PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(21) Číslo dokumentu:

2019-598

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.:

C08B 37/08	(2006.01)
C07J 9/00	(2006.01)
A61K 31/728	(2006.01)
A61K 47/36	(2006.01)
A61K 31/575	(2006.01)
A61P 27/04	(2006.01)

(19) ČESKÁ REPUBLIKA

ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **20.09.2019**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **31.03.2021**

(Věstník č. 13/2021)

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

(72) Původce:
Gloria Huerta Angeles, Česká Třebová, CZ
Martina Brandejsová, Letohrad, CZ
Kateřina Kopecká, Němčice, CZ
Tomáš Drmota, Letohrad, CZ
Matěj Šimek, Praha 2, Nové Město, CZ
Ferhat Yilmaz, 39750 Lüleburgaz/Kırklareli, TR
Jaromír Kulhánek, Pardubice, Bílé Předměstí, CZ
Hana Vágnerová, Dolní Čermná, CZ
Martina Hermannová, Žamberk, CZ
Ondřej Štrympl, Liberec, Liberec XVI-Nový Harcov, CZ
Jaroslav Novotný, Letohrad, CZ
Vladimír Velebný, Žamberk, CZ

(74) Zástupce:
Kania,Sedlák,Smola patentová a známková kancelář, Mgr. Martina Dvořáková, Mendlovo náměstí 907/1a, 603 00 Brno, Staré Brno

(54) Název přihlášky vynálezu:

Způsob přípravy esterového derivátu kyseliny hyaluronové mající rovnoměrnou distribuci substituentů, esterový derivát kyseliny hyaluronové, kompozice, která ho obsahuje a její použití

(57) Anotace:
Způsob přípravy esterového derivátu kyseliny hyaluronové, který má specifickou distribuci substituentů, esterový derivát kyseliny hyaluronové, kompozice, která ho obsahuje a jeho použití. Oční kompozice obsahující esterový derivát kyseliny hyaluronové a vodný dodávací systém k léčbě nebo prevenci stavů suchého oka.

CZ 2019 - 598 A3

Způsob přípravy esterového derivátu kyseliny hyaluronové mající rovnoměrnou distribuci substituentů, esterový derivát kyseliny hyaluronové, kompozice, která ho obsahuje a její použití

Oblast techniky

Způsob přípravy esterového derivátu kyseliny hyaluronové mající rovnoměrnou distribuci substituentů, esterový derivát kyseliny hyaluronové, kompozice, která ho a její použití. Oční kompozice obsahující esterový derivát kyseliny hyaluronové a vodný dodávací systém k léčbě nebo prevenci stavů suchého oka.

Stav techniky

Keratoconjunctivitis Sicca (KCS), identifikovaný jako nemoc suchého oka (v této přihlášce zkráceně DED), popisuje stavy, kdy oči již v podstatě neprodukují fyziologicky funkční slzný film jako u normálního zdravého oka. Když je složka slzného filmu ohrožena nedostatkem některých jejích složek nebo pokud se již netvoří jedna nebo více vrstev slzného filmu, pak je rohovka (vnější část oka) vystavena vysokému riziku poškození. DED ovlivňuje jak slzy, tak oční povrch a může vyvolat příznaky, které jsou v rozpětí od mírného očního nepohodlí až po značné snížení kvality života způsobené poškozením rohovky, sníženým viděním a bolestí (Fondi a kol, Journal of Ophthalmology Volume 2018, článek ID 4691417,7).

V léčbě DED je k dispozici celá řada léčebných možností, včetně topických lubrikantů nebo umělých slzných náhrad, mastí nebo gelů, topických očních sekretů, protizánětlivé terapie, biologických slzných náhrad, bodové okluze, ochranných brýlí a chirurgických zákroků (Bryan Chin Hou Ang, a kol., Sci Rep. 2017; 7: 9013).

Mezi nimi jsou užitečné oční kompozice o vysoké viskozitě pro prodloužení doby setrvání kompozic na očním povrchu, čímž poskytují trvalý účinek léčiva a zabraňují vysychání oka. Oftalmologické přípravky mohou zahrnovat polymery na bázi celulózy, jako je hypromelóza, hydroxyethylcelulóza a methylcelulóza a polymery na bázi vinylu, jako je polyvinylpyrrolidon a polyvinylalkohol a polymery kyseliny akrylové, jako je karboxyvinylový polymer v kompozici. Tato přidaná zahušťovací činidla umožňují dosáhnout viskozity od několika tisíc do několika desítek tisíc mPa·s, i když se používají v malých množstvích, jak je uvedeno ve známém stavu techniky (US2008298380A). Nedávná Cochraneova analýza nedokázala zjistit, zda různé volně prodejné umělé slzy poskytují „podobné úlevy od projevů a příznaků ve srovnání spolu s ostatními nebo s placebem“. Bylo však zjištěno, že umělé slzy na bázi 0,2 % kyseliny polyakrylové jsou účinnější než 1,4 % umělé slzy na bázi polyvinylalkoholu (Pucker AD, Ng SM, Nichols JJ. Over the counter (OTC) artificial tear drops for dry eye syndrome. Cochrane Database Syst Rev (2016) 2: CD009729).

Běžně používaný polymer v lubrikačních očních kapkách je hyaluronát sodný nebo kyselina hyaluronová (HA). Hyaluronan (HA) známý také jako kyselina hyaluronová je přirozeně se vyskytující polymer sestávající z jednotek kyseliny D-glukuronové (GlcA) a N-acetyl-D-glukosaminu (GlcNAc) spojených střídavými β-(1→4)- a β (1→3)- glykosidickými vazbami, respektive.

Pro terapii suchého oka se koncentrace HA v očních kapkách pohybují od 0,1 % do 0,4 %. HA získala široké uplatnění v lubrikantech používaných k léčbě DED, protože účinně váže vodu, odolává dehydrataci a vykazuje vynikající biokompatibilitu. Kromě toho bylo podávání 0,1 %, 0,18 % a 0,3 % HA účinné ve zlepšování klinických příznaků, včetně doby rozpadu slzného filmu (TBUT) a skóre barvení rohovky, u DED. 0,3 % HA očních kapek umělých slz je tedy účinnějších než 0,1 % a 0,18 % HA očních kapek pro zlepšování nestability slzného filmu a barvení a

nepravidelnosti očního povrchu, při zvyšování hustoty spojivkových pohárkových buněk a při snižování apoptózy rohovkového epitelu u DED. Proto 0,3 % HA může být nejúčinnější mezi různými HA umělými slzami (J. Ocul. Pharmacol. Ther. 2018 1. října; 34 (8): 557–564). Například HA (molekulová hmotnost přibližně 300000 g/mol) byla připravena v 0,15 % roztoku ve fosfátem pufrovaném solném roztoku při pH 7,3 a osmolaritě 0,285 Osm / l. Dynamická viskozita roztoku byla 30 centipoise (cps). Referenčním nebo kontrolním lékem byl fyziologický roztok chloridu sodného 0,9 % (hm./obj.). HA má tedy příznivý účinek na spojivkový epitel (Br J Ophthalmol. 2002 únor; 86 (2): 181–184). Dosavadní stav techniky popisuje, že hydrodynamická a reologická hodnocení komerčních produktů na bázi HA odhalují molekulové hmotnosti kolísající od přibližně 200000 do přibližně 1200000 g/mol.

Hodnoty viskozity byly stanoveny v rozmezí 3,7 až 24,2 mPa s. Viskozita 5 až 20 centipoise (cPs) za sterilních podmínek byla uvedena v US patentu č. 6,432,934. Potom by většina produktů mohla být optimalizována z hlediska fyzikálně-chemického na odolnost vůči odtoku z povrchu oka. Kromě toho je rozhodující účinek délky a koncentrace polymerního řetězce. Většina produktů (Bluyal, Blugel, Hyabak, Artelac) měla ekvivalentní distribuční šířku (Mw/Mn = 1,6) a Hyalistil Bio a Octilia Natural vykazovaly vyšší polydisperzitu (Mw/Mn 1,9 a 2,1, v tomto pořadí). Kromě toho byly hodnoty koncentrace HA shodné s hodnotami uvedenými v příbalových letácích, tj. Bluyal (vícedávková láhev, 8 ml, HA 0,15 %), Blugel (vícedávková láhev, 8 ml, HA 0,30 %), Hyabak (vícedávková láhev, 10 ml; HA 0,15 %,) Artilect Splash MDSC (vícedávková láhev, 10 ml HA 0,24 %,) Hyalistil Bio (vícedávková láhev, 10 ml, 0,2 %) a Octilia Natural (10 lahviček s jednou dávkou x 0,5 ml). Taková koncentrace se pohybuje od 0,3 (hm.%) pro 1 100 000 g / mol HA do 0,6 (hm.%) pro 200 000 g / mol HA. Zejména Blugel měl nejoptimalizovanější „viskozitu s nulovým smykem (24,2 m Pas)“. Proto byla tato hodnota viskozity vybrána jako cílová hodnota pro optimalizační studie (Salzillo R. a kol., Carbohydr. Polym. 2016 20. listopadu; 153: 275-283).

Různé vzorky mající stejnou molekulovou hmotnost také vykazují stejnou vnitřní viskozitu. Stejný trend byl zjištěn pro hydrodynamický poloměr. Hodnoty koncentrace HA byly konzistentní s hodnotami uvedenými v příbalových letácích. Konformační informace lze také odvodit z analýz SEC-TDA a stejného hydrodynamického objemu a stejného uspořádání (konformace) v roztoku (La Gatta, M. Analytical Biochemistry, 404 (2010), s. 21-29). A konečně, hydrodynamické analýzy potvrdily omezené údaje podávané o rozsahu molekulových hmotností a koncentrací polymerů, s nimiž se obecně setkáváme ve výrobcích na trhu (Guillaumie a kol., 2010, Johnson a kol., 2006, Liu a kol., 2014, McDonald a kol. al., 2002).

Oční kapky jsou dostupné ve formách vodných a olejových roztoků, emulzí nebo suspenzí jedné nebo více aktivních složek, které mohou obsahovat konzervační látky, pokud jsou skladovány ve vícenásobném balení. Tyto formy jsou sterilní a izotonické. Optimální pH pro oční kapky se rovná pH slzné tekutiny a je asi 7,4. Kompozice mohou dále obsahovat látky zvyšující penetraci v očních léčivech, aby zvýšily jejich absorpci rohovkou pomocí modifikování kontinuity struktury epitelu rohovky. Výzkum ukázal, že tyto vlastnosti se projevují pomocí chelatačních činidel, konzervačních látek (jako je benzalkoniumchlorid), povrchově aktivních látek a solí žlučových kyselin. Tyto látky však vykazovaly lokální toxicitu, která způsobila omezení jejich použití v očních lékových formách. Kromě toho existují polotuhé a pevné oční formy a oční vložky. Hlavními faktory, které omezují použití vložek v terapii, však stále zůstává neochota pacientů opustit tradiční lékové formy, pocit cizího těla v oku a sporadické selhání při používání a zavádění vložek, jako je nepovšimnuté vylučování z oka.

Pro odborníky v dané oblasti je tedy zřejmé, že oční kompozice mají dobře definované vlastnosti, které splňují farmaceutické požadavky, jako být schopný dodávat účinné koncentrace očních léků po prodlouženou dobu pobytu a vylučovat takové vedlejší účinky, jako jsou například rozmazání, podráždění nebo pocit cizího těla. Kromě toho by složení mělo být uživatelsky přívětivé.

Síťování kyseliny hyaluronové (HA) do poly(2-hydroxyethylmethakrylátu) (pHEMA), látky podobné silikonovému hydrogelu nebo polymethylmethakrylátu (PMMA), také snižuje rychlost

ukládání proteinu ve srovnání s neošetřenými látkami (Contact Lens & Anterior Eye 35 (2012) 53–64). Jedním z nejvíce omezujících faktorů pro širší aplikaci HA jsou vysoké náklady (C. S. A. Musgrave a kol., Materials 2019, 12, 261).

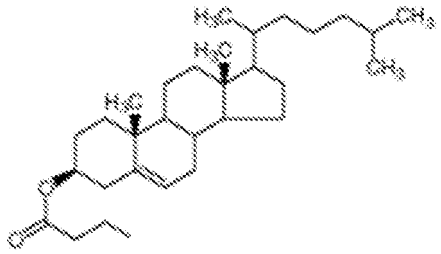
Účinek očních kapek hyaluronátu sodného při léčbě těžké keratokonjunktivitidy sicca (KCS) byl hodnocen v dvojité krycí křížené studii, kdy byl porovnán účinek 0,1 % roztoku, 0,2 % roztoku a placeba. Vzhledem k tomu, že pacienti významně preferují léčbu hyaluronátem sodným, zdá se, že oční kapky jsou cenným novým činidlem v léčbě KCS (Sand BB, Marner K, Norn MS. Sodium hyaluronate in the treatment of keratoconjunctivitis sicca. A double masked clinical trial. Acta Ophthalmologica, 1989;67:181–3.).

Kromě toho nízká biologická dostupnost (asi 5 %) běžných očních ošetření, jako jsou oční kapky, je předmětem zájmu o účinné léčení (Lang, JC Ocular drug delivery conventional ocular compositions. Adv. Drug Deliv. Rev. 1995, 16, 39–43).

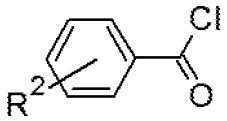
Podstata vynálezu

Nevýhody dosavadního stavu techniky, jak je uvedeno výše, byly vyřešeny vývojem způsobu přípravy ve vodě rozpustného esterového derivátu HA, který je použitelný v medicíně, s výhodou pro léčbu nebo prevenci očních chorob nebo očních stavů, výhodněji suchých očních stavů; v kosmetice nebo regenerativní medicíně.

Předmět vynálezu se týká způsobu přípravy ve vodě rozpustného esterového derivátu kyseliny hyaluronové nebo její farmaceuticky přijatelné soli, kde karboxylová kyselina obecného vzorce (I), R^1COOH, kde R^1 je C_xH_y, zatímco x je celé číslo v rozmezí 10 až 17 a y je celé číslo 19 až 36, kde C_xH_y je lineární nebo rozvětvený, nasycený nebo nenasycený alifatický řetězec C_{12}-C_{31} nebo R^1 je ester sukcinyl cholesterolu vzorce



je aktivována substituovaným nebo nesubstituovaným benzoylchloridem nebo jeho deriváty obecného vzorce II

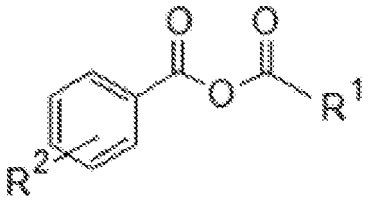


(II),

kde R^2 je jeden nebo více substituentů vybraných ze skupiny obsahující H, $-NO_2$, -COOH, halogenidy, C_1-C_6 alkylkoxy, s výhodou halogenidy, methoxy nebo ethoxy, výhodněji Cl;

v přítomnosti organické báze, s výhodou terciárního aminu, výhodněji triethylaminu, diisopropylethylaminu nebo N, N-diisopropylethylaminu; a etherové rozpouštědlo vybrané ze skupiny obsahující tetrahydrofuran (THF), dioxan (DX) za vzniku

reaktivního anhydridu obecného vzorce III



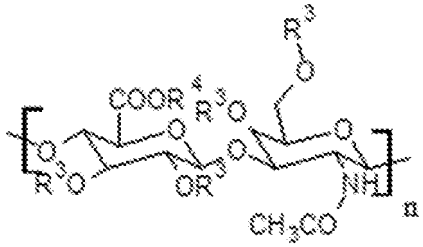
(III),

kde

R^1 a R^2 jsou, jak je definováno výše

který reaguje s kyselinou hyaluronovou nebo její farmaceuticky přijatelnou solí v množství 0,5 až 1,5 % (hm./obj.),

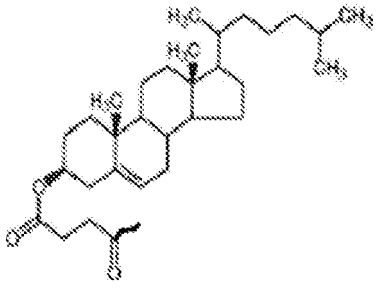
v přítomnosti organické báze, s výhodou terciárního aminu, výhodněji triethylaminu, diisopropylethylaminu nebo N, N-diisopropylethylaminu; směs vody a etherového rozpouštědla mísitelného s vodou vybraného ze skupiny obsahující tetrahydrofuran (THF), dioxan (DX), a v přítomnosti organokatalyzátoru, kterým je dimethylaminopyridin (DMAP), za vzniku esterového derivátu kyseliny hyaluronové, který má rovnoměrnou distribuci substituentů obecného vzorce IV



(IV),

kde n je celé číslo v rozmezí 500 až 1000 dimerů,

R^3 je nezávisle H nebo COR^3, kde R^3 je C_xH_y, zatímco x je celé číslo v rozmezí 10 až 17 a y je celé číslo 19 až 36, kde C_xH_y je lineární nebo rozvětvený, nasycený nebo nenasycený C_{12}-C_{31} alifatický řetězec nebo R^3 je zbytek esteru sukcinyl cholesterolu vzorce V



(V),

kde ~ je v místě kovalentní vazby zbytku esteru sukcinyl cholesterolu vzorce V,

za předpokladu, že alespoň dva R^3 derivátu jsou COR^3;

R^4 je H^+ nebo farmaceuticky přijatelná sůl.

Podle výhodného provedení způsobu podle tohoto vynálezu se aktivace karboxylové kyseliny provádí při teplotě v rozmezí 20 ° C až 60 ° C, s výhodou při 20 ° C až 30 ° C; po dobu 1 minuty až 0,5 hodiny, s výhodou 10 minut až 0,5 hodiny.

Podle výhodného provedení způsobu podle tohoto vynálezu je množství etherového rozpouštědla při aktivaci karboxylové kyseliny 30 % až 70 % obj./obj. z celkového objemu roztoku, s výhodou 50 % obj./obj. z celkového objemu roztoku.

Podle výhodného provedení způsobu podle tohoto vynálezu je množství DMAP 1 % až 10% hm./obj. celkového objemu roztoku, s výhodou 5 % hm./obj. celkového objemu roztoku.

Podle dalšího výhodného provedení způsobu podle tohoto vynálezu vznik esterového derivátu kyseliny hyaluronové nebo její farmaceuticky přijatelné soli probíhá při teplotě 25 ° C až 60 ° C, s výhodou 25 ° C až 35 ° C, výhodněji 25 ° C; po dobu 1 až 3 hodin, s výhodou 2 hodiny.

Podle dalšího výhodného provedení způsobu podle tohoto vynálezu množství reaktivního anhydridu smíchaného s kyselinou hyaluronovou nebo její solí odpovídá 0,5 až 2,5 molárním ekvivalentům, s výhodou 0,8 až 1,5 ekvivalentům, výhodněji 1,0 molárním ekvivalentům na dimer kyseliny hyaluronové nebo její soli.

Podle dalšího výhodného provedení způsobu podle tohoto vynálezu odpovídá množství organické báze 2 až 6 molárním ekvivalentům, s výhodou 4 molárním ekvivalentům na dimer kyseliny hyaluronové nebo její soli;

množství substituovaného nebo nesubstituovaného benzoylchloridu odpovídá 0,1 až 2 molárním ekvivalentům, s výhodou 1 molárnímu ekvivalentu na dimer kyseliny hyaluronové nebo její soli; množství mastné kyseliny odpovídá 0,1 až 2,0 molárním ekvivalentům, s výhodou 1,0 molárnímu ekvivalentu kyseliny hyaluronové nebo její farmaceuticky přijatelné soli.

Podle dalšího výhodného provedení způsobu podle tohoto vynálezu je množství vody ve směsi voda a etherové rozpouštědlo mísitelné s vodou 90 až 40 % obj./obj., s výhodou 50 % obj./obj.

Podle dalšího výhodného provedení způsobu podle tohoto vynálezu je průměrná molekulová hmotnost kyseliny hyaluronové nebo její farmaceuticky přijatelné soli v rozmezí 6000 g/mol až 1600000 g/mol, s výhodou 200000 g/mol až 700000 g/mol, výhodněji 200000 až 400000 g/mol, nejlépe 300000 g/mol.

Esterový derivát kyseliny hyaluronové rozpustný ve vodě, který má rovnoměrnou distribuci substituentů nebo jeho farmaceuticky přijatelná sůl obecného vzorce IV připravený výše popsaným způsobem.

Podle dalšího výhodného provedení podle tohoto vynálezu je průměrná molekulová hmotnost esterového derivátu kyseliny hyaluronové nebo její farmaceuticky přijatelné soli obecného vzorce IV v rozmezí 100000 g/mol až 700000 g/mol, výhodněji 200000 g / mol až 400000 g/mol, ještě výhodněji 300000 g/mol.

Podle dalšího výhodného provedení podle tohoto vynálezu je esterový derivát kyseliny hyaluronové nebo její farmaceuticky přijatelné soli obecného vzorce IV, jehož stupeň substituce (DS_{GC}) je v rozmezí 8,0 až 12,5 %, výhodněji 8,5 až 9,5%.

Kompozice (s výhodou farmaceutická nebo oční kompozice) obsahuje alespoň jeden esterový derivát kyseliny hyaluronové nebo její farmaceuticky přijatelné soli podle tohoto vynálezu, s výhodou je vybrán ze skupiny obsahující lauryl hyaluronan, oleyl hyaluronan.

Podle dalšího výhodného provedení kompozice podle tohoto vynálezu je množství esterového derivátu kyseliny hyaluronové nebo jeho farmaceuticky přijatelné soli v rozmezí od 0,01 % hm. do 0,6 % hm., výhodněji od 0,15 do 0,25 % hm., nejlépe 0,2 % hm.

Podle dalšího výhodného provedení kompozice podle tohoto vynálezu je její pH v rozmezí 6,6 až 7,8, s výhodou 7,2.

Podle dalšího výhodného provedení kompozice podle tohoto vynálezu je její průměrná osmolalita v rozmezí od 300 do 350 mOsmol/litr, s výhodou 320 mOsmol/litr.

Podle dalšího výhodného provedení kompozice podle tohoto vynálezu je viskozita kompozice v rozmezí od 25 do 100 mPa.s, měřeno při η = 10/s až 3,0 až 12 mPa.s, měřeno při η = 1000/s.

Podle dalšího výhodného provedení kompozice podle tohoto vynálezu dále obsahuje kyselinu hyaluronovou nebo její farmaceuticky přijatelnou sůl, která má průměrnou molekulovou hmotnost v rozmezí 200000 až 1600000 g / mol, s výhodou 1300000 g / mol.

