačující se**
tím, že stabilizátor obecného vzorce X



vzorec (X),

kde R je – alkylový, aromatický, heteroaromatický, lineární nebo rozvětvený řetězec $C_1 - C_{30}$,
volitelně s obsahem N nebo O atomů,

R^1 je – alkylový, aromatický, heteroaromatický, lineární nebo rozvětvený řetězec $C_1 - C_{30}$,
volitelně s obsahem N nebo O atomů, nebo –H, přičemž R^1 ve stabilizátoru jsou nezávisle na
sobě stejné nebo odlišné,

a Y je chloridový, bromidový nebo jodidový aniont,

a trijodid sodný nebo draselný se aplikují ve formě roztoku ve směsi rozpouštědel etanol/voda na
hotovou formu zdravotnického prostředku na bázi polysacharidu nebo jeho chemicky
modifikovaného derivátu nebo směsi polysacharidů a/nebo jejich derivátů.

8. Způsob přípravy podle nároku 7, **vyznačující se tím**, že doba aplikace je 10 minut až
72 hodin a teplota je v rozmezí 5 až 40 °C.

9. Způsob přípravy kompozice podle nároku 7, **vyznačující se tím**, že aplikace se
provede sprejovým nástřikem roztoku nebo ponořením do roztoku na 5 až 15 hodin.

10. Způsob přípravy kompozice podle kteréhokoli z nároků 7 až 9, **vyznačující se tím**,
že trijodid je v roztoku v koncentraci 0,2 až 10 % hmotn., molární poměr
stabilizátor/trijodid je v rozsahu 1/1 až 5/1, s výhodou 1,1/1, a objemový poměr
ethanol/voda je v rozsahu 3/1 až 9/1.

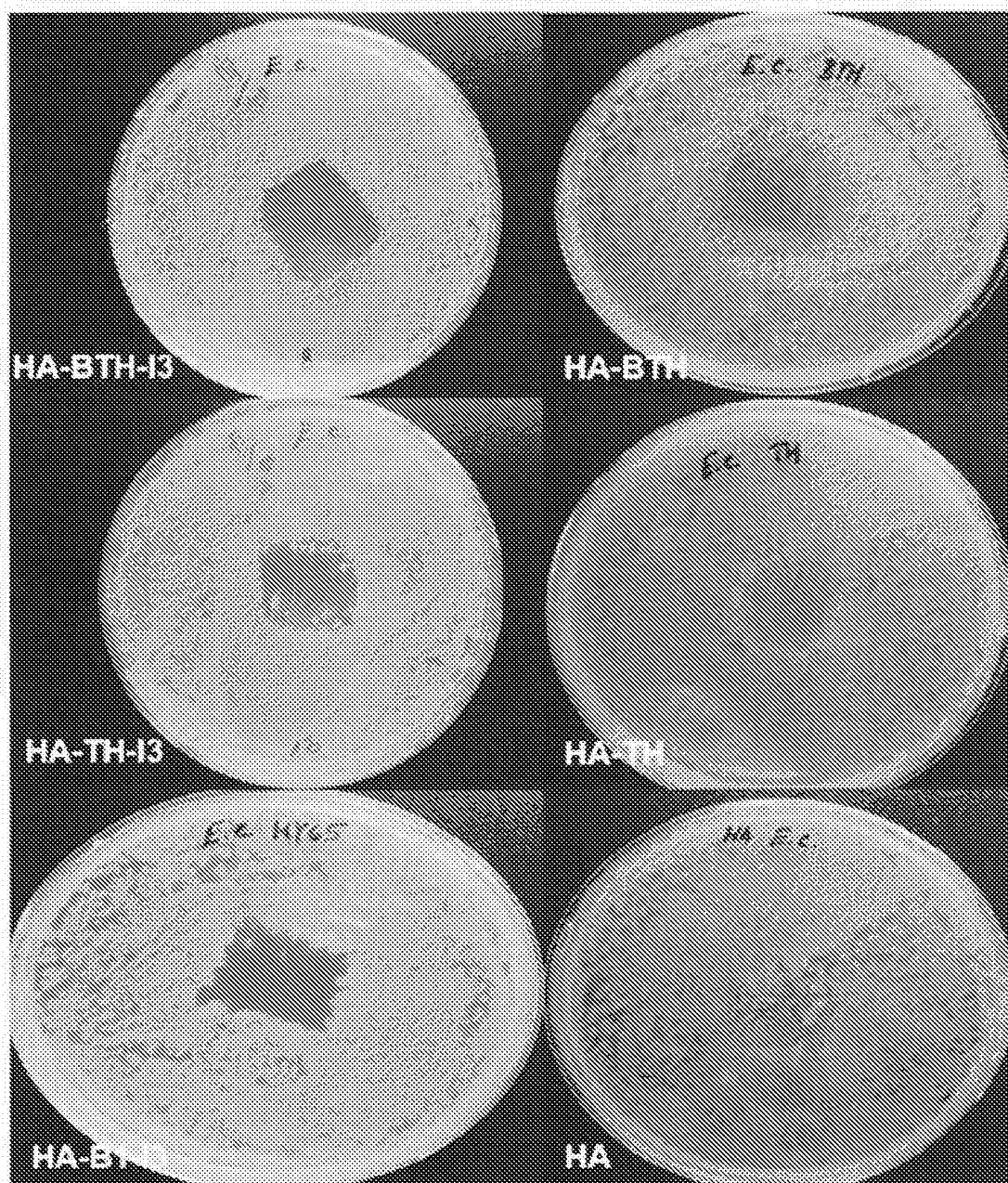
11. Způsob přípravy kompozice podle kteréhokoli z nároků 5 až 10, **vyznačující se tím**,
že finální forma kompozice zahrnuje lyofilizát, samonosný film, nanovláknennou
vrstvu, netkanou textilií, vlákno, pleteninu, tkaninu a splétanou textilií.