Podle dalšího výhodného provedení kompozice podle tohoto vynálezu obsahuje navíc kyselinu hyaluronovou nebo její farmaceuticky přijatelnou sůl, která má průměrnou molekulovou hmotnost 1300000 g / mol a 300000 g / mol esterového derivátu kyseliny hyaluronové obecného vzorce IV v hmotnostním poměru, který je v rozmezí 6:4, 7:3 nebo 8:2, pokud jde o množství esterového derivátu kyseliny hyaluronové nebo jeho farmaceuticky přijatelné soli, s výhodou 8:2.

Podle dalšího výhodného provedení kompozice podle tohoto vynálezu je viskozita kompozice v rozmezí od 25 do 100 mPa.s, měřeno při η = 10/s až 3,0 až 12 mPa.s, měřeno při η = 1000/s.

Podle dalšího výhodného provedení kompozice podle tohoto vynálezu je to sterilní a/nebo izotonický vodný roztok, s výhodou ve formě očních kapek nebo víceúčelového roztoku pro kontaktní čočky; olejový roztok, emulze, s výhodou nanoemulze obsahující micely nebo suspenze.

Vynález poskytuje s výhodou sterilní oční kompozici obsahující roztok esterového derivátu HA (nebo esterifikovaného HA derivátu). HA znamená kyselinu hyaluronovou nebo její farmaceuticky přijatelnou sůl (hyaluronan). Roztoky jsou izotonické, průzračné a čiré a hodnota pH je mezi 7,0 a 7,6, které jsou podobné slzné tekutině, aby se zabránilo podráždění očí a poskytla oční lubrikace a pohodlí. Esterifikovaný derivát HA je přítomen v kompozici, která se používá k léčbě nebo prevenci suchého oka. Kompozice může případně obsahovat farmaceuticky přijatelný nosič na bázi farmaceuticky přijatelné formě HA.

Za prvé, značnou výhodou kompozice používající esterový derivát kyseliny hyaluronové, který má rovnoměrnou distribuci substituentů, je použití nízké koncentrace derivátu (0,1 až 0,6 % hm., s výhodou 0,15 % hm.) bez diskomfortu nebo pocitu rozostření a zlepšení životaschopnosti a funkčnosti. Za druhé, je to možnost zapouzdření účinných látek a jejich rozpustnost ve vodě, čímž se dosáhne lepší funkčnosti.

Podle dalšího výhodného provedení kompozice podle tohoto vynálezu obsahuje pufr pro úpravu správného pH vybraného ze skupiny zahrnující tris (tris (hydroxymethyl) aminomethan), hydroxid sodný, histidin, tricin, lysin, glycin, serin, fosfát, acetátový, citrátový nebo borátový pufr, přičemž množství pufru je v rozmezí 0,025 mol/l až 1 mol/l, s výhodou v rozmezí 0,125 mol/l až 0,175 mol/l;

a/nebo obsahuje regulační činidlo osmotického tlaku, které je vybráno ze skupiny zahrnující sorbitol, mannitol, ethylenglykol, propylenglykol, dextrózu, trometamol (tris (hydroxymethyl) aminomethan) nebo tetralosu, přičemž množství regulačního činidla je v rozmezí 0,04 až 0,12 mol/l, s výhodou 0,08 mol/l;

a/nebo obsahuje farmaceuticky přijatelnou sůl vybranou ze skupiny zahrnující chlorid alkalických kovů nebo chlorid kovů alkalických zemin, s výhodou chlorid sodný, chlorid draselný, přičemž množství farmaceuticky přijatelné soli je v rozmezí 0,05 až 0,3 mol/l , s výhodou 0,15 mol/l.

Podle dalšího výhodného provedení kompozice podle tohoto vynálezu obsahuje kyselou složku, s výhodou kyselinu chlorovodíkovou, přičemž množství kyselé složky je v rozmezí 0,03 až 0,01 mol/l, s výhodou 0,025 mol/l.

Podle dalšího výhodného provedení kompozice podle tohoto vynálezu obsahuje konzervační činidlo, s výhodou benzalkoniumchlorid, přičemž množství kyselé složky je v rozmezí 0,005 až 0,05 hm.%, s výhodou 0,01 hm.%.

Výhodnější kompozice s výhodou oční kompozice podle tohoto vynálezu ve formě roztoku, s výhodou isotonický roztok obsahuje

Lauryl hyaluronát sodný (HA-C12)	0,10 až 0,6 hm. %
Kyselina chlorovodíková	0,01 obj. %
Chlorid sodný	0,2 hm. %
Chlorid draselný	0,14 hm %
Trehalóza	3 hm. %
Tromethamol	0,12 hm. %
Přečištěná voda Q.S	do 250 ml.

Výhodnější kompozice s výhodou oční kompozice podle tohoto vynálezu ve formě roztoku, s výhodou isotonický roztok obsahuje

Lauryl hyaluronát sodný (HA-C12)	0,10 až 0,6 hm. %
Hyaluronát sodný	0,1 až 0,2 hm. %
Kyselina boritá	0,20 obj./obj.
Chlorid sodný	0,58 hm.%
Chlorid draselný	0,14 hm.%
Trehalóza	3 hm.%
Tromethamol	0,5 hm.%
Přečištěná voda Q.S	do 100 ml.

Výhodnější kompozice s výhodou oční kompozice podle tohoto vynálezu ve formě roztoku, s výhodou isotonický roztok obsahuje

Lauryl hyaluronát sodný (HA-C12)	0,10 až 0,6 hm. %
Kyselina boritá	0,20 obj./obj.

Chlorid sodný	0,58 hm. %
Dihydrogenfosforečnan sodný	0,15 hm. %
Trehalóza	3 hm.%
Tromethamol	1 hm.%
Chlorid benzalkonia	0,01 hm. %
Přečištěná voda Q.S	do 100 ml.

Výhodnější kompozice s výhodou oční kompozice podle tohoto vynálezu ve formě roztoku, s výhodou isotonický roztok obsahuje

Lauryl hyaluronát sodný (HA-C12)	0,10 až 0,6 % hm. %
Chlorid sodný	0,9 hm. %
Trehalóza	2,8 hm. %
mannitol	1 hm.%
Chlorid benzalkonia	0,01 hm. %
Přečištěná voda Q.S	do 100 ml.

Výhodnější kompozice podle tohoto vynálezu ve formě roztoku, s výhodou isotonický roztok obsahuje

Lauryl hyaluronát sodný (HA-C12)	0,10 až 0,6 hm. %
Chlorid sodný	0,99 hm.%
Chlorid draselný	0,01 hm. %
sorbitol	5 hm.%
Tromethamol	1 hm.%
Hydrogenfosforečnan sodný	0,5 hm.%
Fosforečnan draselný	0,015 hm.%
Přečištěná voda Q.S	do 100 ml.

Kompozice podle tohoto vynálezu je užitečná v medicíně, s výhodou pro léčení nebo prevenci očních chorob nebo očních stavů, výhodněji suchých očních stavů; v kosmetice nebo regenerativní medicíně.

Přestože role nativního hyaluronanu jako přírodního lubrikantu a jeho vynikající vlastnosti zadržující vodu, činí ho vhodným pro použití v oftalmických přípravcích; srovnávací účinnost přípravků HA a bez-HA při symptomatické úlevě u subjektů nemohla prokázat nadřazenost jednoho přípravku oproti druhému. Protože účinek HA na onemocnění suchého oka zůstává nejasný (Kong a kol., Curr Med Res Opin. 2016;32(3):477–84). Kromě toho je žádoucí, aby HA

mohla nést a/nebo dodávat terapeutická činidla užitečná při léčbě suchého oka. V této přihlášce byla tedy HA chemicky modifikována v jednom kroku acylací. Za prvé, aby se prodloužil poločas rozpadu polysacharidu a aby se dodala amfifilita molekule.

Molekulová hmotnost esterifikovaného HA derivátu obecného vzorce IV obsaženého v kompozici podle tohoto vynálezu je v rozmezí 6000 g/mol až 100000 g/mol, s výhodou 10000 g/mol až 40000 g/mol, ale výhodněji je 30000 g/mol. Konkrétněji je Mw mezi 10000 až 20 000 g/mol, s výhodou přibližně 15000 g/mol je zvláště užitečná pro zapouzdření účinných látek, užitečná v medicíně, s výhodou pro léčení nebo prevenci očních chorob nebo očních stavů v důsledku tvorby nanomicel nebo nanomicelárních kompozic obsahujících micely o velikosti v rozmezí 30 až 300 nm, výhodněji 100 nm. V dalším aspektu podle tohoto vynálezu, molekulová hmotnost (Mw) hyaluronanu s výhodou užitečná pro přípravu kompozic pro suché oko podle způsobu popsaného v tomto vynálezu, je 100000 g/mol až 1600000 g/mol, výhodněji od 200000 g/mol až 800000 g/mol, ještě výhodněji 200000 g/mol až 400000 g/mol.

Esterifikovaný derivát HA podle tohoto vynálezu je derivát obecného vzorce IV, který má rovnoměrnou (specifickou) distribuci substituentů hydroxylových skupin kyseliny hyaluronové, esterifikovaných karboxylovými kyselinami. Odborníkům v dané oblasti je dobře známo, že vlastnosti finálních látek obvykle korelují se stupněm chemické modifikace (Chmelař a kol., 2018; Foglarová a kol., 2016), jak je běžné u ostatních hydrofobizovaných polysacharidů. (Kapelko, M., Zięba, T., & Michalski, A. (2012). Effect of the production method on the properties of RS3/RS4 type resistant starch. Part 2. Effect of a degree of substitution on the selected properties of acetylated retrograded starch. Food Chemistry, 135, 2035–2042.). Jednou z těchto vlastností je bobtnání ve vodném roztoku (Foglarová, M. a kol. (2016). Carbohydrate Polymers, 144, 68–75), který ovlivňuje fyzikální chování hydrofobizovaných polysacharidů. DS však nepopisuje distribuci substituentů (DSS) podél polysacharidového řetězce, o kterých je známo, že mění reologické vlastnosti polysacharidů, charakterizovaných stejnými hodnotami DS (Enebro, J., Momcilovic, D., Siika-Aho , M., & Karlsson, S. (2007). A new approach for studying correlations between the chemical structure and the rheological properties in carboxymethyl cellulose. Biomacromolecules, 8, 3253–3257). Proto by vlastnosti derivátů, včetně bobtnání, měly být přednostně korelovány s parametrem, který lépe odráží DSS. Bohužel je stanovení DSS podél polysacharidového řetězce analytickou výzvou, protože polysacharidový derivát musí být předtím chemicky nebo enzymaticky štěpen na oligosacharidy a jejich směs musí být analyzována (Mischnick P, Cellulose, 2001, Svazek 8, 4. vydání, str. 245–257).). Tedy tvorba gelu obsahuje agregáty pravidelných substituovaných oblastí, zatímco nesubstituované oblasti páteře slouží k rozpuštění sítě ve vodě (na rozdíl od předchozích pozorování, tj. Iain CM Dea, Pure & App. Chem., Svazek 61, č. 61). 7, str. 1315 až 1322 1989.). Navíc byla získána zvýšená viskozita v roztoku heterogenně substituovaných vzorků methylcelulózy. (Influence of Substitution Pattern on Solution Behavior of Hydroxypropyl Methylcellulose, A. Viridien a kol., Biomacromolecules 2009, 10, 522–529).

Analýza distribuce substituentů v modifikovaných polysacharidech je velmi zajímavá pro pochopení vztahů mezi strukturou a vlastnostmi v polysacharidových roztocích. Předpokládá se, že rozdíly v reologickém nebo rozpouštěcím chování derivátů stejného typu a průměrné DS jsou způsobeny různými distribucemi substituentů v polysacharidovém řetězci, a tedy sekvencemi odpovědnými za agregační nebo jiné organizační jevy, kvůli polydisperzitě polysacharidů s ohledem na jejich délku řetězce (DP) a stupeň substituce (DS), rovněž i distribuci substituentů. Tímto způsobem nemůže být tedy stanovena žádná definovaná sekvence, ale pouze pravděpodobnost různých substitučních vzorců. V daném oboru je známo, že pro stanovení substitučních profilů oligomerních směsí, které byly porovnány s vypočtenými teoretickými vzory, byly použity částečně degradované ethery celulózy (Carbohydrate Polymers, svazek 96, vydání 1, 1. července 2013, strany 246-252.). Distribuce substituentů v hyaluronanu je však stále neznámá. Zejména HA deriváty esterifikované alespoň jednou z (C_{11}-C_{18}) mastných kyselin střední délky nebo ester cholesterolu sukcinylové kyseliny jsou výhodné v kompozici podle tohoto vynálezu, i když se očekává použití mastných kyselin s delšími acylovými řetězci (C_{18}-C_{22} alifatický řetězec) pro tvorbu systémů pro dodávání léčiv. Díky zánětlivé složce, která je obecně přítomna u syndromu

suchého oka, jsou sloučeniny jako polynenasycené mastné kyseliny (PUFA) typu omega-3 a omega-6 docela zajímavé pro jejich možné zahrnutí do přípravků pro náhradu slz. Jak je známo, polynenasycené mastné kyseliny nebo PUFA jsou karboxylové sloučeniny s alifatickým řetězcem, které mají dvě nebo více dvojných vazeb v řetězci. Příklady omega-3 mastných kyselin zahrnují kyselinu α-linolenovou (C18:3, n-3; ALA), kyselinu eikosapentaenovou (C20:5 n-3; EPA) a kyselinu dokosahexaenovou (C22:6, n-3; DHA); příklady omega-6 mastných kyselin zahrnují linolovou kyselinu (C18:2, n-6; LA) a γ-linolenovou kyselinu (C18:3, n-6; GLA), jak je popsáno v US8957110B2 nebo US8865685B2.

C_{10}-C_{17} alkylová skupina (nebo **R** ve schématu 1) může být vybrána, s výhodou, z mastných kyselin vybraných ze skupiny obsahující kyselinu laurovou, kyselinu myristovou, kyselinu undecylenovou, kyselinu linolovou, kyselinu olejovou, kyselinu linolenovou, kyselinu palmitovou, kyselinu palmitoleovou, kyselinu stearovou, kyselinu eikosapentaenovou, kyselina arachidonovou, kyselina dokosenovou. Zvláště výhodné byly mastné kyseliny střední délky, jako je kyselina laurová (nebo C_{12}) a kyselina undecylenová (C_{11}), protože poskytují požadovanou viskozitu, dostatečnou rozpustnost a roztoky z nich vyrobené, bylo možné sterilizovat filtrací. **R** ve schématu 1 může být také ester cholesterolu sukcinylové kyseliny.

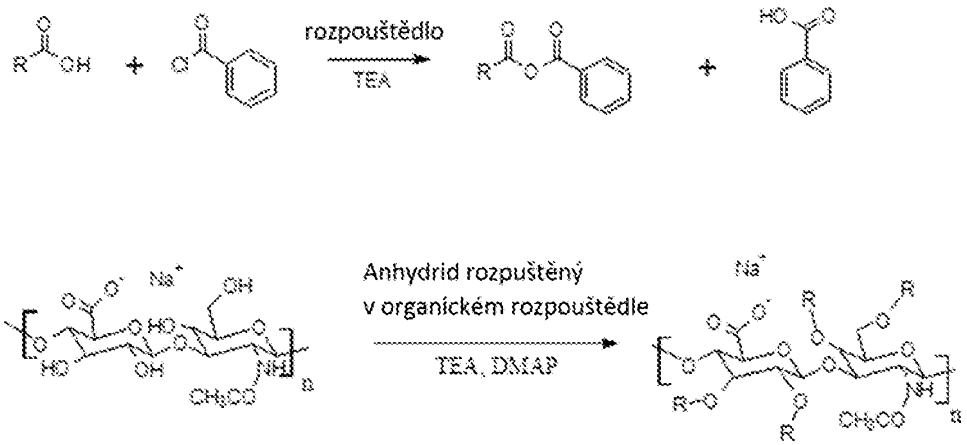


Schéma 1

Schéma 1. A) Aktivace karboxylové kyseliny zprostředkovaná pomocí benzoylchloridu a B) Esterifikace HA, kde R je H za předpokladu, že alespoň jeden R je COC_xH_y, kdežto x je 10 až 17 a y je 19 až 36, přičemž organické rozpouštědlo je vybráno ze skupiny etherů, konkrétněji 1,4-dioxanu nebo THF. DMAP znamená organokatalyzátor 4-amino dimethylaminopyridin, který se používá jako 0,05 ekv. na HA dimer a TEA je báze použitá pro neutralizaci.

V této přihlášce byly deriváty HA obecného vzorce IV syntetizovány za použití nízké koncentrace HA v celkovém objemu reakční směsi ($c \leq 1,5$ hm. %). Tyto podmínky jsou označeny jako vysoce zředěné (HD). Zejména použití etherů během esterifikace HA poskytuje dobrou kontrolu chemické modifikace, přičemž množství monosubstituovaných tetramerů HA (ΔHA4+C12) je ve vzorcích vyšší než 50 %. Tyto esterové deriváty HA obecného vzorce IV jsou zejména užitečné pro výrobu kompozic ve formě roztoků charakterizovaných pomocí transmitance cca. 100 %.

Jinými slovy, esterové deriváty HA obecného vzorce IV byly připraveny před samovolným zapletením polysacharidu v reakční směsi. Tento bod samovolného zapletení polysacharidu může být určen pomocí měření vnitřní viskozity roztoků (**Obr.11**). Acylace prováděná v této koncentraci tedy vedla k rovnoměrné (homogenní) distribuci acylových substituentů podél HA polymerního řetězce. Na rozdíl od esterových derivátů HA produkovaných pomocí postupů známých v dané oblasti, tedy acylace HA je provedena po okamžiku samovolného zapletení polysacharidu v roztoku, takže pouze volné konce polymerního hlavního řetězce jsou vystaveny substituci.

Optická čirost roztoků připravených s použitím jakéhokoli esterového derivátu HA podle tohoto vynálezu byla charakterizována měřením transmitance v rozmezí od 200 nm do 800 nm (UV-vis). Kromě toho byla čirost roztoku analyzována pomocí nefelometrie (NTU). Nefelometer je přístroj pro měření koncentrace suspendovaných částic. Nefelometr měří suspendované částice pomocí světelného paprsku (zdrojový paprsek) a detektoru světla nastaveného na jednu stranu (často 90 °) od zdrojového paprsku. Hustota částic je pak funkcí světla odraženého do detektoru od částic. Kolik světla odráží daná hustota částic, závisí do jisté míry na vlastnostech částic, jako je jejich tvar, barva a odrazivost. Protože optické vlastnosti závisí na velikosti suspendovaných částic, jako standard pro kalibraci a reprodukovatelnost se často používá stabilní syntetická látka nazývaná „Formazin“ s jednotnou velikostí částic. Jednotka se nazývá jednotka zákalu formazinu (FTU).

V dalším provedení způsobu podle tohoto vynálezu se uvádí, že smíšené anhydridy jsou stabilnější při nízké teplotě (5 až 10 ° C). Překvapivě, ale nízká teplota také mění konformaci polysacharidu z lineárního na smyčku. Poté se chemická modifikace HA provádí pouze v dostupných pozicích polymeru (vně smyčky), čímž se snižuje rozpustnost získaného derivátu hyaluronanu. Tudíž, tvorba esterového derivátu HA může být prováděna pouze při 25 ° C až 60 ° C, s výhodou 20 ° C až 35 ° C, výhodněji 25 ° C, takže to znamená, že konformace HA je lineární. Kromě toho se aktivace karboxylové kyseliny provádí při teplotě v rozmezí 5 ° C až 60 ° C, s výhodou při 20 ° C až 30 ° C. Používají se však také anhydridy příslušných karboxylových kyselin.

V této přihlášce se překvapivě zvyšuje viskozita kompozic podle tohoto vynálezu ve formě roztoků pro nejrovnoměrněji (homogenní) substituovaný esterový derivát HA podle tohoto vynálezu, který byl připraven v etherových rozpouštědlech za podmínek vysokého ředění. S výhodou se esterifikovaný derivát HA podle stávajícího vynálezu získává pomocí suspendování práškové kyseliny hyaluronové ve vodných/etherových rozpouštědlech za vzniku polárního média pro chemickou modifikaci. Tímto způsobem může být získána esterifikovaná hyaluronová kyselina s nízkým stupněm modifikace a poměr organického rozpouštědla k vodě je nastaven mezi 1:2 a 1:1. Acylace bude také probíhat za mírných podmínek a stupeň esterifikace může být jemně laděn.

Podle stávajícího vynálezu neexistují žádná omezení stupně substituce, ale 8,0 až 12,5 je výhodný, 8,5 až 9,5 je nejžádanější. Stanovení je také založeno na měření pomocí plynové chromatografie (GC).

Při nízkých koncentracích (0,15 hm. %) byly dynamická viskozita roztoků obsahujících esterifikovaný derivát HA podle tohoto vynálezu a dynamická viskozita roztoků obsahujících HA nalezeny podobné **(viz obrázek 1 a tabulka 1)**.

Tabulka 1. Účinek 0,15 hm.% koncentrace na viskozitu roztoků HA a HAC12

Přípravek	C (%)	η_1 (mPa.s)	η_{10} (mPa.s)	η_{100} (mPa.s)	η_{1000} (mPa.s)
Pufr T	-	8,4	2,5	1,7	2,0
Nativní HA	0,15	11,2	3,5	3,2	3,3
HA-C12: DS_{GC}=9,4	0,15	10,2	4,7	4,1	4,0
HA-C12: DS_{GC}=8,9	0,15	9,8	4,5	4,0	3,9
HA-C12: DS_{GC}=9,7	0,15	7,1	4,3	4,0	3,9

% znamená hmotnostní procento a je zkráceno jako hm. %.

Avšak se zvyšující se koncentrací vzorku v intervalu 0,2 a až do 0,6 hm. % se rozdíl mezi dynamickou viskozitou esterifikovaného HA a nativního HA liší (viz **tabulky 2 a 3 a obrázky 2 a 3, podle pořadí**).

Tabulka 2. Vliv koncentrace na viskozitu roztoků HA

Vzorek	C (%)	η_1 (mPa.s)	η_{10} (mPa.s)	η_{100} (mPa.s)	η_{1000} (mPa.s)
HA	0,2	6,3	4,0	3,8	3,9
HA	0,4	12,3	8,3	8,0	7,8
HA	0,6	17,9	15,2	15,2	13,6

% znamená koncentraci v hmotnostních procentech.

Tabulka 3. Vliv koncentrace na viskozitu roztoků HA-C12, DSGC = 9,4

Vzorek	C (%)	η_1 (mPa.s)	η_{10} (mPa.s)	η_{100} (mPa.s)	η_{1000} (mPa.s)
HA –C12: DS_{GC} =9,4	0,2	8,6	5,2	4,9	4,6
HA –C12: DS_{GC} =9,4	0,4	21,2	16,0	14,4	11,3
HA –C12: DS_{GC} =9,4	0,6	75,4	60,5	47,8	24,8

% znamená koncentraci v hmotnostních procentech.

Zejména kyselina hyaluronová byla roubována (substituována) pomocí skupin kyseliny laurové (dodekanové) (zkráceně HA-C12, lauroyl hyaluronan) a skupin kyseliny undecylenové a (identifikována jako HA-C11, undecylenyl hyaluronan) a 0,15 hm. % těchto derivátů v roztocích vykazuje nejvhodnější viskozitu.

Kromě toho byl roztok HA-C12 (lauroyl hyaluronan) v koncentraci (0,15 hm. %) roztoku filtrován přes různé membránové filtry s velikostí pórů 0,2 μm. Nejprve byla regenerace vzorku po filtraci stanovena pomocí vzorce:

(hmotnost vzorku-hmotnost pufru) x 100 / 1,5 =% výtěžku (1).

Množství **HA-C12**, které prošlo sterilizační membránou, bylo stanoveno gravimetricky. Sterilizace kompozice je velmi důležitá pro kompozice podle tohoto vynálezu určené pro lékařství, zejména pro oftalmologii, jak je popsáno v Ph. Eur. 2.6.1 sterility.

Dynamická viskozita HA-12 podle tohoto vynálezu připraveného v 1,4-dioxanu a/nebo THF (viz **obr. 4**) je vyšší než u derivátů připravených v isopropanolu nebo terc.butanolu (viz **obr. 5**) v důsledku rovnoměrné distribuce substituentů podél hlavního řetězce polymeru.

Filtrace byla prováděna ve vodném roztoku derivátu HA-C12 (DS_{GC} = 9,4) v koncentraci (0,15 hm. %). Pufr sestával z (Trehalosa-KCl nebo NaCl - a činidla pro regulaci osmotického tlaku 0,1 %, pH 7,2), jak je uvedeno v **tabulce 4**. Je také překvapivé, že a PES filtr je dobrý pouze pro filtraci

nativního HA (roztok o stejné koncentraci 0,15 hm. %), zatímco CA membránový filtr (Ophthalsart) má dobré vlastnosti pro esterifikované deriváty HA díky své amfifilicitě. Roztok známé koncentrace HA-C12 byl filtrován a sušen. Množství HA-C12 a HA, které prošlo membránou, bylo stanoveno gravimetricky.

Tabulka 4. Filtrace použitá pro sterilizaci vodných (dále identifikovaných jako aq.) roztoků HA-C12 a aq. roztoků HA při 0,15 % hm. v pufru o pH 7,2.

Klasifikace	**Filtr**	**Membrána**	**Filtrační kapacita**			**% výtěžku po filtraci**
			Pufr T	**HA-C12**	**HA**	
Hydrofilní	NML	CA Acetát celulózy	Velmi dobrý	Velmi dobrý	Velmi dobrý	60-85
	Ophthalsart©	CA Acetát celulózy	Velmi dobrý	Velmi dobrý	Velmi dobrý	80-95
	Optex	Směs esterů celulózy	Velmi dobrý	Dobrý	Velmi dobrý	55-85
	PES	PES Polyether sulfon	Velmi dobrý	Obtížný	Velmi dobrý	60-85
Hydrofóbní	SRP	PTFE Polytetrafluorethylen	Dobrý	Velmi obtížný	+/-	--

Kompozice podle tohoto vynálezu byly tak úspěšně sterilizovány filtrací přes membránu acetát celulózy. Nejlepší výsledky pro roztoky obsahující HA-C12 byly dosaženy za použití membrány z acetátu celulózy (CA).

Kromě toho **obr. 6, tabulka 5** prokázaly, že rozdíly v dynamické viskozitě stanovené pro derivát HAC12 při koncentraci 0,25 hm. % ve vodných roztocích před a po filtraci označené jako (F nebo filtrace) byly zanedbatelné. Hodnoty pokračují v **tabulce 5**.

Tabulka 5. Hodnoty dynamické viskozity před a po filtraci pomocí membrány Ophtalsart. Pro HA-C12 DS_{GC} = 8,9; 9,2 a 9,4.

Ophthalsart filtrace

Vzorek	C (%)	η_1 (mPa.s)	η_{10} (mPa.S)	η_{100} (mPa.S)	η_{1000} (mPa.S)
HA-C12: DS 9,4	0,25	11,8	6,8	6,3	5,8
HA-C12: DS 9,4 - F	0,25	13,0	6,8	6,3	5,8
HA-C12: DS 8,9	0,25	12,1	6,3	5,8	5,4
HA-C12: DS 8,9 – F	0,25	9,5	6,2	5,8	5,5
HA-C12: DS 9,7	0,25	14,4	7,3	6,5	5,9
HA-C12: DS 9,7 – F	0,25	13,7	7,2	6,4	5,8
HA-C12: DS 9,2	0,25	12,9	7,7	6,9	6,1
HA-C12: DS9,2 – F	0,25	13,4	7,6	6,9	6,1

0,25 hm. % vodný roztok HA-C12 připravený v THF a / nebo 1,4-dioxanu, vykazoval nejpříznivější účinek na životaschopnost buněk a proliferaci (**obr. 7**). Životaschopnost buněk po dehydrataci byla kvantitativně hodnocena in vitro za použití dříve popsaných protokolů (JOURNAL OF OCULAR PHARMACOLOGY AND THERAPEUTICS, Svazek 31, Číslo 8, 2015). Vzorky byly rozpuštěny v kultivačním médiu v následujících koncentracích: 10, 100, 500 a 1000 μg/ml a životaschopnost buněk byla stanovena pomocí testu MTT s použitím myších buněčných fibroblastů Swiss-3T3. Hodnocení se týká kontroly neošetřených buněk (%). Důležitý je také účinek Mw. V tomto vynálezu má esterifikovaný derivát hyaluronanu molekulovou hmotnost mezi 200000 g/mol až 800000 g/mol, ale zvláště výhodná je molekulová hmotnost mezi 250000 až 700000 g/mol. Výhodněji v rozmezí 200000 až 400000 g/mol, nejvýhodnější je 300000 g/mol (**obr. 8**).

Byla hodnocena nativní HA dvou molekulových hmotností (270 000 g / mol a 1 300 000 g/mol) a jejich směsi. Překvapivě, chemicky modifikovaná HA roubovaná (substituována) pomocí středně dlouhých mastných kyselin představovala lepší ochranu před vysoušením než nativní HA. Zvláště, esterový derivát hyaluronanu podle tohoto vynálezu je rozpuštěn v pufru a filtrován pomocí membrány 0,22 μm za získání roztoku bez mikroorganismů za použití filtru známého v daném oboru. Složení membrány je zejména vybráno ze skupiny acetát celulózy (NML nebo Ophtalsart filtr) nebo polytetrafluorethylenové membránové filtry, jak se běžně používá pro sterilizaci (**obr. 9**). Každý testovaný roztok byl filtrován pomocí membrány z acetátu celulózy (Ophthalsart) a dynamická viskozita byla testována před a po filtraci. Po aplikaci kompozice podle tohoto vynálezu (obsahující HA-C12 a/nebo HA) a pokusech o vysušení byly mezi přípravky pozorovány podstatné rozdíly v životaschopnosti buněk.

Po 30 minutách vysoušení ukázaly vzorky **HA-C12** nejvyšší účinnost při prevenci buněčné smrti, zatímco zbývající přípravky mohly být uspořádány od více k méně účinným. Podrobné výsledky jsou uvedeny na **obr. 10.** Vzorky ošetřené pomocí HA-C12 vykazovaly statisticky vyšší počet životaschopných buněk než kompozice obsahující vzorky ošetřené HA nebo HYLO® GEL, o nichž se uvádí, že obsahují v přípravku 2 mg/ml hyaluronátu sodného a jsou rozpuštěny v citrátovém pufru, sorbitolu a vodě (Clin Ophthalmol. 2017; 11: 631–638). Dehydratace byla navíc odpovědná za téměř 80 % buněk v „kontrole suchého oka“. Dále byly roztoky HA, HA-C12 testovány ve stejném pufru, pH 7,2), za použití HA-C12 v koncentraci 0,25 hm.% vodného roztoku.

Je třeba poznamenat, že oční kompozice podle tohoto vynálezu zahrnovala amfifilní esterový derivát HA, který kromě toho může působit jako nosič protizánětlivých produktů, které jsou zvláště

užitečné pro ochranu a integraci tenké lipidové vrstvy slzného filmu. Výše uvedená amfifilita derivátu podle tohoto vynálezu umožňuje inkorporaci ve vodě nerozpustných léčiv (aktivní látka) do jádra vytvořené nanomicelární kompozice, která je stále rozpustná ve vodě a vytváří čirý roztok s vysokou propustností. Kromě toho samovolné zapletení umožňuje delší retenci na epitelu rohovky a předpokládá se vyšší stabilita inkorporované látky.

Zvýšená kapacita chránit buňky HaCaT (linie lidských epidermálních keratinocytů) před dehydratací je také prokázána *in vitro*. Celkově, výsledky vytvářejí kompozice se zlepšenou účinností.

V dalším provedení podle stávajícího vynálezu kompozice podle tohoto vynálezu obsahuje pufr, aby se vytvořilo pH konečného produktu v rozmezí 6,5 až 8,0. Pufr je vybrán ze skupiny obsahující tris (tris (hydroxymethyl) aminomethan), hydroxid sodný, histidin, tricin, lysin, glycin, serin nebo trehalózu pro úpravu správného fyziologického pH pomocí kyselé složky, jako je kyselina chlorovodíková. Příklady vhodných pufrů jsou vybrány ze skupiny obsahující fosfátový, acetátový, citrátový nebo borátový pufr pro udržení vhodného pH. Kompozice podle tohoto vynálezu mohou být dodávány v balení pro více dávek nebo v jedné dávce. Kompozice podle tohoto vynálezu mohou dále obsahovat neiontové nebo nízko iontové činidlo regulátoru síly osmotického tlaku pro regulaci osmotického tlaku kompozice, dokud není získána hodnota v rozmezí 0,100 až 0,320 Osmol/kg. Regulační činidlo osmotického tlaku je vybráno ze skupiny zahrnující sorbitol, mannitol, ethylenglykol, propylenglykol, dextrózu, trometamol (tris (hydroxymethyl) aminomethan) nebo tetralózu.

Kompozice podle tohoto vynálezu může dále obsahovat činidlo z řady stabilizátorů, povrchově aktivních látek, spolu působících povrchově aktivních látek (ko-surfaktantů), antioxidantů nebo vychytávačů volných radikálů a/nebo činidel proti atmosférickému znečištění a/nebo antimikrobiální konzervační látky, které mohou být zapouzdřeny v derivátech amfifilních esterů HA podle tohoto vynálezu ve formě micel, jak je známo odborníkům v dané oblasti (RSC Adv., 2019,9, 16578-16585), kompozice může také zahrnovat vitamíny nebo antioxidanty, kyselinu diethylentriaminopentaoctovou nebo chlorid sodný, jak je popsáno v US10105441B2 a US9539202B2.

Esterifikovaný derivát HA může být dále použit pro přípravu emulzí (US9801899B2), které jsou obvykle připraveny smícháním esterifikovaného HA derivátu s typem fosfolipidu a lipidy jinými než fosfolipidy, (b) rozpuštěním esterifikovaného HA derivátu v pufru, (c) rozpuštěním polymerního stabilizátoru ve vodné fázi z kroku (b) a (d) dispergováním olejové fáze z kroku (a) ve vodné fázi z kroku (c) protřepáním, (e) kontrolou a úpravou pH, s výhodou přidáním příslušné báze nebo kyseliny a/nebo osmolalitového regulátoru a adjustoru a (f) sterilizací nanoemulze. Průměrná velikost olejových částic je v rozmezí 50 až 300 μm, s výhodou v rozmezí 150 až 200 μm. Avšak podle tohoto vynálezu byl připraven systém pro dodávání nano léčiv (jako jsou nanoemulze, nanomicely), který může být také užitečný v terapii; pro léčbu nebo prevenci očních chorob; a pro léčbu nebo prevenci suchého oka, alergií a/nebo zánětů v oku; a jako činidlo pro obnovení a/nebo nahrazení slzného filmu nebo jako nosič pro aktivní sloučeninu. Kompozice podle tohoto vynálezu tedy může dále obsahovat jakékoli aktivní činidlo (činidla) nebo pomocnou látku (aditiva). Tato aktivní činidla mohou být také vybrána ze skupiny obsahující antimikrobiální nebo antifungální antivirová činidla, mukopolysacharidy nebo složky hojení ran (EP2664330A1). Tento vynález představuje možnost enkapsulace látek, které nejsou rozpustné ve vodě, tj. glukokortikoidových derivátů, jako je prednisolon (PR), dexamethason a fluorometholon, které se široce používají pro profylaxi pooperačních zánětů (Drug Des Devel Ther. 2018; 12: 2529–2537), nebo antimykotika, jako je amfotericin B, jak je uvedeno v (Clin Microbiol Rev. 2003 Oct; 16 (4): 730–797.

V souladu s tímto vynálezem, nedráždivá farmaceutická kompozice s vysokou úrovní komfortu a nízkým potenciálem dráždění, vhodná pro dodání do citlivých oblastí, jako jsou oční tkáně, obsahuje derivát kyseliny hyaluronové (ester), která se vyznačuje vysokou propustností (99,9 %).

Oční kompozice podle tohoto vynálezu je předurčena ke zlepšení šíření umělých slz a očních kapek a rovněž ke stabilizaci očních kapek; zmírnění podráždění a nepohodlí a rovněž také zaostřuje rozmazané vidění; poskytuje pohodlí a jasnost zraku pacientům se suchým okem; a zlepšuje a zvyšuje šíření, stabilitu a promazávací účinek umělých slz v slzném filmu. Kromě toho, oční kompozice podle tohoto vynálezu může být dále použita k léčbě suchého oka jako víceúčelový roztok pro kontaktní čočky. Pouze změnou koncentrací HA. Stejně jako oční rozmezí je uváděné rozmezí stanoveno od 0,003 % až 0,4 hm. %. Kromě toho se pro terapii DED obvykle používají vyšší koncentrace HA, mezi 0,1 % a 0,4 hm.%.

Navíc, vodná oční kompozice podle tohoto vynálezu může být použita pro kontaktní čočky pro vylepšení diskomfortu očí. Jako podobné amfifilní esterové deriváty HA (HA naroubovaná s micelami na bázi cholesterolu) byly naneseny do kontaktních čoček a vykazovaly statisticky významné zlepšení smáčivosti a mechanické pevnosti při zachování optické propustnosti (RSC Adv., 2019,9, 16578-16585)). Dále, esterové deriváty HA podle tohoto vynálezu nejsou omezeny na tvorbu vodné kompozice nebo roztoku, ale mohou zahrnovat jinou formu vybranou ze skupiny zahrnující sterilní přípravek, gel, mast, emulzi, zařízení nebo proužek pro aplikaci do oka nebo kontaktní čočky obsahující tuto kompozici pro prevenci nebo potírání zánětlivých očních stavů a/nebo suchého oka.

Definice pojmů

V tomto vynálezu termín „nativní kyselina hyaluronová“ nebo „hyaluronan“ nebo (HA) je lineární polysacharid složený z této opakující se jednotky: (1 → 3) -β-N-acetyl-D-glukózamin- (1 → 4) kyselina p-D-glukuronová.

Termín „esterifikovaný derivát HA, esterový derivát HA nebo amfifilní esterový derivát HA“, jak je používán zde v tomto dokumentu, se týká derivátu HA, rovněž označovaného jako modifikovaný HA, který se může ve vodě samovolně složit a obsahuje hydrofobní alkylový řetězec naroubovaný (substituovaný) na kostru polysacharidu. Zejména esterifikovaná HA nebo amfifilní. HA, zvláště esterifikovaná mastnými kyselinami střední délky, jako je kyselina laurová nebo také označovaná HA-C11 (undecylenyl hyaluronan) nebo HA-C12 (lauroyl hyaluronan) nebo s sukcinylesterem cholesterolu, byly získány za zředěných podmínek, jak je uvedeno ve způsobu jejich přípravy podle tohoto vynálezu.

Obsah esterových skupin (acylů) byl získán analýzou pomocí plynové chromatografie a převádí se na stupeň substituce. Stupeň substituce (DS) byl měřen pomocí GC, která charakterizuje rozsah modifikace HA pomocí hydrofobních postranních skupin, a vypočítá se podle rovnice (1):

$$DS\ GC(\%) = \frac{MFAtotal - MFAfree}{mvzorek} \frac{MHA}{MFA} * 100 \qquad (1)$$

Celkový obsah karboxylové kyseliny (MFA total) a obsah volné karboxylové kyseliny (MFA free) byl vyhodnocen z příslušných ploch píku normalizovaných na interní standard pomocí kalibrační křivky. Kde MHA jednotka je molekulární hmotnost opakující se jednotky HA (400 g/mol), MFA je molekulární hmotnost mastné kyseliny a m_{vzorek} je hmotnost vzorku esterifikované HA (esterifikovaného HA derivátu). Rovněž byla vyhodnocena neurčitost, opakovatelnost a reprodukovatelnost metody GC.

Termín „průměrná molekulová hmotnost“ znamená molekulovou hmotnost HA použitou pro chemickou modifikaci stanovenou pomocí SEC-MALLS.

Termín „vodný“ obvykle označuje vodnou kompozici vyrobenou z esterového derivátu hyaluronanu rozpuštěného v pufru. Koncentrace esterifikovaného HA derivátu je ≥ 0,1 % a ≤ 0,5 hm. %. a výhodněji 0,15 hm. % a zbytek je voda (pufr).

Termín „vysoce zředěné podmínky“ se týká reakčních podmínek prováděných pro způsob přípravy esterového derivátu HA podle tohoto vynálezu za vysokého ředění. V chemii je princip vysokého ředění strategií pro některé makrocyklizační reakce, tj. pro syntézu makrocyklů. Ačkoli reakce s vysokým ředěním mohou být prováděny v reaktoru s velkými objemy rozpouštědla, praktičtější implementace zahrnuje pomalé přidávání reaktantů, za podmínek, kdy jsou reaktanty rychleji spotřebovány než rychlost přidávání. V tomto případě k reakci došlo před zapletenímpolysacharidu do roztoku (**obrázek 11**).

Termín "farmaceuticky přijatelná sůl", jak je používán zde v tomto dokumentu, jsou s výhodou ionty alkalických kovů nebo ionty kovů alkalických zemin, výhodněji Na^+, K^+, Mg^{2+} nebo Li^+.

Esterifikovaný hyaluronan podle této aplikace byl štěpen bakteriální hyaluronidázou, hyaluronan-lyázou izolovanou ze *Streptococcus pneumoniae*, která se také označuje SpHyl. Enzym štěpí β(1-4) vazbu v hyaluronanu a vede k tvorbě nenasycených hyaluronan (HA) disacharidů s glukuronovou kyselinou na neredukujícím konci (European Polymer Journal, svazek 94, září 2017, strany 460-470).

Enzym byl také schopen štěpit hydrofobizovaný hyaluronan, kde nenasycené modifikované di- a tetrasacharidy kromě nativních nenasycených hyaluronan disacharidů byly finální produkty (**obrázek 14**), kde je znázorněna chemická struktura (a) monosubstituovaných dimerů (ΔHA2+R) nebo (b) monosubstituovaných tetramerů, identifikovaných také jako (ΔHA4+R).

Měřené specifické hmotnostní chromatogramy patřící k nenasyceným modifikovaným oligosacharidům (jmenovitě například ΔHA2+C12, ΔHA4+C12, ΔHA4+2*C12 a ΔHA4+3*C12 pro derivát HA-C12; a ΔHA2+C18:1, ΔHA4+C18:1, $\Delta HA3^{AA}$+C18:1, ΔHA4+2*C18:1 a $\Delta HA3^{AA}$+2*C18:1 pro derivát HA-C18:1) byly extrahovány z chromatogramů celkového proudu iontů (TIC) a integrovány. Množství specifického modifikovaného oligosacharidu (A_i) přítomného ve směsi se vypočítá podle rovnice (3):

$$A_i = 100 \times \frac{Pk_i}{\sum_i^n Pk_i} \quad (3)$$

kde a Pk_i - Pkn jsou oblasti píku patřících k nenasyceným modifikovaným oligosacharidům (například HA-C12 nebo HA-C18:1). $A_{(i)}$ je vyjádřeno v %.

Termín „distribuce substituentů podél polymerního řetězce nebo distribuce substituentů nebo DDS“ znamená, jak blízko / daleko jsou hydrofóbní řetězce od sebe navzájem. Schematické pohledy na HA struktury s DS 40 % a různými DDS jsou znázorněny na **obrázku 12**. Zejména je DDS ukázaný na **obrázku 12a** dokonce rovnoměrnější než ostatní dva DDS znázorněné na **obrázku 12b, a c.**

Ve skutečnosti existuje několik způsobů, jak analyticky určit DDS. Podle tohoto vynálezu DDS je *Ai*, které určuje, zda esterový derivát kyseliny hyaluronové má rovnoměrnou „homogenní“ nebo nerovnoměrnou „heterogenní“ distribuci substituentů podél řetězce HA. Množství monosubstituovaných tetramerů ($A_{\Delta HA4+R}$) rovná nebo vyšší než 35 %, tedy 35 až 99 %, s výhodou 35 až 60 % a množství disubstituovaných tetramerů ($A_{\Delta HA4+2*R}$) rovná nebo menší než 40 %, tedy 1 až 40 %, s výhodou 20 až 40 % je typické pro rovnoměrnou (homogenní) distribuci substituentů podél řetězce HA. Naproti tomu množství monosubstituovaných tetramerů ($A_{\Delta HA4+R}$) menší než 35 % a množství disubstituovaných tetramerů ($A_{\Delta HA4+2*R}$) větší než 40 %, ukazují na nerovnoměrnou (heterogenní) distribuci substituentů podél řetězce HA. Enzymatická hydrolýza a taková měření musí být prováděna pro další esterové deriváty kyseliny hyaluronové nebo její farmaceuticky přijatelné soli podle tohoto vynálezu za stejných podmínek jako v **příkladu 57.**

Kromě toho, DDS může být popsán pomocí $w_{max.}^{HA4-HA20}$ esterového derivátu HA připraveného způsobem podle tohoto vynálezu ve srovnání s esterovým derivátem HA připraveným způsoby známými ze stavu techniky. Stanoví se analytickým postupem podrobně popsaným v **příkladu 56.**

Hodnota $w_{max.}^{HA4-HA20}$ je nepřímo úměrná DS_{GC} derivátu (**obrázek 13** - černé kruhy - standard). Označuje také distribuci substituentů podél polymerního řetězce pro deriváty s podobnou DS nebo srovnatelnou číselnou hodnotou (s rozdílem 5 %). Vyšší hodnoty $w_{max.}^{HA4-HA20}$ znamenají nerovnoměrnější (blokovou, **obrázek 13** - čtverce, **obrázek 12b a c**) distribuci substituentů podél polymerního řetězce, zatímco nižší $w_{max.}^{HA4-HA20}$ navrhuje rovnoměrnější (**obrázek 13** - trojúhelníky, **obrázek 12a**) distribuci substituentů podél polymerního základního řetězce.