12. Zdravotnický prostředek, **vyznačující se tím**, že obsahuje antimikrobiální kompozici
definovanou v kterémkoli z nároků 1 až 4 a že je ve formě krytu ran nebo
implantabilního zdravotnického prostředku.

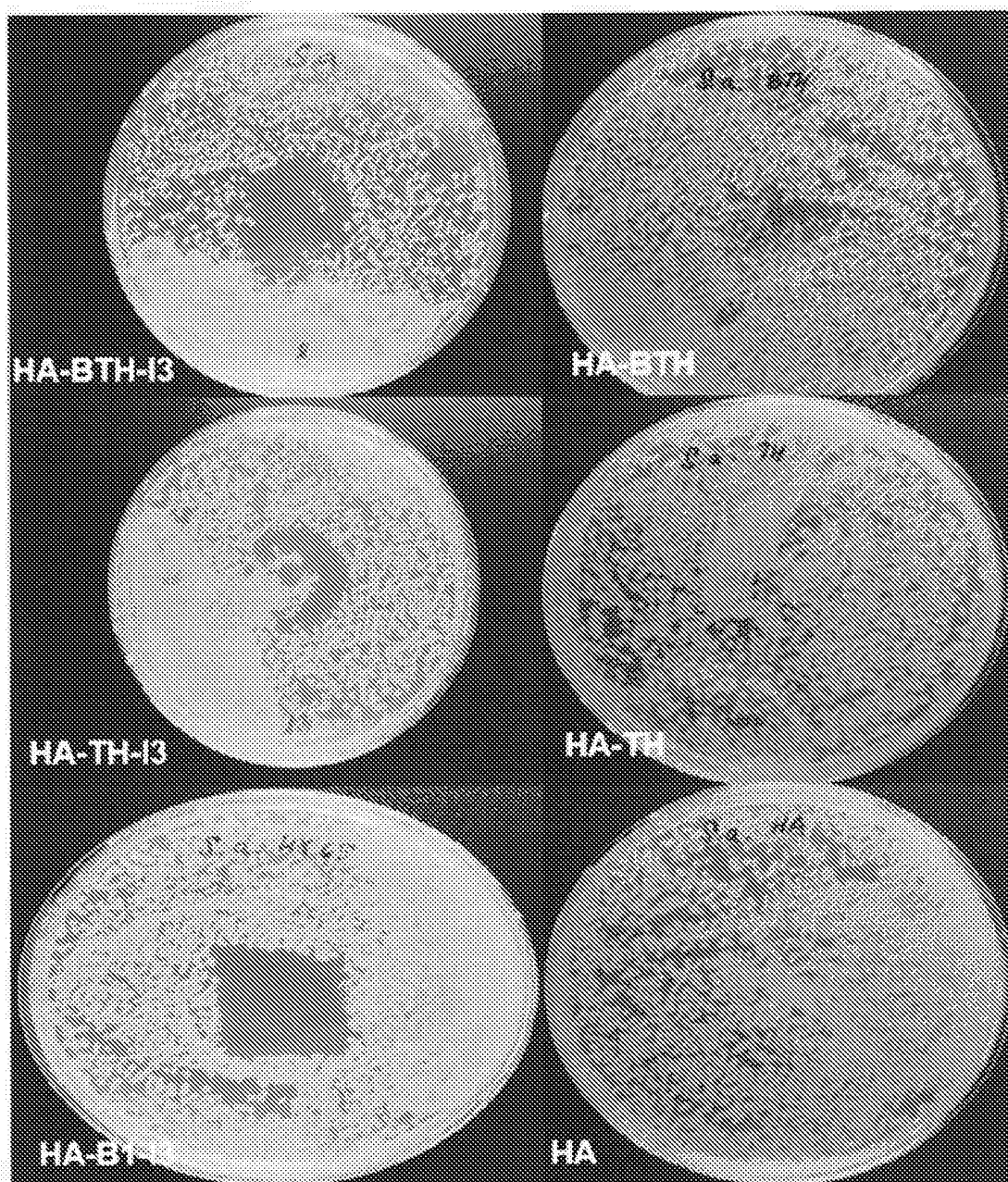
13. Použití kompozice definované v nárocích 1 až 4 pro přípravu krytů ran.

14. Použití kompozice definované v nárocích 1 až 4 pro přípravu implantabilních
zdravotnických prostředků.

3 výkresy



Obr. 1



Obr. 2



Obr. 3