Termín „etherové rozpouštědlo" je třída organických sloučenin, které obsahují etherovou skupinu - atom kyslíku spojený se dvěma alkylovými nebo arylovými skupinami. Mají obecný vzorec R-O-R ', kde R a R' představují alkylové nebo arylové skupiny. Ethery lze klasifikovat na jednoduché nebo symetrické ethery, zatímco pokud se liší, ethery se nazývají smíšené nebo nesymetrické ethery.

Termín „nulová smyková viskozita" je dále označován jako η0, je viskozita kapaliny získaná v limitu. Nulová smyková rychlost je matematický koncept a v praxi nemůže být viskozita měřena při smykové rychlosti nula, protože viskozita je měření odporu vůči proudění. Ale logaritmické grafy viskozity versus smyková rychlost mají tendenci se vyrovnat, když se smyková rychlost blíží k nule, křivka je extrapolována na osu y, aby se dospělo k hodnotě pro nulovou smykovou viskozitu (když viskozita dosáhne ustálené úrovně).

Kromě toho se v této přihlášce používají jednotky centipoise (cPs) k uvádění hodnot dynamické viskozity. Poise je často používán s metrickou předponou centi-. Centipoise je jedna milipascal-sekunda (mPa·s) v jednotkách SI. (1 cP = 10^{-3} Pas). Centipoise je správně zkráceno cP, ale běžně jsou uváděny i alternativní zkratky cps a cps. Zejména jsou smykové rychlosti při η1 s^{-1} ideální pro technická měření. Vzhledem k tomu, že pro reologické hodnocení náhrad slz neexistuje ani standard ani farmakologický postup, používá se mezinárodní norma DIN EN ISO 15798: 2013, která stanoví kritéria a zkušební postupy pro viskoelastické látky používané při operaci šedého zákalu. Je tedy třeba měřit viskozitu ve vztahu ke smykové rychlosti v rozmezí 0,001 až 1000 s^{-1}. Dále, termín viskozita při „smykové rychlosti mrknutí nebo vysoké smykové viskozitě" se odhaduje na 1000 l / s (nebo η1000). Viskozita slzných tekutin je přibližně 65 mPa.s. při otevřených očích a během mrkání klesá na 10 mPa.s. (Tiffany, J. M. Int. Ophthalmol (1991) 15: 371).

Termín „účinnost roztoku pro náhradu slz" splňuje následující kritéria: oční kapky s velmi nízkou účinností (η0 < 6 mPa·s) a blízké newtonovskému toku. Oční kapky s nízkou účinností (6 mPa·s < η0 < 16 mPa·s). Oční kapky s dobrou účinností (16 mPa·s < η0 < 32 mPa·s). Oční kapky, které simulují fluiditu slz (η0 > 32 mPa·s a η1000 < 12 mPa·s). HA oční gely, s vysokou nulovou smykovou viskozitou (η0 > 32 mPa·s), ale vyvíjející velké smykové síly na epitel rohovky během mrkání (η1000 > 12 mPa·s).

Podle tohoto vynálezu byla viskozita pro 0,15 hm. %. HA-C12 (290000 g/mol) rozpuštěného ve fyziologickém roztoku 31 mPa s při η0 a při η1000 je 4 mPa.s. Rozsah dynamické viskozity při 1/s, který může být získán v kompozici podle tohoto vynálezu, je od 2,8 mPa do 11500 mPa.s a při 1000/s je 2,1 až 25,9 mPa.s.

Zejména kombinace etherového rozpouštědla a zředěných podmínek umožňuje kontrolu substituce. (**obrázek 15**). To se odráží v řízení reakce. Jinými slovy, derivát obsahuje více mono substituovaných oligosacharidů distribuovaných homogenně podél základního řetězce. Kromě toho „velmi zředěné podmínky" produkují rozpustné vzorky (**viz obr. 16**) a dobře definovanou strukturu polysacharidu, která je zrcadlena pomocí definice ^{1}H NMR (**obr. 17 a 18**). Překvapivě, standardní podmínky (nezředěné podmínky) syntézy narušují sterilizaci kvůli špatné rozpustnosti vzorku ve vodě.

Stručný popis obrázků

Obr. 1. Dynamická viskozita vodného roztoku HA (o) a esterifikovaného HA (HA-C12) 0,15 hm. %.

Tabulka 1. Hodnoty viskozity pro HA a esterifikovaný derivát HA-C12 (DS stanovené pomocí GC = 8,9; 9,4 a 9,7)

Obr. 2. Dynamická viskozita vodného roztoku HA v koncentraci 0,2; 0,4 a 0,6 hm. %. Hodnoty viskozity jsou uvedeny v mPa.s a zahrnuty v tabulce 2.

Obr. 3. Dynamická viskozita vodného roztoku **HA-C12** (DS_{GC} = 8,9 %) v koncentraci 0,2; 0,4 a 0,6 hm. %. Hodnoty viskozity jsou uvedeny v mPa.s a zahrnuty v tabulce 3.

Obr. 4. Stanovení dynamické viskozity pro derivát HA-C12 připravený v etherech (DS_{GC} = 9,4 %).

Obr. 5. Stanovení dynamické viskozity pro derivát HA-C12 připravený v alkoholech (DS_{GC} = 9,4 %).

Obr. 6. Dynamická viskozita stanovená pro derivát HAC12 při koncentraci 0,25 hm. %. (před a po filtraci). Hodnoty jsou zahrnuty v **tabulce 5.**

Obr. 7. In vitro testovaná cytotoxicita derivátu HA-C12 (DS stanovená pomocí GC = 8,9; 9,4 a 9,7)

Obr. 8. Vliv Mw na účinnost derivátu HA-C12 (0,25 hm. %)

Obr. 9. Životaschopnost buněk po filtraci porovnání HA a HA-C12 (po filtraci).

Obr. 10. Životaschopnost derivátů HA-C12 a jejich směsí.

Legendy k obr.10:

Suchá CTRL: znamená buňky bez jakékoli kapaliny.

Pufr T: znamená ochranu buněk pouze v přítomnosti trehalózového pufru, jak je uvedeno výše.

HA 270 kDa znamená ochranu buněk pomocí nativní HA v koncentraci 0,25 hm.%.

HA-C12: T02 znamená ochranný účinek derivátu lauryl hyaluronátu sodného (HA-C12) s DS = 8,9 % (stanoveno pomocí GC) v koncentraci 0,25 hm. %.

HA-C12: T01 znamená ochranný účinek derivátu lauryl hyaluronátu sodného DS = 9,4 % (stanoveno pomocí GC) v koncentraci 0,25 hm. %.

HA-C12: T04 znamená ochranný účinek derivátu lauryl hyaluronátu sodného s DS = 9,6 % (stanoveno pomocí GC) v koncentraci 0,25 hm. %.

HA-C12: T03 znamená ochranný účinek derivátu lauryl hyaluronátu sodného s DS^{GC} = 9,7 % (stanoveno pomocí GC) v koncentraci 0,25 hm. %.

HA 270000 g/mol znamená ochranu buněk pomocí HA použité pro chemickou modifikaci smíchané s 1300000 g/mol HA v hmotnostním poměru 80/20, v koncentraci 0,25 hm. %.

HA-C12: T-01 / HA 1,3 MDa (80/20) znamená ochranný účinek derivátu lauryl hyaluronátu sodného s DS_{GC} = 9,8, v koncentraci 0,2 hm. %. (stanoveno pomocí GC) smíchané s 1300000 g/mol HA v hmotnostním poměru 80/20.

HA s vysokou molekulovou hmotností (znamená 1300000 g/mol) a ochrana buněk před vysoušením

Obr. 11. Stanovení samovolného zapletení HA pomocí stanovení vnitřní viskozity jejich roztoků.

Obr. 12. Schematický pohled na rovnoměrnou (a) a nerovnoměrnou (b, c) distribuci substituentů podél hyaluronanového řetězce. A: znamená kyselinu glukuronovou, N je N-acetyl-D-glukózamin.

Obr. 13. $w_{max.}^{HA4-HA20}$ vynesené proti DS_{GC} (%) pro deriváty HA-C12 připravené pomocí postupů známých v dosavadním stavu techniky (patent WO/ 2016/141903A1, černé kruhy, standardní vzorky použité pro porovnání s dalšími přípravky) a podle tohoto vynálezu (ve vodě špatně rozpustné vzorky jsou znázorněny pomocí čtverečků, zatímco ve vodě dobře rozpustné vzorky jsou znázorněny pomocí trojúhelníků). Obrázek je znázorněn pomocí údajů uvedených v tabulce 8. Metodika použitá pro vyhodnocení derivátů je popsána v příkladu 56.

Obr. 14. Estery připravené v 1,4-dioxanu vykazovaly přímou korelaci mezi tetramery (ΔHA4*2C18:1) a stupněm substituce stanoveným pomocí gelové chromatografie (DSGC) (plné kruhy), zatímco ty stejné estery připravené v terc.butanolu vykazovaly náhodnou substituci (otevřené kruhy).

Obr. 15. Oligosacharidy přítomné ve vzorcích po enzymatické degradaci.

Obr. 16. Vzhled roztoků HA-C12 (0,2% koncentrace) připravených za zředěných a nezředěných podmínek.

Obr. 17. ^{1}H NMR HA-C12 připravený za použití nezředěných podmínek během syntézy.

Obr. 18. ^{1}H NMR HA-C12 připravený za použití zředěných podmínek během syntézy.

Obr. 19. Časový průběh degradace BTH (degradace pomocí hovězí testikulární hyaluronidázy). Obsah hyaluronanových oligosacharidů (hm.%) je vynesen proti času štěpení. Časový průběh derivátu HA-C12 (DS 10 %).

Příklady uskutečnění vynálezu

Příklad 1. Syntéza purifikace a izolace lauryl hyaluronanu (HA-C12)

Hyaluronát sodný (2,0 g, 5 mmol) charakterizovaný pomocí průměrné molekulové hmotnosti 17000 g/mol byl rozpuštěn ve 200 ml destilované vody. K tomuto roztoku bylo přidáno 100 ml tetrahydrofuranu (THF). Poté, co byl roztok homogenní, byly za míchání do směsi následně přidány triethylamin (2,091 ml, 15 mmol) a DMAP (0,031 g, 0,250 mmol). Ve druhé reakční baňce bylo 2,003 g kyseliny laurové (10 mmol, 2 ekv. na HA dimer) rozpuštěno ve 100 ml THF a aktivováno pomocí 1,16 ml benzoylchloridu (5 mmol, 2 ekv. na HA dimer) v přítomnosti 2,091 ml triethylaminu (TEA). Aktivace byla prováděna po dobu 30 minut při 25 ° C, poté byla aktivovaná směs přidána do roztoku obsahujícího HA. Výsledný roztok byl udržován při 25 ° C po dobu 2 hodin. K reakci byl přidán nasycený roztok chloridu sodného k vysrážení polymeru. Poté byl polymer promyt nadbytkem bezvodého IPA (50 ml). Produkt byl čtyřikrát promyt roztokem isopropanolu : vody 85 % (obj./obj.) (4 x 50 ml). Nakonec byla sraženina dvakrát promyta isopropanolem.

Stupeň substituce stanovený pomocí GC (DS_{GC}) byl 7,1 %.

Příklad 2. Syntéza, purifikace a izolace lauryl hyaluronanu (HA-C12)

Hyaluronát sodný (2,0 g, 5 mmol) charakterizovaný pomocí průměrné molekulové hmotnosti 17 000 g/mol byl rozpuštěn ve 200 ml destilované vody. K tomuto roztoku bylo přidáno 100 ml tetrahydrofuranu (THF). Poté, co byl roztok homogenní, byly za míchání do směsi následně přidány triethylamin (2,091 ml, 15 mmol) a DMAP (0,031 g, 0,250 mmol). Ve druhé reakční baňce bylo 2,003 g kyseliny laurové (10 mmol, 2 ekv. na HA dimer) rozpuštěno v THF (50 ml) a aktivováno pomocí 1,16 ml benzoylchloridu (5 mmol, 2 ekv. na HA dimer) v přítomnosti 2,091 ml triethylaminu (TEA). Aktivace byla prováděna po dobu 30 minut při 25 ° C, poté byla aktivovaná směs přidána do roztoku obsahujícího HA. Výsledný roztok byl udržován při 25 ° C po dobu 2 hodin. K reakci byl přidán nasycený roztok chloridu sodného k vysrážení polymeru. Poté byl polymer promyt nadbytkem bezvodého IPA (50 ml). Produkt byl čtyřikrát promyt roztokem isopropanolu: vody 85 % (obj./obj.) (4 x 50 ml). Nakonec byla sraženina dvakrát promyta isopropanolem.

Stupeň substituce stanovený pomocí GC (DS_{GC}) byl 10,3 %.

Příklad 3. Syntéza, purifikace a izolace derivátu obsahujícího kyselinu laurovou chemicky roubovanou (substituovanou) na hyaluronan (lauryl hyaluronan)

Hyaluronan (2,02 g, 5 mmol) charakterizovaný pomocí průměrné molekulové hmotnosti 17000 g/mol byl rozpuštěn ve 100 ml destilované vody. K tomuto roztoku bylo přidáno 50 ml tetrahydrofuranu (THF). Poté, co byl roztok homogenní, byly za míchání do směsi následně přidány triethylamin (2,091 ml, 15 mmol) a DMAP (0,031 g, 0,250 mmol). Ve druhé reakční baňce bylo 1,302 g kyseliny laurové (6,5 mmol, 1,3 ekv. na HA dimer) rozpuštěno v 50 ml THF a aktivováno 0,755 ml benzoylchloridu (6,5 mmol, 1,3 ekv. na HA dimer) v přítomnosti 2,091 ml triethylaminu (TEA). Aktivace byla prováděna po dobu 30 minut při 25 ° C, poté byla aktivovaná směs přidána do roztoku obsahujícího HA. Acylační reakce byla prováděna při 25 ° C po dobu 2 hodin. K reakci byl přidán nasycený roztok chloridu sodného k vysrážení polymeru. Poté byl polymer promyt nadbytkem bezvodého IPA (50 ml). Produkt byl čtyřikrát promyt roztokem isopropanolu: vody 85 % (obj./obj.) (4 x 50 ml). Nakonec byla sraženina dvakrát promyta isopropanolem.

Stupeň substituce stanovený pomocí GC (DS_{GC}) je 14,5 %.

Příklad 4. Syntéza, purifikace a izolace derivátu obsahujícího kyselinu laurovou chemicky roubovanou (substituovanou) na hyaluronan (lauryl hyaluronan)

Hyaluronan (2,02 g, 5 mmol) charakterizovaný pomocí průměrné molekulové hmotnosti 17 000 g/mol byl rozpuštěn ve 100 ml destilované vody. K tomuto roztoku bylo přidáno 33 ml tetrahydrofuranu (THF). Poté, co byl roztok homogenní, byly za míchání do směsi následně přidány triethylamin (2,091 ml, 15 mmol) a DMAP (0,031 g, 0,250 mmol). Ve druhé reakční baňce bylo 1,302 g kyseliny laurové (6,5 mmol, 1,3 ekv. na HA dimer) rozpuštěno v 33 ml THF a aktivováno 0,755 ml benzoylchloridu (6,5 mmol, 1,3 ekv. na HA dimer) v přítomnost 2,091 ml triethylaminu (TEA). Aktivace byla prováděna po dobu 30 minut při 25 ° C, poté byla aktivovaná směs přidána do roztoku obsahujícího HA. Acylační reakce byla prováděna při 25 ° C po dobu 2 hodin. K reakci byl přidán nasycený roztok chloridu sodného k vysrážení polymeru. Poté byl polymer promyt nadbytkem bezvodého IPA (50 ml). Produkt byl čtyřikrát promyt roztokem isopropanolu: vody 85 % (obj./obj.) (4 x 50 ml). Nakonec byla sraženina dvakrát promyta isopropanolem.

Stupeň substituce stanovený pomocí GC (DS_{GC}) je 20,4 %.

Příklad 5. Syntéza, purifikace a izolace derivátu obsahujícího kyselinu laurovou chemicky roubovanou (substituovanou) na hyaluronan (lauryl hyaluronan)

Hyaluronan (2,02 g, 5 mmol) charakterizovaný pomocí průměrné molekulové hmotnosti 17 000 g/mol byl rozpuštěn ve 100 ml destilované vody. K tomuto roztoku bylo přidáno 20 ml tetrahydrofuranu (THF). Poté, co byl roztok homogenní, byly za míchání do směsi následně přidány triethylamin (2,091 ml, 15 mmol) a DMAP (0,031 g, 0,250 mmol). Ve druhé reakční baňce bylo 1,302 g kyseliny laurové (6,5 mmol, 1,3 ekv. na HA dimer) rozpuštěno ve 20 ml THF a aktivováno 0,755 ml benzoylchloridu (6,5 mmol, 1,3 ekv. na HA dimer) v přítomnost 2,091 ml triethylaminu (TEA). Aktivace byla prováděna po dobu 30 minut při 25 ° C, poté byla aktivovaná směs přidána do roztoku obsahujícího HA. Acylační reakce byla prováděna při 25 ° C po dobu 2 hodin. K reakci byl přidán nasycený roztok chloridu sodného k vysrážení polymeru. Poté byl polymer promyt nadbytkem bezvodého IPA (50 ml). Produkt byl čtyřikrát promyt roztokem isopropanolu: vody 85 % (obj./obj.) (4 x 50 ml). Nakonec byla sraženina dvakrát promyta isopropanolem.

Stupeň substituce stanovený pomocí GC (DS_{GC}) je 28,4 %.

Příklad 6. Syntéza, purifikace a izolace derivátu obsahujícího kyselinu laurovou chemicky roubovanou (substituovanou) na hyaluronan

Hyaluronát sodný (2,0 g, 5 mmol) charakterizovaný pomocí průměrné molekulové hmotnosti 17000 g/mol byl rozpuštěn ve 40 ml destilované vody. K tomuto roztoku bylo přidáno 17 ml tetrahydrofuranu (THF). Poté, co byl roztok homogenní, byly za míchání do směsi následně přidány triethylamin (2,091 ml, 15 mmol) a DMAP (0,031 g, 0,250 mmol). Ve druhé reakční baňce bylo 1,303 g kyseliny laurové (6,5 mmol, 1,3 ekv. na HA dimer) rozpuštěno v 17 ml THF a aktivováno 0,58 ml benzoylchloridu (5 mmol, 1,0 ekv. na HA dimer) v přítomnosti 2,091 ml triethylaminu (TEA). Aktivace byla prováděna po dobu 30 minut při 25 ° C, poté byla aktivovaná směs přidána do roztoku obsahujícího HA. Výsledný roztok byl udržován při 25 ° C po dobu 2 hodin. K reakci byl přidán nasycený roztok chloridu sodného k vysrážení polymeru. Poté byl polymer promyt nadbytkem bezvodého IPA (50 ml). Produkt byl čtyřikrát promyt roztokem isopropanolu: vody 85 % (obj./obj.) (4 x 50 ml). Nakonec byla sraženina dvakrát promyta isopropanolem.

Stupeň substituce stanovený pomocí GC (DS_{GC}) je 29,9 %.

Příklad 7. Syntéza, purifikace a izolace derivátu obsahujícího kyselinu laurovou chemicky roubovanou (substituovanou) na hyaluronan

Hyaluronát sodný (2,0 g, 5 mmol) charakterizovaný pomocí průměrné molekulové hmotnosti 17000 g/mol byl rozpuštěn ve 20 ml destilované vody. K tomuto roztoku bylo přidáno 10 ml THF. Poté, co byl roztok homogenní, byly za míchání do směsi následně přidány triethylamin (2,091 ml, 15 mmol) a DMAP (0,031 g, 0,250 mmol). Ve druhé reakční baňce bylo 1,302 g kyseliny laurové (5 mmol, 1,3 ekv. na HA dimer) rozpuštěno v 10 ml THF a aktivováno 0,755 ml benzoylchloridu (6,5 mmol, 1,3 ekv. na HA dimer) v přítomnosti 2,091 ml triethylaminu (TEA). Aktivace byla prováděna po dobu 30 minut při 25 ° C, poté byla aktivovaná směs přidána do roztoku obsahujícího HA. Výsledný roztok byl udržován při 25 ° C po dobu 2 hodin. K reakci byl přidán nasycený roztok chloridu sodného k vysrážení polymeru. Poté byl polymer promyt přebytkem bezvodého IPA (200 ml). Produkt byl čtyřikrát promyt roztokem isopropanolu: vody 85 % (obj./obj.) (4 x 200 ml). Nakonec byla sraženina třikrát promyta isopropanolem (200 ml). Chemická struktura byla potvrzena pomocí NMR. Množství volné mastné kyseliny ve vzorku bylo <0,1 % hm.

Stupeň substituce stanovený pomocí GC (DS_{GC}) je 35,8 %.

Tabulka 6. Stanovení optických vlastností pro derivát HA-C12 (17000 g/ mol, c = 0,15 hm. %) připravený v různých koncentracích za použití 1,3 ekv. aktivované mastné kyseliny.

DS	C (%)	Rozpustnost	Zákal	Absorbance	Transmitance
11,1	0,5	dobrá	1,1	0,002	99,6
21,5	1	dobrá	1,3	0,002	99,2
30,1	1,5	dobrá	1,7	0,004	99,4
45,2	2,5	přiměřená	20,3	0,189	64,4
51,6	3	nízká	48,4	0,402	37,6
58,5	5	nízká	82,1	0,588	24,7

Příklad 8. Syntéza kyseliny undecylenové roubované (substituované) na hyaluronan

Hyaluronát sodný (5 g, 12,5 mmol) charakterizovaný pomocí průměrné molekulové hmotnosti 84000 g/mol byl rozpuštěn ve 100 ml destilované vody. K tomuto roztoku bylo přidáno 50 ml tetrahydrofuranu (THF). Poté, co byl roztok homogenní, se za míchání přidalo 3,23 g DIPEA (15 mmol) a DMAP (0,076 g, 0,6 mmol). Ve druhé reakční baňce bylo 0,921 g kyseliny undecylenové (5 mmol, 0,4 ekv. na HA dimer) rozpuštěno v THF (50 ml) a aktivováno 0,581 ml benzoylchloridu (5 mmol, 0,4 ekv. na HA dimer) v přítomnost 3,23 g DIPEA. Aktivace byla prováděna po dobu 30 minut při 25 ° C, poté byla aktivovaná směs přidána do roztoku obsahujícího HA. Výsledný roztok byl udržován při 25 ° C po dobu 2 hodin. K reakci byl přidán nasycený roztok chloridu sodného k vysrážení polymeru. Poté byl polymer promyt nadbytkem bezvodého IPA (50 ml). Produkt byl čtyřikrát promyt roztokem isopropanolu: vody 85 % (obj./obj.) (4 x 50 ml). Nakonec byla sraženina dvakrát promyta isopropanolem.

Stupeň substituce stanovený pomocí NMR (DS_{NMR}) byl 16,8 %.

Příklad 9. Syntéza, purifikace a izolace derivátu obsahujícího kyselinu olejovou chemicky roubovanou (substituovanou) na hyaluronan

Hyaluronát sodný (2,0 g, 5,0 mmol) charakterizovaný pomocí průměrné molekulové hmotnosti 15000 g/mol byl rozpuštěn ve 40 ml destilované vody. K tomuto roztoku bylo přidáno 20 ml 1,4-dioxanu. Poté, co byl roztok homogenní, byly za míchání do směsi následně přidány triethylamin (2,091 ml, 15,0 mmol) a DMAP (0,031 g, 0,3 mmol). Ve druhé reakční baňce bylo 0,424 g kyseliny olejové (1,5 mmol, 1,5 ekvivalentu na HA dimer) rozpuštěno ve 20 ml 1,4-dioxanu a aktivováno 0,21 ml benzoylchloridu (1,5 mmol, 0,5 ekvivalentu na HA dimer) v přítomnosti triethylaminu (2,091 ml, 15,0 mmol). Aktivace byla prováděna po dobu 30 minut při 25 ° C, poté byla aktivovaná směs přidána do roztoku obsahujícího HA. Výsledný roztok byl udržován při 25 ° C po dobu 2 hodin. K reakci byl přidán nasycený roztok chloridu sodného k vysrážení polymeru. Poté byl polymer promyt nadbytkem bezvodého IPA (50 ml). Produkt byl čtyřikrát promyt roztokem isopropanolu: vody 85 % (obj./obj.) (4 x 50 ml). Nakonec byla sraženina dvakrát promyta isopropanolem.

Chemická struktura byla potvrzena pomocí NMR.

Stupeň substituce stanovený pomocí GC (DS) = 4,5 %.

Příklad 10. Syntéza derivátu obsahujícího kyselinu olejovou roubovanou (substituovanou) na hyaluronan

Hyaluronát sodný (0,50 g, 1,3 mmol) charakterizovaný pomocí průměrné molekulové hmotnosti 15000 g/mol byl rozpuštěn v 32 ml destilované vody. K tomuto roztoku bylo přidáno 16 ml 1,4-dioxanu. Poté, co byl roztok homogenní, byly za míchání do směsi následně přidány triethylamin (0,523 ml, 3,8 mmol) a DMAP (0,008 g, 0,10 mmol). Ve druhé reakční baňce bylo 0,212 g kyseliny olejové (10 mmol, 0,5 ekv. na HA dimer) rozpuštěno v 16 ml 1,4-dioxanu a aktivováno 0,073 ml benzoylchloridu (10 mmol, 0,6 ekv. na HA dimer) v přítomnosti 0,523 ml, (3,8 mmol) triethylaminu (TEA). Aktivace byla prováděna po dobu 30 minut při 25 ° C, poté byla aktivovaná směs přidána do roztoku obsahujícího HA. Výsledný roztok byl udržován při 25 ° C po dobu 2 hodin. K reakci byl přidán nasycený roztok chloridu sodného k vysrážení polymeru. Poté byl polymer promyt nadbytkem bezvodého IPA (50 ml). Produkt byl čtyřikrát promyt roztokem isopropanolu: vody 85 % (obj./obj.) (4 x 50 ml). Nakonec byla sraženina dvakrát promyta isopropanolem.

Stupeň substituce byl stanoven pomocí GC jako (DS) = 5,5 %.

Příklad 11. Syntéza derivátu obsahujícího kyselinu olejovou roubovanou (substituovanou) na hyaluronan

Hyaluronát sodný (0,485 g, 1,2 mmol) charakterizovaný pomocí průměrné molekulové hmotnosti 16800 g/mol (polydisperzita = 1 000) byl rozpuštěn ve 30 ml destilované vody. K tomuto roztoku bylo přidáno 15 ml 1,4-dioxanu. Poté, co byl roztok homogenní, byly za míchání do směsi následně přidány triethylamin (0,507 ml, 4,5 mmol) a DMAP (0,007 g, 0,10 mmol). Ve druhé reakční baňce bylo 0,171 g kyseliny olejové (0,6 mmol, 0,5 ekv. na HA dimer) rozpuštěno v 15 ml 1,4-dioxanu a aktivováno 0,070 ml benzoylchloridu (6 mmol, 0,5 ekv. na HA dimer) v přítomnosti 0,507 ml triethylaminu (TEA). Aktivace byla prováděna po dobu 30 minut při 25 ° C, poté byla aktivovaná směs přidána do roztoku obsahujícího HA. Výsledný roztok byl udržován při 25 ° C po dobu 2 hodin. K reakci byl přidán nasycený roztok chloridu sodného k vysrážení polymeru. Poté byl polymer promyt nadbytkem bezvodého IPA (50 ml). Produkt byl čtyřikrát promyt roztokem isopropanolu: vody 85 % (obj./obj.) (4 x 50 ml). Nakonec byla sraženina dvakrát promyta isopropanolem.

Stupeň substituce stanovený pomocí GC (DS) = 6,5 %.

Příklad 12. Syntéza derivátu obsahujícího kyselinu olejovou roubovanou (substituovanou) na hyaluronan

Hyaluronát sodný (0,50 g, 1,3 mmol) charakterizovaný pomocí průměrné molekulové hmotnosti 15000 g/mol byl rozpuštěn v 10 ml destilované vody. K tomuto roztoku bylo přidáno 5 ml 1,4-dioxanu. Poté, co byl roztok homogenní, byly za míchání do směsi následně přidány triethylamin (0,523 ml, 3,8 mmol) a DMAP (0,008 g, 0,10 mmol). Ve druhé reakční baňce bylo 0,212 g kyseliny olejové (10 mmol, 0,5 ekv. na HA dimer) rozpuštěno v 5 ml 1,4-dioxanu a aktivováno 0,073 ml benzoylchloridu (10 mmol, 0,6 ekv. na HA dimer) v přítomnosti 0,523 ml, (3,8 mmol) triethylaminu (TEA). Aktivace byla prováděna po dobu 30 minut při 25 ° C, poté byla aktivovaná směs přidána do roztoku obsahujícího HA. Výsledný roztok byl udržován při 25 ° C po dobu 2 hodin. K reakci byl přidán nasycený roztok chloridu sodného k vysrážení polymeru. Poté byl polymer promyt nadbytkem bezvodého IPA (50 ml). Produkt byl čtyřikrát promyt roztokem isopropanolu: vody 85 % (obj./obj.) (4 x 50 ml). Nakonec byla sraženina dvakrát promyta isopropanolem.

Stupeň substituce stanovený pomocí GC (DS) = 11,2 %.

Příklad 13. Syntéza derivátu obsahujícího kyselinu olejovou roubovanou (substituovanou) na hyaluronan

Hyaluronát sodný (0,6 g, 1,5 mmol) charakterizovaný pomocí průměrné molekulové hmotnosti 15000 g/mol byl rozpuštěn ve 12 ml destilované vody. K tomuto roztoku bylo přidáno 6 ml 1,4-dioxanu. Poté, co byl roztok homogenní, byly za míchání do směsi následně přidány triethylamin (0,46 ml, 4,5 mmol) a DMAP (0,008 g, 0,10 mmol). Ve druhé reakční baňce bylo 0,212 g kyseliny olejové (10 mmol, 0,5 ekv. na HA dimer) rozpuštěno v 6 ml 1,4-dioxanu a aktivováno 0,087 ml benzoylchloridu (10 mmol, 0,5 ekv. na HA dimer) v přítomnosti 0,46 ml triethylaminu (TEA). Aktivace byla prováděna po dobu 30 minut při 25 ° C, poté byla aktivovaná směs přidána do roztoku obsahujícího HA. Výsledný roztok byl udržován při 25 ° C po dobu 2 hodin. K reakci byl přidán nasycený roztok chloridu sodného k vysrážení polymeru. Poté byl polymer promyt nadbytkem bezvodého IPA (50 ml). Produkt byl čtyřikrát promyt roztokem isopropanolu: vody 85 % (obj./obj.) (4 x 50 ml). Nakonec byla sraženina dvakrát promyta isopropanolem.

Chemická struktura byla potvrzena pomocí NMR.

Stupeň substituce stanovený pomocí GC (DS) = 12,4 %.

Příklad 14. Syntéza kyseliny olejové roubované (substituované) na hyaluronan

Hyaluronát sodný (0,50 g, 1,3 mmol) charakterizovaný pomocí průměrné molekulové hmotnosti 15000 g/mol byl rozpuštěn v 10 ml destilované vody. K tomuto roztoku bylo přidáno 5 ml terc.butanolu. Poté, co byl roztok homogenní, byly za míchání do směsi následně přidány triethylamin (0,523 ml, 3,8 mmol) a DMAP (0,008 g, 0,10 mmol). Ve druhé reakční baňce bylo 0,212 g kyseliny olejové (10 mmol, 0,5 ekv. na HA dimer) rozpuštěno v 5 ml terc-butanolu a aktivováno 0,073 ml benzoylchloridu (10 mmol, 0,6 ekv. na HA dimer) v přítomnosti 0,523 ml (3,8 mmol) triethylaminu (TEA). Aktivace byla prováděna po dobu 30 minut při 25 ° C, poté byla aktivovaná směs přidána do roztoku obsahujícího HA. Výsledný roztok byl udržován při 25 ° C po dobu 2 hodin. K reakci byl přidán nasycený roztok chloridu sodného k vysrážení polymeru. Poté byl polymer promyt nadbytkem bezvodého IPA (50 ml). Produkt byl čtyřikrát promyt roztokem isopropanolu: vody 85 % (obj./obj.) (4 x 50 ml). Nakonec byla sraženina dvakrát promyta isopropanolem.

Stupeň substituce stanovený pomocí GC (DS) = 3,1 %.

Příklad 15. Syntéza, purifikace a izolace derivátu obsahujícího kyselinu olejovou chemicky roubovanou (substituované)- na hyaluronan

Hyaluronát sodný (0,485 g, 1,5 mmol) charakterizovaný pomocí průměrné molekulové hmotnosti 16 800 g/mol (polydisperzita = 1 000) byl rozpuštěn ve 12 ml destilované vody. K tomuto roztoku bylo přidáno 15 ml terc.butanolu. Poté, co byl roztok homogenní, byly za míchání do směsi následně přidány triethylamin (0,507 ml, 4,5 mmol) a DMAP (0,007 g, 0,10 mmol). Ve druhé reakční nádobě se 0,318 g kyseliny olejové (1,1 mmol, 0,75 ekv. na HA dimer) se rozpustí v 15 ml terc.butanolu a aktivovány 0,106 ml benzoylchloridu (1,1 mmol, 0,75 ekv. na HA dimer) v přítomnosti 0,507 ml triethylaminu (TEA). Aktivace byla prováděna po dobu 30 minut při 25 °C, poté byla aktivovaná směs přidána do roztoku obsahujícího HA. Výsledný roztok byl udržován při 25 °C po dobu 2 hodin. K reakci byl přidán nasycený roztok chloridu sodného k vysrážení polymeru. Poté byl polymer promyt nadbytkem bezvodého IPA (50 ml). Produkt byl čtyřikrát promyt roztokem isopropanolu: vody 85 % (obj./obj.) (4 x 50 ml). Nakonec byla sraženina dvakrát promyta isopropanolem.

Chemická struktura byla potvrzena pomocí NMR.

Stupeň substituce stanovený pomocí GC (DS) = 6,0 %.

Příklad 16. Syntéza kyseliny olejové roubované (substituované) na hyaluronan

Hyaluronát sodný (0,5 g, 1,5 mmol) charakterizovaný pomocí průměrné molekulové hmotnosti 15000 g/mol byl rozpuštěn v 32 ml destilované vody. K tomuto roztoku bylo přidáno 16 ml terc.butanolu. Poté, co byl roztok homogenní, byly za míchání do směsi následně přidány triethylamin (0,523 ml, 4,5 mmol) a DMAP (0,009 g, 0,10 mmol). Ve druhé reakční baňce bylo 0,318 g kyseliny olejové (1,1 mmol, 0,75 ekv. na HA dimer) rozpuštěno v 16 ml terc.butanolu a aktivováno 0,109 ml benzoylchloridu (1,1 mmol, 0,75 ekv. na HA dimer). v přítomnosti 0,523 ml triethylaminu (TEA). Aktivace byla prováděna po dobu 30 minut při 25 ° C, poté byla aktivovaná směs přidána do roztoku obsahujícího HA. Výsledný roztok byl udržován při 25 ° C po dobu 2 hodin. K reakci byl přidán nasycený roztok chloridu sodného k vysrážení polymeru. Poté byl polymer promyt nadbytkem bezvodého IPA (50 ml). Produkt byl čtyřikrát promyt roztokem isopropanolu: vody 85 % (obj./obj.) (4 x 50 ml). Nakonec byla sraženina dvakrát promyta isopropanolem.

Chemická struktura byla potvrzena pomocí NMR.

Stupeň substituce stanovený pomocí GC (DS) = 7,3 %.

Příklad 17. Syntéza kyseliny olejové roubované (substituované) na hyaluronan

Hyaluronát sodný (0,60 g, 1,3 mmol) charakterizovaný pomocí průměrné molekulové hmotnosti 13700 g/mol (polydisperzita = 1 000) byl rozpuštěn v 10 ml destilované vody. K tomuto roztoku bylo přidáno 6 ml TBA. Poté, co byl roztok homogenní, byly za míchání do směsi následně přidány triethylamin (0,627 ml, 4,5 mmol) a DMAP (0,008 g, 0,10 mmol). Ve druhé reakční baňce bylo 0,318 g kyseliny olejové (10 mmol, 0,5 ekv. na HA dimer) rozpuštěno v 6 ml TBA a aktivováno 0,131 ml benzoylchloridu (1,1 mmol, 0,75 ekv. na HA dimer) v přítomnost 0,523 ml, (4,5 mmol) triethylaminu (TEA). Aktivace byla prováděna po dobu 30 minut při 25 ° C, poté byla aktivovaná směs přidána do roztoku obsahujícího HA. Výsledný roztok byl udržován při 25 ° C po dobu 2 hodin. K reakci byl přidán nasycený roztok chloridu sodného k vysrážení polymeru. Poté byl polymer promyt nadbytkem bezvodého IPA (50 ml). Produkt byl čtyřikrát promyt roztokem isopropanolu: vody 85 % (obj./obj.) (4 x 50 ml). Nakonec byla sraženina dvakrát promyta isopropanolem.

Stupeň substituce stanovený pomocí GC (DS) = 8,9 %.

Příklad 18. Syntéza kyseliny olejové roubované (substituované) na hyaluronan

Hyaluronát sodný (2,0 g, 5,0 mmol) charakterizovaný pomocí průměrné molekulové hmotnosti 17 000 g / mol byl rozpuštěn ve 40 ml destilované vody. K tomuto roztoku bylo přidáno 20 ml terc.butanolu. Poté, co byl roztok homogenní, byly za míchání do směsi následně přidány triethylamin (2,091 ml, 15 mmol) a DMAP (0,008 g, 0,10 mmol). Ve druhé reakční baňce bylo 2,12 g kyseliny olejové (10 mmol, 0,5 ekv. na HA dimer) rozpuštěno v 5 ml 1,4-dioxanu a aktivováno 0,073 ml benzoylchloridu (10 mmol, 0,6 ekv. na HA dimer) v přítomnosti 0,523 ml, 2,091 ml (15 mmol TEA). Aktivace byla prováděna po dobu 30 minut při 25 ° C, poté byla aktivovaná směs přidána do roztoku obsahujícího HA. Výsledný roztok byl udržován při 25 ° C po dobu 2 hodin. K reakci byl přidán nasycený roztok chloridu sodného k vysrážení polymeru. Poté byl polymer promyt nadbytkem bezvodého IPA (50 ml). Produkt byl čtyřikrát promyt roztokem isopropanolu: vody 85 % (obj./obj.) (4 x 50 ml). Nakonec byla sraženina dvakrát promyta isopropanolem.

Stupeň substituce stanovený pomocí GC (DS) = 15,9 %.

Příklad 19. Syntéza, purifikace a izolace derivátu obsahujícího kyselinu olejovou chemicky roubovanou (substituovanou) na hyaluronan

Hyaluronát sodný (2,0 g, 5 mmol) charakterizovaný pomocí průměrné molekulové hmotností 17 000 g/mol byl rozpuštěn ve 40 ml destilované vody. K tomuto roztoku bylo přidáno 20 ml 1,4-dioxanu. Poté, co byl roztok homogenní, byly za míchání do směsi následně přidány triethylamin (2,091 ml, 15 mmol) a DMAP (0,031 g, 0,250 mmol). Ve druhé reakční baňce bylo 2,825 g kyseliny olejové (10 mmol, 2 ekvivalenty na HA dimer) rozpuštěno ve 20 ml 1,4-dioxanu a aktivováno 1,165 ml benzoylchloridu (10 mmol, 2 ekvivalenty na HA dimer) v přítomnosti 2,091 ml triethylaminu (TEA). Aktivace byla prováděna po dobu 30 minut při 25 ° C, poté byla aktivovaná směs přidána do roztoku obsahujícího HA. Výsledný roztok byl udržován při 25 ° C po dobu 2 hodin. K reakci byl přidán nasycený roztok chloridu sodného k vysrážení polymeru. Poté byl polymer promyt nadbytkem bezvodého IPA (50 ml). Produkt byl čtyřikrát promyt roztokem isopropanolu: vody 85 % (obj./obj.) (4 x 50 ml). Nakonec byla sraženina dvakrát promyta isopropanolem.

Chemická struktura byla potvrzena pomocí NMR.

Stupeň substituce stanovený pomocí GC (DS) = 33,7 %.

Absorbance = 0,091, zákal = 300 NTU

Příklad 20. Syntéza, purifikace a izolace derivátu obsahujícího kyselinu olejovou chemicky roubovanou (substituovanou) na hyaluronan

Hyaluronát sodný (2,0 g, 5 mmol) charakterizovaný pomocí průměrné molekulové hmotnosti 17 000 g/mol byl rozpuštěn ve 40 ml destilované vody. K tomuto roztoku bylo přidáno 20 ml dioxanu. Poté, co byl roztok homogenní, byly za míchání do směsi následně přidány triethylamin (2,091 ml, 15 mmol) a DMAP (0,031 g, 0,250 mmol). Ve druhé reakční baňce bylo 2,825 g kyseliny olejové (10 mmol, 2 ekvivalenty na HA dimer) rozpuštěno ve 20 ml 1,4-dioxanu a aktivováno 1,165 ml benzoylchloridu (10 mmol, 2 ekvivalenty na HA dimer) v přítomnosti 2,091 ml triethylaminu (TEA). Aktivace byla prováděna po dobu 30 minut při 5 ° C, poté byla aktivovaná směs přidána do roztoku obsahujícího HA. Výsledný roztok byl udržován při 5 ° C po dobu 2 hodin. K reakci byl přidán nasycený roztok chloridu sodného k vysrážení polymeru. Poté byl polymer promyt nadbytkem bezvodého IPA (50 ml). Produkt byl čtyřikrát promyt roztokem isopropanolu: vody 85 % (obj./obj.) (4 x 50 ml). Nakonec byla sraženina dvakrát promyta isopropanolem.

Chemická struktura byla potvrzena pomocí NMR.

Stupeň substituce stanovený plynovou chromatografií (DS_{GC}) = 25,7 %.

Absorbance = 3,04, zákal = neurčitý

Příklad 21. Syntéza, purifikace a izolace derivátu obsahujícího kyselinu laurovou chemicky roubovanou (substituovanou) na hyaluronan

Hyaluronát sodný (2,0 g, 5 mmol) charakterizovaný pomocí průměrné molekulové hmotnosti 84 000 g / mol byl rozpuštěn ve 100 ml destilované vody. K tomuto roztoku bylo přidáno 50 ml tetrahydrofuranu (THF). Poté, co byl roztok homogenní, byly za míchání do směsi následně přidány triethylamin (2,091 ml, 15 mmol) a DMAP (0,031 g, 0,250 mmol). Ve druhé reakční baňce bylo 0,5 g kyseliny laurové (2,5 mmol, 0,5 ekv. na HA dimer) rozpuštěno v THF (50 ml) a aktivováno 0,29 ml benzoylchloridu (2,5 mmol, 0,5 ekv. na HA dimer) v přítomnost 2,091 ml triethylaminu (TEA). Aktivace byla prováděna po dobu 30 minut při 25 ° C, poté byla aktivovaná směs přidána do roztoku obsahujícího HA. Výsledný roztok byl udržován při 25 ° C po dobu 2 hodin. K reakci byl přidán nasycený roztok chloridu sodného k vysrážení polymeru. Poté byl

polymer promyt nadbytkem bezvodého IPA (50 ml). Produkt byl čtyřikrát promyt roztokem isopropanolu: vody 85 % (obj./obj.) (4 x 50 ml). Nakonec byla sraženina dvakrát promyta isopropanolem.

Chemická struktura byla potvrzena pomocí NMR.

Množství navázaných mastných kyselin ve vzorku se považuje za 3,9 hm. % (GC).

Množství volné mastné kyseliny ve vzorku bylo < 0,1 hm. %

Stupeň substituce stanovený plynovou chromatografií (DS_{GC}) = 13,9 %.

Molekulová hmotnost vzorku stanovená pomocí SEC-MALLS byla 89 000 g/mol a polydisperzita = 1,5.

Příklad 22. Syntéza, purifikace a izolace derivátu obsahujícího kyselinu laurovou chemicky roubovanou (substituovanou) na hyaluronan

Hyaluronát sodný (1,0 g, 2,5 mmol) charakterizovaný pomocí průměrné molekulové hmotnosti 84 000 g/mol byl rozpuštěn ve 20 ml destilované vody. K tomuto roztoku bylo přidáno 10 ml isopropanolu (IPA). Poté, co byl roztok homogenní, byly za míchání do směsi následně přidány triethylamin (1,045 ml, 15 mmol) a DMAP (0,015 g, 0,1 mmol). Ve druhé reakční baňce bylo 1,00 g kyseliny laurové (5 mmol, 1 ekv. na HA dimer) rozpuštěno v 10 ml isopropanolu (IPA) a aktivováno 0,29 ml benzoylchloridu (2,5 mmol, 1 ekv. na HA dimer) v přítomnosti 1,045 ml, triethylaminu (TEA). Aktivace byla prováděna po dobu 30 minut při 25 ° C, poté byla aktivovaná směs přidána do roztoku obsahujícího HA. Výsledný roztok byl udržován při 25 ° C po dobu 2 hodin. K reakci byl přidán nasycený roztok chloridu sodného k vysrážení polymeru. Poté byl polymer promyt přebytkem bezvodého IPA (100 ml). Produkt byl čtyřikrát promyt roztokem isopropanolu: vody 85 % (obj./obj.) (4 x 100 ml). Nakonec byla sraženina dvakrát promyta isopropanolem (2 x 100 ml).

Chemická struktura byla potvrzena pomocí NMR.

Množství navázaných mastných kyselin ve vzorku se považuje za 7,0 hm. % (GC).

Množství volné mastné kyseliny ve vzorku bylo < 0,1 hm. %

Stupeň substituce stanovený plynovou chromatografií (DSGC) = 15,0 %.

Příklad 23. Syntéza, čištění a izolace derivátu obsahujícího kyselinu laurovou chemicky roubovanou (substituovanou) na hyaluronan

Hyaluronát sodný (2,0 g, 5 mmol) charakterizovaný pomocí průměrné molekulové hmotnosti 260 000 g/mol byl rozpuštěn ve 40 ml destilované vody. K tomuto roztoku bylo přidáno 20 ml isopropanolu (IPA). Poté, co byl roztok homogenní, byly za míchání do směsi následně přidány triethylamin (2,091 ml, 15 mmol) a DMAP (0,031 g, 0,250 mmol). Ve druhé reakční baňce bylo 0,701 g kyseliny laurové (3,5 mmol, 0,7 ekv. na HA dimer) rozpuštěno ve 20 ml IPA a aktivováno 0,49 ml benzoylchloridu (3,5 mmol, 0,7 ekv. na HA dimer) v přítomnosti 2,091 ml triethylaminu (TEA). Aktivace byla prováděna po dobu 30 minut při 25 ° C, poté byla aktivovaná směs přidána do roztoku obsahujícího HA. Výsledný roztok byl udržován při 25 ° C po dobu 2 hodin. K reakci byl přidán nasycený roztok chloridu sodného k vysrážení polymeru. Poté byl polymer promyt nadbytkem bezvodého IPA (50 ml). Produkt byl čtyřikrát promyt roztokem isopropanolu: vody 85 % (obj./obj.) (4 x 50 ml). Nakonec byla sraženina dvakrát promyta isopropanolem.

Chemická struktura byla potvrzena pomocí NMR.

Stupeň substituce stanovený plynovou chromatografií (DS_{GC}) = 5,3 %.

Vzorek je nerozpustný ve vodě a ve fyziologickém roztoku.

Příklad 24. Syntéza, čištění a izolace derivátu obsahujícího kyselinu laurovou roubovanou (substituovanou) na hyaluronan

Hyaluronát sodný (5,0 g, 12,50 mmol) charakterizovaný pomocí průměrné molekulové hmotnosti 340000 g/mol byl rozpuštěn ve 250 ml destilované vody. K tomuto roztoku bylo přidáno 125 ml terc-butanolu (TBA). Poté, co byl roztok homogenní, byly za míchání do směsi následně přidány triethylamin (5,227 ml, 15 mmol) a DMAP (0,076 g, 0,6 mmol). Nakonec bylo přidáno 7,174 g anhydridu kyseliny laurové (18,2 mmol, 1,5 ekv. na HA dimer) předem rozpuštěné ve 125 ml TBA. Esterifikace byla prováděna při 25 ° C po dobu 2 hodin. K reakci byl přidán nasycený roztok chloridu sodného k vysrážení polymeru. Poté byl polymer promyt přebytkem bezvodého IPA (200 ml). Produkt byl čtyřikrát promyt roztokem isopropanolu: vody 85 % (obj./obj.) (4 x 200 ml). Nakonec byla sraženina dvakrát promyta isopropanolem.

Chemická struktura byla potvrzena pomocí NMR.

Množství navázaných mastných kyselin ve vzorku se považuje za 5,0 hm. % (GC).

Množství volné mastné kyseliny ve vzorku bylo <0,1 hm. %

Stupeň substituce stanovený plynovou chromatografií (DS_{GC}) = 9,3 %.

Vzorek je rozpustný ve vodě a ve fyziologickém roztoku.

Příklad 25. Syntéza, purifikace a izolace derivátu obsahujícího kyselinu laurovou chemicky roubovanou (substituovanou) na hyaluronan

Hyaluronát sodný (2,0 g, 5 mmol) charakterizovaný pomocí průměrné molekulové hmotnosti 260 000 g/mol byl rozpuštěn ve 100 ml destilované vody. K tomuto roztoku bylo přidáno 50 ml tetrahydrofuranu (THF). Poté, co byl roztok homogenní, byly za míchání do směsi následně přidány triethylamin (2,091 ml, 15 mmol) a DMAP (0,031 g, 0,250 mmol). Ve druhé reakční baňce bylo 1,002 g kyseliny laurové (5 mmol, 1 ekv. na HA dimer) rozpuštěno v 50 ml THF a aktivováno 0,70 ml benzoylchloridu (5 mmol, 1 ekv. na HA dimer) v přítomnosti 2,091 ml triethylaminu (TEA). Aktivace byla prováděna po dobu 30 minut při 25 ° C, poté byla aktivovaná směs přidána do roztoku obsahujícího HA. Výsledný roztok byl udržován při 25 ° C po dobu 2 hodin. K reakci byl přidán nasycený roztok chloridu sodného k vysrážení polymeru. Poté byl polymer promyt přebytkem bezvodého IPA (200 ml). Produkt byl čtyřikrát promyt roztokem isopropanolu: vody 85 % (obj./obj.) (4 x 200 ml). Nakonec byla sraženina třikrát promyta isopropanolem (3 x 200 ml).

Chemická struktura byla potvrzena pomocí NMR.

Množství navázaných mastných kyselin ve vzorku se považuje za 6,1 hm. % (GC).

Množství volné mastné kyseliny ve vzorku bylo <0,1 hm. %

Stupeň substituce stanovený plynovou chromatografií (DS_{GC}) = 9,4 %.

Vzorek je rozpustný ve vodě a ve fyziologickém roztoku.

Příklad 26. Syntéza, purifikace a izolace derivátu obsahujícího kyselinu laurovou chemicky roubovanou (substituovanou) na hyaluronan

Hyaluronát sodný (2,0 g, 5 mmol) charakterizovaný pomocí průměrné molekulové hmotnosti 260 000 g/mol byl rozpuštěn ve 100 ml destilované vody. K tomuto roztoku bylo přidáno 50 ml 1,4-dioxanu. Poté, co byl roztok homogenní, byly za míchání do směsi následně přidány triethylamin (2,091 ml, 15 mmol) a DMAP (0,031 g, 0,250 mmol). Ve druhé reakční baňce bylo 1,002 g kyseliny laurové (5 mmol, 1 ekv. na HA dimer) rozpuštěno v 50 ml 1,4 Dioxanu a aktivováno 0,70 ml benzoylchloridu (5 mmol, 1 ekv. na HA dimer) v přítomnosti 2,091 ml triethylaminu (TEA). Aktivace byla prováděna po dobu 30 minut při 25 ° C, poté byla aktivovaná směs přidána do roztoku obsahujícího HA. Výsledný roztok byl udržován při 25 ° C po dobu 2 hodin. K reakci byl přidán nasycený roztok chloridu sodného k vysrážení polymeru. Poté byl polymer promyt přebytkem bezvodého IPA (200 ml). Produkt byl čtyřikrát promyt roztokem isopropanolu: vody 85 % (obj./obj.) (4 x 200 ml). Nakonec byla sraženina třikrát promyta isopropanolem (3 x 200 ml).

Chemická struktura byla potvrzena pomocí NMR.

Množství navázaných mastných kyselin ve vzorku se považuje za 6,1 hm. % (GC).

Množství volné mastné kyseliny ve vzorku bylo <0,1 hm. %

Stupeň substituce stanovený plynovou chromatografií (DS_{GC}) = 9,7 %.

Vzorek je rozpustný ve vodě a ve fyziologickém roztoku

Příklad 27. Syntéza, purifikace a izolace derivátu obsahujícího kyselinu laurovou chemicky roubovanou (substituovanou) na hyaluronan

Hyaluronát sodný (5,0 g, 12,5 mmol) charakterizovaný pomocí průměrné molekulové hmotnosti 340000 g/mol byl rozpuštěn ve 250 ml destilované vody. K tomuto roztoku bylo přidáno 125 ml 1,4-dioxanu. Poté, co byl roztok homogenní, byly za míchání do směsi následně přidány triethylamin (5,227 ml, 37,5 mmol) a DMAP (0,076 g, 0,6 mmol). Ve druhé reakční baňce bylo rozpuštěno 7,1 lauranhydridu (18,8 mmol, 1,5 ekv. na HA dimer) ve 125 ml 1,4-dioxanu. Výsledný roztok byl udržován při 25 ° C po dobu 2 hodin. K reakci byl přidán nasycený roztok chloridu sodného k vysrážení polymeru. Poté byl polymer promyt přebytkem bezvodého IPA (2 x 200 ml). Produkt byl čtyřikrát promyt roztokem isopropanolu: vody 85 % (obj./obj.) (4 x 200 ml). Nakonec byla sraženina dvakrát promyta isopropanolem (2 x 200 ml).

Chemická struktura byla potvrzena pomocí NMR.

Množství navázaných mastných kyselin ve vzorku se považuje za 2,5 hm. % (GC).

Množství volné mastné kyseliny ve vzorku bylo <0,1 hm. %

Stupeň substituce stanovený pomocí GC (DS_{GC}) = 8,0 %.

Příklad 28. Syntéza, purifikace a izolace derivátu obsahujícího kyselinu laurovou chemicky roubovanou (substituovanou) na hyaluronan

Hyaluronát sodný (5,0 g, 12,5 mmol) charakterizovaný pomocí průměrné molekulové hmotnosti 442000 g/mol byl rozpuštěn ve 250 ml destilované vody. K tomuto roztoku bylo přidáno 125 ml tetrahydrofuranu. Poté, co byl roztok homogenní, byly za míchání do směsi následně přidány triethylamin (5,2 ml, 37,5 mmol) a DMAP (0,076 g, 0,6 mmol). Ve druhé reakční baňce bylo 2,5 g kyseliny laurové (12,5 mmol, 1 ekv. na HA dimer) rozpuštěno ve 125 ml tetrahydrofuranu a aktivováno 1,76 ml benzoylchloridu (12,5 mmol, 1 ekv. na HA dimer) v přítomnosti 5,22 ml

(37,5 mmol triethylaminu (TEA)). Aktivace byla prováděna po dobu 30 minut při 25 ° C, poté byla aktivovaná směs přidána do roztoku obsahujícího HA. Výsledný roztok byl udržován při 25 ° C po dobu 2 hodin. K reakci byl přidán nasycený roztok chloridu sodného k vysrážení polymeru. Poté byl polymer promyt přebytkem bezvodého IPA (200 ml). Produkt byl čtyřikrát promyt roztokem isopropanolu: vody 85 % (obj./obj.) (4 x 200 ml). Nakonec byla sraženina dvakrát promyta isopropanolem (2 x 200 ml).

Chemická struktura byla potvrzena pomocí NMR.

Množství navázaných mastných kyselin ve vzorku se považuje za 4,5 hm. % (GC).

Množství volné mastné kyseliny ve vzorku bylo <0,1 hm.%

Stupeň substituce stanovený plynovou chromatografií (DS_{GC}) = 8,9 %.

Vzorek je rozpustný ve vodě a ve fyziologickém roztoku.

Příklad 29. Syntéza, čištění a izolace derivátu obsahujícího kyselinu laurovou roubovanou (substituovanou) na hyaluronan

Hyaluronát sodný (2,0 g, 5,0 mmol) charakterizovaný pomocí průměrné molekulové hmotnosti 340000 g/mol byl rozpuštěn ve 100 ml destilované vody. K tomuto roztoku bylo přidáno 50 ml tetrahydrofuranu (THF). Poté, co byl roztok homogenní, byly za míchání do směsi následně přidány triethylamin (2,091 ml, 15 mmol) a DMAP (0,076 g, 0,6 mmol). Nakonec bylo přidáno 1,913 g anhydridu kyseliny laurové (5 mmol nebo 1 ekv. na HA dimer) předem rozpuštěném v 50 ml THF. Esterifikace byla prováděna při 25 ° C po dobu 2 hodin. K reakci byl přidán nasycený roztok chloridu sodného k vysrážení polymeru. Poté byl polymer promyt přebytkem bezvodého IPA (200 ml). Produkt byl čtyřikrát promyt roztokem isopropanolu: vody 85 % (obj./obj.) (4 x 200 ml). Nakonec byla sraženina dvakrát promyta isopropanolem.

Chemická struktura byla potvrzena pomocí NMR.

Množství navázaných mastných kyselin ve vzorku se považuje za 5,0 hm. % (GC).

Množství volné mastné kyseliny ve vzorku bylo <0,1 hm.%

Stupeň substituce stanovený plynovou chromatografií (DS_{GC}) = 10,5 %.

Vzorek je rozpustný ve vodě a ve fyziologickém roztoku.

Příklad 30. Syntéza, purifikace a izolace derivátu obsahujícího kyselinu laurovou chemicky roubovanou (substituovanou) na hyaluronan

Hyaluronát sodný (2,0 g, 5,0 mmol) charakterizovaný pomocí průměrné molekulové hmotnosti 290000 g/mol byl rozpuštěn ve 100 ml destilované vody. K tomuto roztoku bylo přidáno 50 ml THF. Poté, co byl roztok homogenní, byly za míchání do směsi následně přidány triethylamin (2,090 ml, 37,5 mmol) a DMAP (0,031 g, 0,6 mmol). Ve druhé reakční baňce bylo v 50 ml THF rozpuštěno 1,91 g anhydridu kyseliny laurové (5 mmol nebo 1 ekv. na HA dimer). Směs byla přidána k roztoku obsahujícímu HA. Výsledný roztok byl udržován při 25 ° C po dobu 2 hodin. K reakci byl přidán nasycený roztok chloridu sodného k vysrážení polymeru. Poté byl polymer promyt nadbytkem bezvodého IPA (50 ml). Produkt byl čtyřikrát promyt roztokem isopropanolu: vody 85 % (obj./obj.) (4 x 50 ml). Nakonec byla sraženina dvakrát promyta isopropanolem.

Chemická struktura byla potvrzena pomocí NMR.

Množství navázaných mastných kyselin ve vzorku se považuje za 5,1 hm. % (GC).

Množství volné mastné kyseliny ve vzorku bylo <0,1 hm. %.

Stupeň substituce stanovený plynovou chromatografií (DS_{GC}) = 10,8 %.

Vzorek je rozpustný ve vodě a ve fyziologickém roztoku.

Příklad 31. Syntéza, purifikace a izolace derivátu obsahujícího kyselinu laurovou chemicky roubovanou (substituovanou) na hyaluronan

Hyaluronát sodný (2,0 g, 5 mmol) charakterizovaný pomocí průměrné molekulové hmotnosti 290 000 g/mol byl rozpuštěn ve 100 ml destilované vody. K tomuto roztoku bylo přidáno 50 ml 1,4-dioxanu. Poté, co byl roztok homogenní, byly za míchání do směsi následně přidány triethylamin (2,091 ml, 15 mmol) a DMAP (0,031 g, 0,250 mmol). Ve druhé reakční baňce bylo 1,00 g kyseliny laurové (5 mmol, 1,2 ekv. na HA dimer) rozpuštěno v 50 ml 1,4-dioxanu a aktivováno 0,697 ml benzoylchloridu (5 mmol, 1,2 ekv. na HA dimer) v přítomnosti 2,091 ml triethylaminu (TEA). Aktivace byla prováděna po dobu 30 minut při 25 ° C, poté byla aktivovaná směs přidána do roztoku obsahujícího HA. Výsledný roztok byl udržován při 25 ° C po dobu 2 hodin. K reakci byl přidán nasycený roztok chloridu sodného k vysrážení polymeru. Poté byl polymer promyt přebytkem bezvodého IPA (2 x 200 ml). Produkt byl čtyřikrát promyt roztokem isopropanolu: vody 85 (obj./obj.) (4 x 200 ml). Nakonec byla sraženina dvakrát promyta isopropanolem (2 x 200 ml).

Chemická struktura byla potvrzena pomocí NMR.

Množství navázaných mastných kyselin ve vzorku se považuje za 2,5 hm. % (GC).

Množství volné mastné kyseliny ve vzorku bylo <0,1 hm. %.

Stupeň substituce stanovený pomocí GC (DS_{GC}) = 11,2 %.

Příklad 32. Syntéza, purifikace a izolace derivátu obsahujícího kyselinu laurovou chemicky roubovanou (substituovanou) na hyaluronan

Hyaluronát sodný (2,0 g, 5 mmol) charakterizovaný pomocí průměrné molekulové hmotnosti 290000 g/mol byl rozpuštěn ve 100 ml destilované vody. K tomuto roztoku bylo přidáno 50 ml THF. Poté, co byl roztok homogenní, byly za míchání do směsi následně přidány triethylamin (2,091 ml, 15 mmol) a DMAP (0,031 g, 0,250 mmol). Ve druhé reakční baňce bylo 1,40 g kyseliny laurové (7 mmol, 1,4 ekv. na HA dimer) rozpuštěno v THF (50 ml) a aktivováno 0,58 ml benzoylchloridu (7 mmol, 1,4 ekv. na HA dimer) v přítomnost 2,091 ml triethylaminu (TEA). Aktivace byla prováděna po dobu 30 minut při 25 ° C, poté byla aktivovaná směs přidána do roztoku obsahujícího HA. Výsledný roztok byl udržován při 25 ° C po dobu 2 hodin. K reakci byl přidán nasycený roztok chloridu sodného k vysrážení polymeru. Poté byl polymer promyt nadbytkem bezvodého IPA (50 ml). Produkt byl čtyřikrát promyt roztokem isopropanolu: vody 85 % (obj./obj.) (4 x 50 ml). Nakonec byla sraženina dvakrát promyta isopropanolem.

Chemická struktura byla potvrzena pomocí NMR.

Množství navázaných mastných kyselin ve vzorku se považuje za 5,9 hm. % (GC).

Množství volné mastné kyseliny ve vzorku bylo 0,006 hm. %.

Stupeň substituce stanovený pomocí GC (DS_{GC}) = 11,4 %.

Příklad 33. Syntéza, purifikace a izolace derivátu obsahujícího kyselinu laurovou chemicky roubovanou (substituovanou) na hyaluronan

Hyaluronát sodný (5,0 g, 12,5 mmol) charakterizovaný pomocí průměrné molekulové hmotnosti 320 000 g / mol byl rozpuštěn ve 250 ml destilované vody. K tomuto roztoku bylo přidáno 125 ml terc-butanolu. Poté, co byl roztok homogenní, byly za míchání do směsi následně přidány triethylamin (5,227 ml, 37,5 mmol) a DMAP (0,076 g, 0,250 mmol). Ve druhé reakční baňce bylo 5,008 g kyseliny laurové (25 mmol, 2,0 ekv. na HA dimer) rozpuštěno v terc-butanolu (125 ml) a aktivováno 3,51 g benzoylchloridu (25 mmol, 2,0 ekv. na HA dimer) v přítomnosti 5,227 ml triethylaminu (TEA). Aktivace byla prováděna po dobu 30 minut při 25 ° C, poté byla aktivovaná směs přidána do roztoku obsahujícího HA. Výsledný roztok byl udržován při 25 ° C po dobu 2 hodin. K reakci byl přidán nasycený roztok chloridu sodného k vysrážení polymeru. Poté byl polymer promyt nadbytkem bezvodého IPA (500 ml). Produkt byl čtyřikrát promyt roztokem isopropanolu: vody 85 % (obj./obj.) (4 x 500 ml). Nakonec byla sraženina dvakrát promyta isopropanolem (2 x 500 ml).

Chemická struktura byla potvrzena pomocí NMR. Molekulová hmotnost vzorku stanovená pomocí SEC-MALLS byla 390 000 g / mol a polydisperzita = 1,61.

Množství navázaných mastných kyselin ve vzorku je 5,5 hm. % (GC).

Množství volné mastné kyseliny ve vzorku bylo <0,1 hm. %

Stupeň substituce stanovený pomocí GC (DS_{GC}) = 11,8 %.

Příklad 34. Syntéza, purifikace a izolace derivátu obsahujícího kyselinu laurovou chemicky roubovanou (substituovanou) na hyaluronan

Hyaluronát sodný (2,0 g, 5 mmol) charakterizovaný pomocí průměrné molekulové hmotnosti 340000 g/mol byl rozpuštěn ve 100 ml destilované vody. K tomuto roztoku bylo přidáno 50 ml 2-propanolu. Poté, co byl roztok homogenní, byly za míchání do směsi následně přidány trimethylamin (2,091 ml, 15 mmol) a DMAP (0,031 g, 0,250 mmol). Ve druhé reakční baňce bylo 1,803 g kyseliny laurové (9 mmol, 1,8 ekv. na HA dimer) rozpuštěno v 2-propanolu (50 ml) a aktivováno 1,27 ml benzoylchloridu (9 mmol, 1,8 ekv. na HA dimer) v přítomnosti 2,091 ml triethylaminu (TEA). Aktivace byla prováděna po dobu 30 minut při 25 ° C, poté byla aktivovaná směs přidána do roztoku obsahujícího HA. Výsledný roztok byl udržován při 25 ° C po dobu 2 hodin. K reakci byl přidán nasycený roztok chloridu sodného k vysrážení polymeru. Poté byl polymer promyt nadbytkem bezvodého IPA (50 ml). Produkt byl čtyřikrát promyt roztokem isopropanolu: vody 85 % (obj./obj.) (4 x 50 ml). Nakonec byla sraženina dvakrát promyta isopropanolem. Produkt byl filtrován a solubilizován ve vodě v konečné koncentraci 0,5 % (hm./obj.).

Chemická struktura byla potvrzena pomocí NMR.

Množství navázaných mastných kyselin ve vzorku se považuje za 6,1 hm. % (GC).

Množství volné mastné kyseliny ve vzorku bylo <0,1 hm. %

Stupeň substituce stanovený pomocí GC (DS_{GC}) = 12,2 %.

Příklad 35. Syntéza, purifikace a izolace derivátu obsahujícího kyselinu laurovou chemicky roubovanou (substituovanou) na hyaluronan

Hyaluronát sodný (2,0 g, 5 mmol) charakterizovaný pomocí průměrné molekulové hmotnosti 260000 g/mol byl rozpuštěn ve 40 ml destilované vody. K tomuto roztoku bylo přidáno 20 ml

tetrahydrofuranu (THF). Poté, co byl roztok homogenní, byly za míchání do směsi následně přidány triethylamin (2,091 ml, 15 mmol) a DMAP (0,031 g, 0,250 mmol). Ve druhé reakční baňce bylo 1,002 g kyseliny laurové (5 mmol, 1 ekv. na HA dimer) rozpuštěno ve 20 ml THF a aktivováno 0,70 ml benzoylchloridu (5 mmol, 1 ekv. na HA dimer) v přítomnosti 2,091 ml triethylaminu (TEA). Aktivace byla prováděna po dobu 30 minut při 25 ° C, poté byla aktivovaná směs přidána do roztoku obsahujícího HA. Výsledný roztok byl udržován při 25 ° C po dobu 2 hodin. K reakci byl přidán nasycený roztok chloridu sodného k vysrážení polymeru. Poté byl polymer promyt nadbytkem bezvodého IPA (50 ml). Produkt byl čtyřikrát promyt roztokem isopropanolu: vody 85 % (obj./obj.) (4 x 50 ml). Nakonec byla sraženina dvakrát promyta isopropanolem.

Chemická struktura byla potvrzena pomocí NMR.

Množství navázaných mastných kyselin ve vzorku se považuje za 6,1 hm. % (GC).

Množství volné mastné kyseliny ve vzorku bylo <0,1 hm. %

Stupeň substituce stanovený plynovou chromatografií (DS_{GC}) = 13,2 %.

Vzorek je nerozpustný ve vodě a ve fyziologickém roztoku.

Příklad 36. Syntéza, purifikace a izolace derivátu obsahujícího kyselinu laurovou chemicky roubovanou (substituovanou) na hyaluronan

Hyaluronát sodný (5,0 g, 12,5 mmol) charakterizovaný pomocí průměrné molekulové hmotnosti 290000 g/mol byl rozpuštěn ve 250 ml destilované vody. K tomuto roztoku bylo přidáno 125 ml 1,4-dioxanu. Poté, co byl roztok homogenní, byly za míchání do směsi následně přidány triethylamin (5,22 ml, 37,5 mmol) a DMAP (0,076 g, 0,6 mmol). Ve druhé reakční baňce bylo 3,5 g kyseliny laurové (25 mmol, 2 ekv. na HA dimer) rozpuštěno ve 125 ml 1,4-dioxanu a aktivováno 2,46 ml benzoylchloridu (17,5 mmol, 1,4 ekv. na HA dimer) v přítomnosti 5,22 ml, 37,5 mmol triethylaminu (TEA). Aktivace byla prováděna po dobu 30 minut při 25 ° C, poté byla aktivovaná směs přidána do roztoku obsahujícího HA. Výsledný roztok byl udržován při 25 ° C po dobu 2 hodin. K reakci byl přidán nasycený roztok chloridu sodného k vysrážení polymeru. Poté byl polymer promyt nadbytkem bezvodého IPA (500 ml). Produkt byl čtyřikrát promyt roztokem isopropanolu: vody 85 % (obj./obj.) (4 x 500 ml). Nakonec byla sraženina dvakrát promyta isopropanolem.

Chemická struktura byla potvrzena pomocí NMR.

Množství navázaných mastných kyselin ve vzorku se považuje za 6,9 hm. % (GC).

Množství volné mastné kyseliny ve vzorku bylo <0,1 hm. %

Stupeň substituce stanovený plynovou chromatografií (DS_{GC}) = 14,0 %.

Příklad 37. Syntéza, purifikace a izolace derivátu obsahujícího kyselinu laurovou chemicky roubovanou (substituovanou) na hyaluronan

Hyaluronát sodný (2,0 g, 5 mmol) charakterizovaný pomocí průměrné molekulové hmotnosti 290000 g/mol byl rozpuštěn ve 100 ml destilované vody. K tomuto roztoku bylo přidáno 50 ml THF. Poté, co byl roztok homogenní, byly za míchání do směsi následně přidány triethylamin (2,091 ml, 15 mmol) a DMAP (0,031 g, 0,250 mmol). Ve druhé reakční baňce bylo 1,50 g kyseliny laurové (7 mmol, 1,5 ekv. HA dimer) rozpuštěno v THF (50 ml) a aktivováno 0,58 ml benzoylchloridu (7 mmol, 1,4 ekv. HA dimer) v přítomnost 2,091 ml triethylaminu (TEA). Aktivace byla prováděna po dobu 30 minut při 25 ° C, poté byla aktivovaná směs přidána do roztoku obsahujícího HA. Výsledný roztok byl udržován při 25 ° C po dobu 2 hodin. K reakci byl

přidán nasycený roztok chloridu sodného k vysrážení polymeru. Poté byl polymer promyt nadbytkem bezvodého IPA (50 ml). Produkt byl čtyřikrát promyt roztokem isopropanolu: vody 85 % (obj./obj.) (4 x 50 ml). Nakonec byla sraženina dvakrát promyta isopropanolem.

Chemická struktura byla potvrzena pomocí NMR.

Množství navázaných mastných kyselin ve vzorku se považuje za 5,9 hm. % (GC).

Množství volné mastné kyseliny ve vzorku bylo 0,006 hm. %

Stupeň substituce stanovený pomocí GC (DS_{GC}) = 14,4 %.

Příklad 38. Syntéza, purifikace a izolace derivátu obsahujícího kyselinu laurovou chemicky roubovanou (substituovanou) na hyaluronan

Hyaluronát sodný (5,0 g, 12,5 mmol) charakterizovaný pomocí průměrné molekulové hmotnosti 340000 g/mol byl rozpuštěn v 313 ml destilované vody. K tomuto roztoku bylo přidáno 156 ml Terc.BuOH. Poté, co byl roztok homogenní, byly za míchání do směsi následně přidány triethylamin (5,227 ml, 37,5 mmol) a DMAP (0,076 g, 0,250 mmol). Ve druhé reakční baňce bylo 5,0 g kyseliny laurové (25 mmol, 2 ekv. na HA dimer) rozpuštěno v TBA (156 ml) a aktivováno 3,51 g benzoylchloridu (25 mmol, 2,0 ekv. na HA dimer) v přítomnost 5,227 ml triethylaminu (TEA). Aktivace byla prováděna po dobu 30 minut při 25 ° C, poté byla aktivovaná směs přidána do roztoku obsahujícího HA. Výsledný roztok byl udržován při 25 ° C po dobu 2 hodin. K reakci byl přidán nasycený roztok chloridu sodného k vysrážení polymeru. Poté byl polymer promyt nadbytkem bezvodého IPA (500 ml). Produkt byl čtyřikrát promyt roztokem isopropanolu: vody 85 % (obj./obj.) (4 x 500 ml). Nakonec byla sraženina dvakrát promyta isopropanolem (2 x 500 ml).

Chemická struktura byla potvrzena pomocí NMR. Molekulová hmotnost vzorku stanovená pomocí SEC-MALLS byla 390 000 g / mol a polydisperzita = 1,61.

Množství navázaných mastných kyselin ve vzorku je 5,5 hm. % (GC).

Množství volné mastné kyseliny ve vzorku bylo <0,1 hm. %

Stupeň substituce stanovený pomocí GC (DS_{GC}) = 14,5 %.

Příklad 39. Syntéza, purifikace a izolace derivátu obsahujícího kyselinu laurovou chemicky roubovanou (substituovanou) na hyaluronan

Hyaluronát sodný (5,0 g, 12,5 mmol) charakterizovaný pomocí průměrné molekulové hmotnosti 340000 g/mol byl rozpuštěn v 313 ml destilované vody. K tomuto roztoku bylo přidáno 156 ml terc.butanolu. Poté, co byl roztok homogenní, byly za míchání do směsi následně přidány triethylamin (5,227 ml, 37,5 mmol) a DMAP (0,076 g, 0,6 mmol). Ve druhé reakční baňce bylo 5,0 g kyseliny laurové (25 mmol, 2 ekv. na HA dimer) rozpuštěno ve 156 ml terc-butanolu a aktivováno 3,51 ml benzoylchloridu (25 mmol, 2 ekv. na HA dimer) v přítomnost 5,22 ml, 37,5 mmol triethylaminu (TEA). Aktivace byla prováděna po dobu 30 minut při 5 ° C, poté byla aktivovaná směs přidána do roztoku obsahujícího HA. Výsledný roztok byl udržován při 5 ° C po dobu 2 hodin. K reakci byl přidán nasycený roztok chloridu sodného k vysrážení polymeru. Poté byl polymer promyt nadbytkem bezvodého IPA (50 ml). Produkt byl čtyřikrát promyt roztokem isopropanolu: vody 85 % (obj./obj.) (4 x 50 ml). Nakonec byla sraženina dvakrát promyta isopropanolem.

Chemická struktura byla potvrzena pomocí NMR.

Množství navázaných mastných kyselin ve vzorku se považuje za 6,7 hm. % (GC).

Množství volné mastné kyseliny ve vzorku bylo <0,1 hm. %

Stupeň substituce stanovený plynovou chromatografií (DS_{GC}) = 15,5 %.

Příklad 40. Syntéza, purifikace a izolace derivátu obsahujícího kyselinu laurovou chemicky roubovanou (substituovanou) na hyaluronan

Hyaluronát sodný (5,0 g, 12,5 mmol) charakterizovaný pomocí průměrné molekulové hmotnosti 340000 g/mol byl rozpuštěn ve 250 ml destilované vody. K tomuto roztoku bylo přidáno 125 ml THF. Poté, co byl roztok homogenní, byly za míchání do směsi následně přidány triethylamin (5,227 ml, 37,5 mmol) a DMAP (0,076 g, 0,250 mmol). Ve druhé reakční baňce bylo 5,008 g kyseliny laurové (25 mmol, 2,0 ekv. na HA dimer) rozpuštěno v THF (125 ml) a aktivováno 3,51 g benzoylchloridu (25 mmol, 2,0 ekv. na HA dimer) v přítomnost 5,227 ml triethylaminu (TEA). Aktivace byla prováděna po dobu 30 minut při 25 ° C, poté byla aktivovaná směs přidána do roztoku obsahujícího HA. Výsledný roztok byl udržován při 25 ° C po dobu 2 hodin. K reakci byl přidán nasycený roztok chloridu sodného k vysrážení polymeru. Poté byl polymer promyt nadbytkem bezvodého IPA (500 ml). Produkt byl čtyřikrát promyt roztokem isopropanolu: vody 85 % (obj./obj.) (4 x 500 ml). Nakonec byla sraženina dvakrát promyta isopropanolem (2 x 500 ml).

Chemická struktura byla potvrzena pomocí NMR. Molekulová hmotnost vzorku stanovená pomocí SEC-MALLS byla 390 000 g / mol a polydisperzita = 1,61.

Množství volné mastné kyseliny ve vzorku bylo <0,1 hm. %

Stupeň substituce stanovený pomocí GC (DS_{GC}) = 18,0 %.

Příklad 41. Syntéza, purifikace a izolace derivátu obsahujícího kyselinu laurovou chemicky roubovanou (substituovanou) na hyaluronan

Hyaluronát sodný (5,0 g, 12,5 mmol) charakterizovaný pomocí průměrné molekulové hmotnosti 320000 g/mol byl rozpuštěn ve 250 ml destilované vody. K tomuto roztoku bylo přidáno 125 ml 1,4-dioxanu. Poté, co byl roztok homogenní, byly za míchání do směsi následně přidány triethylamin (5,227 ml, 37,5 mmol) a DMAP (0,076 g, 0,250 mmol). Ve druhé reakční baňce bylo 5,008 g kyseliny laurové (25 mmol, 2,0 ekv. na HA dimer) rozpuštěno v 1,4 dioxanu (125 ml) a aktivováno 3,51 g benzoylchloridu (25 mmol, 2,0 ekv. na HA dimer) v přítomnosti 5,227 ml triethylaminu (TEA). Aktivace byla prováděna po dobu 30 minut při 25 ° C, poté byla aktivovaná směs přidána do roztoku obsahujícího HA. Výsledný roztok byl udržován při 25 ° C po dobu 2 hodin. K reakci byl přidán nasycený roztok chloridu sodného k vysrážení polymeru. Poté byl polymer promyt nadbytkem bezvodého IPA (500 ml). Produkt byl čtyřikrát promyt roztokem isopropanolu: vody 85 % (obj./obj.) (4 x 500 ml). Nakonec byla sraženina dvakrát promyta isopropanolem (2 x 500 ml).

Chemická struktura byla potvrzena pomocí NMR. Molekulová hmotnost vzorku stanovená pomocí SEC-MALLS byla 390 000 g / mol a polydisperzita = 1,61. Množství volné mastné kyseliny ve vzorku bylo <0,1 hm. %. Množství navázaných mastných kyselin ve vzorku je 5,5 hm. % (GC).

Stupeň substituce stanovený pomocí GC (DS_{GC}) = 18,7 %.

Příklad 42. Syntéza, purifikace a izolace derivátu obsahujícího kyselinu laurovou chemicky roubovanou (substituovanou) na hyaluronan

Hyaluronát sodný (2,0 g, 5 mmol) charakterizovaný pomocí průměrné molekulové hmotnosti 270000 g/mol byl rozpuštěn ve 100 ml destilované vody. K tomuto roztoku bylo přidáno 50 ml

tetrahydrofuranu (THF). Poté, co byl roztok homogenní, byly za míchání do směsi následně přidány triethylamin (2,091 ml, 15 mmol) a DMAP (0,031 g, 0,250 mmol). Ve druhé reakční baňce bylo 1,002 g kyseliny laurové (5 mmol, 1 ekv. na HA dimer) rozpuštěno v THF (50 ml) a aktivováno 0,58 ml benzoylchloridu (5 mmol, 1 ekv. na HA dimer) v přítomnost 2,091 ml triethylaminu (TEA). Aktivace byla prováděna po dobu 30 minut při 10 ° C, po této době byla aktivovaná směs přidána do roztoku obsahujícího HA. Výsledný roztok byl udržován při 10 ° C po dobu 2 hodin. K reakci byl přidán nasycený roztok chloridu sodného k vysrážení polymeru. Poté byl polymer promyt přebytkem bezvodého IPA (200 ml). Produkt byl čtyřikrát promyt roztokem isopropanolu: vody 85 % (obj./obj.) (4 x 200 ml). Nakonec byla sraženina dvakrát promyta isopropanolem (2 x 200 ml).

Chemická struktura byla potvrzena pomocí NMR.

Množství navázaných mastných kyselin ve vzorku se považuje za 8,3 hm. % (GC).

Množství volné mastné kyseliny ve vzorku bylo <0,1 hm. %

Stupeň substituce stanovený pomocí GC (DS_{GC}) = 18,2 %.

Vzorek je nerozpustný ve fyziologickém roztoku.

Příklad 43. Syntéza, purifikace a izolace derivátu obsahujícího kyselinu laurovou chemicky roubovanou (substituovanou) na hyaluronan

Hyaluronát sodný (5,0 g, 12,5 mmol) charakterizovaný pomocí průměrné molekulové hmotnosti 320000 g/mol byl rozpuštěn ve 100 ml destilované vody. K tomuto roztoku bylo přidáno 50 ml terc.butanolu. Poté, co byl roztok homogenní, byly za míchání do směsi následně přidány triethylamin (5,227 ml, 15 mmol) a DMAP (0,076 g, 0,250 mmol). Ve druhé reakční baňce bylo 5,00 g kyseliny laurové (25 mmol, 2 ekv. na HA dimer) rozpuštěno 50 ml terc.butanolu a aktivováno 3,51 ml benzoylchloridu (25 mmol, 2 ekv. na HA dimer) v přítomnost 5,227 ml triethylaminu (TEA). Aktivace byla prováděna po dobu 30 minut při 5 ° C, poté byla aktivovaná směs přidána do roztoku obsahujícího HA. Výsledný roztok byl udržován při 25 ° C po dobu 2 hodin. K reakci byl přidán nasycený roztok chloridu sodného k vysrážení polymeru. Poté byl polymer promyt nadbytkem bezvodého IPA (50 ml). Produkt byl čtyřikrát promyt roztokem isopropanolu: vody 85 % (obj./obj.) (4 x 50 ml). Nakonec byla sraženina dvakrát promyta isopropanolem.

Chemická struktura byla potvrzena pomocí NMR.

Množství navázaných mastných kyselin ve vzorku je 8,8 hm. % (GC).

Množství volné mastné kyseliny ve vzorku bylo 0,006 hm. %

Stupeň substituce stanovený pomocí GC (DSGC) = 19,3 %.

Příklad 44. Syntéza, purifikace a izolace derivátu obsahujícího kyselinu laurovou chemicky roubovanou (substituovanou) na hyaluronan

Hyaluronát sodný (5,0 g, 12,5 mmol) charakterizovaný pomocí průměrné molekulové hmotnosti 320000 g/mol byl rozpuštěn ve 100 ml destilované vody. K tomuto roztoku bylo přidáno 50 ml 1,4-dioxanu. Poté, co byl roztok homogenní, byly za míchání do směsi následně přidány triethylamin (5,227 ml, 15 mmol) a DMAP (0,076 g, 0,250 mmol). Ve druhé reakční baňce bylo 5,00 g kyseliny laurové (25 mmol, 2 ekv. na HA dimer) rozpuštěno 50 ml 1,4-dioxanu a aktivováno 3,51 ml benzoylchloridu (25 mmol, 2 ekv. na HA dimer) v přítomnosti 5,227 ml triethylaminu (TEA). Aktivace byla prováděna po dobu 30 minut při 5 ° C, poté byla aktivovaná směs přidána

do roztoku obsahujícího HA. Výsledný roztok byl udržován při 25 ° C po dobu 2 hodin. K reakci byl přidán nasycený roztok chloridu sodného k vysrážení polymeru. Poté byl polymer promyt nadbytkem bezvodého IPA (50 ml). Produkt byl čtyřikrát promyt roztokem isopropanolu: vody 85 % (obj./obj.) (4 x 50 ml). Nakonec byla sraženina dvakrát promyta isopropanolem.

Chemická struktura byla potvrzena pomocí NMR.

Množství navázaných mastných kyselin ve vzorku se považuje za 8,8 hm. % (GC).

Množství volné mastné kyseliny ve vzorku bylo 0,006 hm. %

Stupeň substituce stanovený pomocí GC (DS_{GC}) = 37,2 %.

Příklad 45. Syntéza, purifikace a izolace derivátu obsahujícího kyselinu laurovou chemicky roubovanou (substituovanou) na hyaluronan

Hyaluronát sodný (2,0 g, 5 mmol) charakterizovaný pomocí průměrné molekulové hmotnosti 442000 g/mol byl rozpuštěn ve 100 ml destilované vody. K tomuto roztoku bylo přidáno 100 ml THF. Poté, co byl roztok homogenní, byly za míchání do směsi následně přidány triethylamin (2,091 ml, 15 mmol) a DMAP (0,031 g, 0,250 mmol). Ve druhé reakční baňce bylo 1,00 g kyseliny laurové (5 mmol, 1 ekv. na HA dimer) rozpuštěno ve 100 ml THF a aktivováno 0,58 ml benzoylchloridu (5 mmol, 1 ekv. na HA dimer) v přítomnosti 2,091 ml triethylaminu (TEA). Aktivace byla prováděna po dobu 30 minut při 25 ° C, poté byla aktivovaná směs přidána do roztoku obsahujícího HA. Výsledný roztok byl udržován při 25 ° C po dobu 2 hodin. K reakci byl přidán nasycený roztok chloridu sodného k vysrážení polymeru. Poté byl polymer promyt nadbytkem bezvodého IPA (50 ml). Produkt byl čtyřikrát promyt roztokem isopropanolu: vody 85 % (obj./obj.) (4 x 50 ml). Nakonec byla sraženina dvakrát promyta isopropanolem.

Chemická struktura byla potvrzena pomocí NMR.

Množství navázaných mastných kyselin ve vzorku se považuje za 4,5 hm. % (GC).

Množství volné mastné kyseliny ve vzorku bylo 0,006 hm. %

Stupeň substituce stanovený pomocí GC (DS_{GC}) = 9,5 %.

Příklad 46. Syntéza, purifikace a izolace derivátu obsahujícího kyselinu laurovou chemicky roubovanou (substituovanou) na hyaluronan

Hyaluronát sodný (2,0 g, 5 mmol) charakterizovaný pomocí průměrné molekulové hmotnosti 772000 g/mol byl rozpuštěn ve 100 ml destilované vody. K tomuto roztoku bylo přidáno 50 ml THF. Poté, co byl roztok homogenní, byly za míchání do směsi následně přidány triethylamin (2,091 ml, 15 mmol) a DMAP (0,031 g, 0,250 mmol). Ve druhé reakční baňce bylo 1,006 g kyseliny laurové (5 mmol, 1 ekv. na HA dimer) rozpuštěno v THF (50 ml) a aktivováno 0,581 ml benzoylchloridu (5 mmol, 1 ekv. na HA dimer) v přítomnost 2,091 ml triethylaminu (TEA). Aktivace byla prováděna po dobu 30 minut při 5 ° C, poté byla aktivovaná směs přidána do roztoku obsahujícího HA. Výsledný roztok byl udržován při 25 ° C po dobu 2 hodin. K reakci byl přidán nasycený roztok chloridu sodného k vysrážení polymeru. Poté byl polymer promyt nadbytkem bezvodého IPA (50 ml). Produkt byl čtyřikrát promyt roztokem isopropanolu: vody 85 % (obj./obj.) (4 x 50 ml). Nakonec byla sraženina dvakrát promyta isopropanolem.

Množství navázaných mastných kyselin ve vzorku se považuje za 4,1 hm. % (GC).

Množství volné mastné kyseliny ve vzorku bylo <0,1 hm. %.

Stupeň substituce stanovený pomocí GC (DS_{GC}) = 9,2 %.

Příklad 47. Syntéza, purifikace a izolace derivátu obsahujícího kyselinu laurovou chemicky roubovanou (substituovanou)? na hyaluronan

Hyaluronát sodný (2,0 g, 5 mmol) charakterizovaný pomocí průměrné molekulové hmotnosti 1161000 g / mol byl rozpuštěn ve 100 ml destilované vody. K tomuto roztoku bylo přidáno 50 ml THF. Poté, co byl roztok homogenní, byly za míchání do směsi následně přidány triethylamin (2,091 ml, 15 mmol) a DMAP (0,031g, 0,250 mmol). Ve druhé reakční baňce bylo 1,00 g kyseliny laurové (5 mmol, 1 ekv. na HA dimer) rozpuštěno v THF (50 ml) a aktivováno 0,58 ml benzoylchloridu (5 mmol, 1 ekv. na HA dimer) v přítomnost 2,091 ml triethylaminu (TEA). Aktivace byla prováděna po dobu 30 minut při 25 ° C, poté byla aktivovaná směs přidána do roztoku obsahujícího HA. Výsledný roztok byl udržován při 25 ° C po dobu 2 hodin. K reakci byl přidán nasycený roztok chloridu sodného k vysrážení polymeru. Poté byl polymer promyt nadbytkem bezvodého IPA (50 ml). Produkt byl čtyřikrát promyt roztokem isopropanolu: vody 85 % (obj./obj.) (4 x 50 ml). Nakonec byla sraženina dvakrát promyta isopropanolem.

Chemická struktura byla potvrzena pomocí NMR.

Množství navázaných mastných kyselin ve vzorku se považuje za 2,5 hm. % (GC).

Množství volné mastné kyseliny ve vzorku bylo <0,1 hm. %

Stupeň substituce stanovený pomocí GC (DS_{GC}) = 5,0 %.

Příklad 48. Syntéza, purifikace a izolace derivátu obsahujícího undecylenovou kyselinu chemicky roubovanou (substituovanou) na hyaluronan

Hyaluronát sodný (2,0 g, 5 mmol) charakterizovaný pomocí průměrné molekulové hmotnosti 270000 g/mol byl rozpuštěn ve 100 ml destilované vody. K tomuto roztoku bylo přidáno 50 ml THF. Poté, co byl roztok homogenní, byly za míchání do směsi následně přidány triethylamin (2,091 ml, 15 mmol) a DMAP (0,031 g, 0,250 mmol). Ve druhé reakční baňce bylo 0,9 g kyseliny undecylenové (5 mmol, 1 ekv. na HA dimer) rozpuštěno v THF (50 ml) a aktivováno 0,58 ml benzoylchloridu (5 mmol, 1 ekv. na HA dimer) v přítomnost 2,091 ml triethylaminu (TEA). Aktivace byla prováděna po dobu 30 minut při 25 ° C, poté byla aktivovaná směs přidána do roztoku obsahujícího HA. Výsledný roztok byl udržován při 25 ° C po dobu 2 hodin. K reakci byl přidán nasycený roztok chloridu sodného k vysrážení polymeru. Poté byl polymer promyt nadbytkem bezvodého IPA (50 ml). Produkt byl čtyřikrát promyt roztokem isopropanolu: vody 85 % (obj./obj.) (4 x 50 ml). Nakonec byla sraženina dvakrát promyta isopropanolem. Produkt byl filtrován a solubilizován ve vodě v konečné koncentraci 0,5 % (hm./obj.). Chemická struktura byla potvrzena pomocí NMR.

Množství navázaných mastných kyselin ve vzorku se považuje za 20 hm. % (GC).

Množství volné mastné kyseliny ve vzorku bylo <0,1 hm. %

Stupeň substituce stanovený pomocí NMR (DS) = 25,6 %.

Molekulová hmotnost vzorku stanovená pomocí SEC-MALLS byla 258000 g/mol a polydisperzita = 1,48.

Příklad 49. Syntéza, purifikace a izolace derivátu obsahujícího undecylenovou kyselinu chemicky roubovanou (substituovanou) na hyaluronan

Hyaluronát sodný (2,0 g, 5 mmol) charakterizovaný pomocí průměrné molekulové hmotnosti 270000 g/mol byl rozpuštěn ve 100 ml destilované vody. K tomuto roztoku bylo přidáno 50 ml 1,4-dioxanu. Poté, co byl roztok homogenní, byly za míchání do směsi následně přidány triethylamin (2,091 ml, 15 mmol) a DMAP (0,031 g, 0,250 mmol). Ve druhé reakční baňce bylo 0,9 g kyseliny undecylenové (5 mmol, 1 ekv. na HA dimer) rozpuštěno v 1,4-dioxanu (50 ml) a aktivováno 0,58 ml benzoylchloridu (5 mmol, 1 ekv. na HA dimer) v přítomnosti 2,091 ml triethylaminu (TEA). Aktivace byla prováděna po dobu 30 minut při 25 ° C, poté byla aktivovaná směs přidána do roztoku obsahujícího HA. Výsledný roztok byl udržován při 25 ° C po dobu 2 hodin. K reakci byl přidán nasycený roztok chloridu sodného k vysrážení polymeru. Poté byl polymer promyt nadbytkem bezvodého IPA (50 ml). Produkt byl čtyřikrát promyt roztokem isopropanolu: vody 85 % (obj./obj.) (4 x 50 ml). Nakonec byla sraženina dvakrát promyta isopropanolem. Produkt byl filtrován a solubilizován ve vodě v konečné koncentraci 0,5 % (hm./obj.). Chemická struktura byla potvrzena pomocí NMR.

Množství navázaných mastných kyselin ve vzorku se považuje za 15 hm. % (GC).

Množství volné mastné kyseliny ve vzorku bylo <0,1 hm. %

Molekulová hmotnost vzorku stanovená pomocí SEC-MALLS byla 258 000 g / mol a polydisperzita = 1,48.

Stupeň substituce stanovený pomocí NMR (DS_{NMR}) = 18,2 %.

Příklad 50. Syntéza, purifikace a izolace derivátu obsahujícího kyselinu olejovou chemicky roubovanou (substituovanou) na hyaluronan

Hyaluronát sodný (2,0 g, 5 mmol) charakterizovaný pomocí průměrné molekulové hmotnosti 17000 g/mol byl rozpuštěn ve 100 ml destilované vody. K tomuto roztoku bylo přidáno 50 ml 1,4-dioxanu. Poté, co byl roztok homogenní, byly za míchání do směsi následně přidány triethylamin (2,091 ml, 15 mmol) a DMAP (0,031 g, 0,250 mmol). Ve druhé reakční baňce bylo 1,40 g kyseliny olejové (7 mmol, 1,4 ekv. na HA dimer) rozpuštěno v 1,4-dioxanu (50 ml) a aktivováno 0,58 ml benzoylchloridu (7 mmol, 1,4 ekv. na HA dimer) v přítomnosti 2,091 ml triethylaminu (TEA).

Jak je známo odborníkům v oboru, aktivace mastné kyseliny může být prováděna substituovanými benzoylchloridy, jak je popsáno v **tabulce 7.**

Aktivace byla prováděna po dobu 30 minut při 25 ° C, poté byla aktivovaná směs přidána do roztoku obsahujícího HA. Výsledný roztok byl udržován při 25 ° C po dobu 2 hodin. K reakci byl přidán nasycený roztok chloridu sodného k vysrážení polymeru. Poté byl polymer promyt nadbytkem bezvodého IPA (50 ml). Produkt byl čtyřikrát promyt roztokem isopropanolu: vody 85 % (obj./obj.) (4 x 50 ml). Nakonec byla sraženina dvakrát promyta isopropanolem. Chemická struktura byla potvrzena pomocí NMR.

Množství navázaných mastných kyselin ve vzorku se považuje za 10,2 hm. % (GC). Množství volné mastné kyseliny ve vzorku bylo 0,006 hm. %. Molekulová hmotnost vzorku stanovená pomocí SEC-MALLS byla 250000 g/mol a polydisperzita = 1,7

Stupeň substituce stanovený pomocí GC (DS_{GC}) = 14,2 %.

Tabulka 7. Aktivační reakce po 15 minutách aktivace (Produkty a byla vypočtena pomocí integrace signálů kyseliny olejové).

chlorid	Směsný anhydrid	Aromatický anhydrid	kyselý-anhydrid
benzoylchlorid	58 %	14 %	28 %
4-nitrobenzoylchlorid	86 %	4 %	10 %
4-methoxybenzoyl chlorid	63 %	18 %	24 %
4-chlorobenzoyl chlorid	64 %	21 %	15 %
2,4,6-trichlorobenzoyl chlorid	73 %	7 %	20 %

Příklad 51. Syntéza, purifikace a izolace derivátu obsahujícího kyselinu olejovou chemicky roubovanou (substituovanou) na hyaluronan

Hyaluronát sodný (2,0 g, 5 mmol) charakterizovaný pomocí průměrné molekulové hmotnosti 17000 g/mol byl rozpuštěn ve 100 ml destilované vody. K tomuto roztoku bylo přidáno 50 ml terc.butanolu. Poté, co byl roztok homogenní, byly za míchání do směsi následně přidány triethylamin (2,091 ml, 15 mmol) a DMAP (0,031 g, 0,250 mmol). Ve druhé reakční baňce bylo 1,40 g kyseliny olejové (7 mmol, 1,4 ekv. na HA dimer) rozpuštěno v 1,4-dioxanu (50 ml) a aktivováno 0,58 ml benzoylchloridu (7 mmol, 1,4 ekv. na HA dimer) v přítomnosti 2,091 ml triethylaminu (TEA). Aktivace byla prováděna po dobu 30 minut při 25 ° C, poté byla aktivovaná směs přidána do roztoku obsahujícího HA. Výsledný roztok byl udržován při 25 ° C po dobu 2 hodin. K reakci byl přidán nasycený roztok chloridu sodného k vysrážení polymeru. Poté byl polymer promyt nadbytkem bezvodého IPA (50 ml). Produkt byl čtyřikrát promyt roztokem isopropanolu: vody 85 % (obj./obj.) (4 x 50 ml). Nakonec byla sraženina dvakrát promyta isopropanolem. Chemická struktura byla potvrzena pomocí NMR.

Množství navázaných mastných kyselin ve vzorku se považuje za 10,2 hm. % (GC). Množství volné mastné kyseliny ve vzorku bylo 0,006 hm. %. Molekulová hmotnost vzorku stanovená pomocí SEC-MALLS byla 250000 g/mol a polydisperzita = 1,7

Stupeň substituce stanovený pomocí GC (DS_{GC}) = 17,2 %.

Příklad 52. Syntéza, purifikace a izolace derivátu obsahujícího kyselinu olejovou chemicky roubovanou (substituovanou) na hyaluronan.

Hyaluronát sodný (2,0 g, 5 mmol) charakterizovaný pomocí průměrné molekulové hmotnosti 270000 g/mol byl rozpuštěn ve 100 ml destilované vody. K tomuto roztoku bylo přidáno 50 ml 1,4-dioxanu. Poté, co byl roztok homogenní, byly za míchání do směsi následně přidány triethylamin (2,091 ml, 15 mmol) a DMAP (0,031 g, 0,250 mmol). Ve druhé reakční baňce bylo 1,40 g kyseliny olejové (7 mmol, 1,4 ekv. na HA dimer) rozpuštěno v 1,4-dioxanu (50 ml) a aktivováno 0,58 ml benzoylchloridu (7 mmol, 1,4 ekv. na HA dimer) v přítomnosti 2,091 ml triethylaminu (TEA). Aktivace byla prováděna po dobu 30 minut při 25 ° C, poté byla aktivovaná směs přidána do roztoku obsahujícího HA. Výsledný roztok byl udržován při 25 ° C po dobu 2 hodin. K reakci byl přidán nasycený roztok chloridu sodného k vysrážení polymeru. Poté byl polymer promyt nadbytkem bezvodého IPA (50 ml). Produkt byl čtyřikrát promyt roztokem isopropanolu: vody 85 % (obj./obj.) (4 x 50 ml). Nakonec byla sraženina dvakrát promyta isopropanolem. Chemická struktura byla potvrzena pomocí NMR.

Množství navázaných mastných kyselin ve vzorku se považuje za 10,2 hm. % (GC). Množství volné mastné kyseliny ve vzorku bylo 0,006 hm. %

Stupeň substituce stanovený pomocí GC (DS_{GC}) = 4,2 %.

Molekulová hmotnost vzorku stanovená pomocí SEC-MALLS byla 250000 g/mol a polydisperzita = 1,7

Příklad 53. Syntéza, purifikace a izolace derivátu obsahujícího kyselinu olejovou chemicky roubovanou (substituovanou) na hyaluronan

Hyaluronát sodný (2,0 g, 5 mmol) charakterizovaný pomocí průměrné molekulové hmotnosti 270000 g/mol byl rozpuštěn ve 100 ml destilované vody. K tomuto roztoku bylo přidáno 50 ml terc.butanolu. Poté, co byl roztok homogenní, byly za míchání do směsi následně přidány triethylamin (2,091 ml, 15 mmol) a DMAP (0,031 g, 0,250 mmol). Ve druhé reakční baňce bylo 1,40 g kyseliny olejové (7 mmol, 1,4 ekv. na HA dimer) rozpuštěno v 1,4-dioxanu (50 ml) a aktivováno 0,58 ml benzoylchloridu (7 mmol, 1,4 ekv. na HA dimer) v přítomnosti 2,091 ml triethylaminu (TEA). Aktivace byla prováděna po dobu 30 minut při 25 ° C, poté byla aktivovaná směs přidána do roztoku obsahujícího HA. Výsledný roztok byl udržován při 25 ° C po dobu 2 hodin. K reakci byl přidán nasycený roztok chloridu sodného k vysrážení polymeru. Poté byl polymer promyt nadbytkem bezvodého IPA (50 ml). Produkt byl čtyřikrát promyt roztokem isopropanolu: vody 85 % (obj./obj.) (4 x 50 ml). Nakonec byla sraženina dvakrát promyta isopropanolem. Chemická struktura byla potvrzena pomocí NMR.

Množství navázaných mastných kyselin ve vzorku se považuje za 5,2 hm. % (GC). Množství volné mastné kyseliny ve vzorku bylo 0,006 hm. %. Molekulová hmotnost vzorku stanovená pomocí SEC-MALLS byla 250 000 g / mol a polydisperzita = 1,7

Stupeň substituce stanovený pomocí GC (DS_{GC}) = 6,2 %.

Příklad 54. Syntéza, purifikace a izolace derivátu obsahujícího behenovou kyselinu roubovanou (substituovanou) na hyaluronan

Hyaluronát sodný (0,5 g, 1,3 mmol) charakterizovaný pomocí průměrné molekulové hmotnosti 1300000 g/mol byl rozpuštěn ve 25 ml destilované vody. K tomuto roztoku bylo přidáno 12,5 ml THF. Poté, co byl roztok homogenní, byly za míchání do směsi následně přidány triethylamin (0,436 ml, 3,1 mmol) a DMAP (0,008 g, 0,1 mmol). Ve druhé reakční baňce bylo 0,085 g behenové kyseliny (0,3 mmol, 0,2 ekv. na HA dimer) rozpuštěno v THF (12,5 ml) a aktivováno 0,029 ml benzoylchloridu (0,3 mmol, 0,2 ekv. na HA dimer) v přítomnost 0,436 ml, ml triethylaminu (TEA). Aktivace byla prováděna po dobu 30 minut při 25 ° C, poté byla aktivovaná směs přidána do roztoku obsahujícího HA. Výsledný roztok byl udržován při 25 ° C po dobu 2 hodin. K reakci byl přidán nasycený roztok chloridu sodného k vysrážení polymeru. Poté byl polymer promyt nadbytkem bezvodého IPA (50 ml). Produkt byl čtyřikrát promyt roztokem isopropanolu: vody 85 % (obj./obj.) (4 x 50 ml). Nakonec byla sraženina dvakrát promyta isopropanolem. Chemická struktura byla potvrzena pomocí NMR.

Stupeň substituce stanovený pomocí GC (DS_{GC}) = 1,2 %.

Příklad 55. Syntéza, purifikace a izolace derivátu obsahujícího cholesterol sukcinát roubovaný (substituovanou) na hyaluronan

Hyaluronát sodný (0,5 g, 1,3 mmol) charakterizovaný pomocí průměrné molekulové hmotnosti 230000 g/mol byl rozpuštěn ve 25 ml destilované vody. K tomuto roztoku bylo přidáno 12,5 ml THF. Poté, co byl roztok homogenní, byly za míchání do směsi následně přidány trimethylamin (0,436 ml, 3,1 mmol) a DMAP (0,008 g, 0,1 mmol). Ve druhé reakční baňce bylo 0,122 g

hydrogensukcinátu cholesterolu (0,3 mmol, 0,2 ekv. na HA dimer) rozpuštěno v THF (12,5 ml) a aktivováno 0,029 ml benzoylchloridu (0,3 mmol, 0,2 ekv. na HA dimer) v přítomnost 0,436 ml, ml triethylaminu (TEA). Aktivace byla prováděna po dobu 30 minut při 25 ° C, poté byla aktivovaná směs přidána do roztoku obsahujícího HA. Výsledný roztok byl udržován při 25 ° C po dobu 2 hodin. K reakci byl přidán nasycený roztok chloridu sodného k vysrážení polymeru. Poté byl polymer promyt nadbytkem bezvodého IPA (50 ml). Produkt byl čtyřikrát promyt roztokem isopropanolu: vody 85 % (obj./obj.) (4 x 50 ml). Nakonec byla sraženina dvakrát promyta isopropanolem. Chemická struktura byla potvrzena pomocí NMR.

Stupeň substituce stanovený pomocí GC (DS_{GC}) = 0,86 %.

Příklad 56. Stanovení $HA4^{AN}$-$HA20^{AN}$ po enzymatické degradaci

Kvantifikace nativních HA oligosacharidů $HA4^{AN}$-$HA20^{AN}$ byla provedena po částečném štěpení pomocí BTH. Nejprve byl analyzovaný HA-C12 rozpuštěn ve směsi 0,01 M acetátového pufru a isopropanolu (1: 1, obj./obj.) v koncentraci 2 mg ml^{-1}. Potom byl alikvot (75 ul) zředěn pomocí 2925 µl 0,01 M acetátového pufru obsahujícího 0,03M NaCl a 1 $mg.ml^{-1}$ hovězí sérový albumin (BSA). Poté byl přidán roztok BTH (12,8 ul, 350 IU ml^{-1}) a směs byla inkubována při 37 °C. Vzorky (100 ul) byly odebírány a okamžitě zmraženy (-20 °C) při 0, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 270 a 330 minutách po přidání enzymu. Před analýzou byl do každé zkumavky přidán roztok vnitřního standardu ($HA4^{ANRED}$, $HA6^{ANRED}$ každý, 50 µg / ml, 10 ul). Vzorky byly vařeny (20 minut), aby se reakce zastavila a vysrážel se BSA. Nakonec byly vzorky centrifugovány při 15 000 g po dobu 3 minut a supernatant byl použit pro analýzu LC-MS / MS. Systém byl kalibrován pomocí standardů hyaluronanových oligosacharidů (Contipro a.s., Dolní Dobrouč, Česká republika). 10-bodová kalibrační křivka v koncentračním rozmezí 0,1 až 10 µg ml^{-1} každého oligosacharidu rozpuštěného ve stejném rozpouštědle (0,01 M acetátový pufr obsahující 0,03 M NaCl a 1 mg ml^{-1} BSA) jako derivát a ošetřeného stejným postupem přípravy (zmrazení, přidání vnitřního standardu, vaření a centrifugace) byla použita pro kvantifikaci fragmentů hyaluronanu v hydrolyzátu.

Pro analýzu byl použit chromatografický systém třídy Acquity UPLC I připojený k hmotnostnímu spektrometru Xevo TQ-XS triple quadrupole (Waters, Manchester, UK). Separace byla prováděna na koloně Jupiter Proteo 4 um 90 Å (50 x 2,0 mm, Phenomenex) při 60 ° C. Kolona byla eluována vodou obsahující 0,1 % kyselinu mravenčí po dobu 3 minut, poté následoval lineární gradient acetonitrilu (0 až 30%) po dobu 7 minut. Průtok byl nastaven na 0,3 ml min^{-1} pro počáteční 2 minutové období a po 0,5 minutě byl zvýšen na 0,6 ml min^{-1}. Po každém běhu byla kolona promyta 40 % acetonitrilem při 1 ml min^{-1} po dobu 5 minut a ekvilibrována 0,1 % kyselinou mravenčí ve vodě po dobu 4 minut. Injektovaný objem byl 5 µl.

Hmotnostní spektrometr byl vybaven zdrojem ionizace elektrosprejem pracujícím v negativním režimu. Instrumentální parametry pro kvantifikaci oligosacharidů byly stanoveny následovně: stříkací kapilární napětí 1,8 kV, teplota desolvace 600 °C, kónický průtok plynu (N_2) 150 $l.h^{-1}$, proud desolvačního plynu (N_2) 1 000 l h^{-1}, průtok rozprašovacího plynu (N_2) 7,0 bar. Měření byla prováděna v režimu monitorování více reakcí (MRM) s přechody uvedenými v **tabulce 8.**

Tabulka 8. Přechody MRM s optimalizovanými hodnotami napětí kužele vzorku a kolize energií (první uvedený fragmentový iont je kvantifikátor iontů, druhý iont je kvalifikátor iontů).

HA oligosacharid	*m/z*	Náboj	Fragmenty	Kužel vzorku, V	Kolize energie, eV
$HA4^{AN}$	775,2	1-	193,0	72	38
			572,2	72	28
$HA6^{AN}$	576,8	2-	193,0	42	30
			475,2	42	16

$HA8^{AN}$	766,4	2-	193,1	54	40
			664,7	54	18
$HA10^{AN}$	956,0	2-	193,1	18	14
			854,4	18	26
$HA12^{AN}$	764,5	3-	113,0	38	44
			695,7	38	20
$HA14^{AN}$	1335,2	2-	193,0	64	64
			1233,6	64	34
$HA16^{AN}$	1016,3	3-	113,0	38	64
			948,5	38	28
$HA18^{AN}$	1142,7	3-	113,0	66	64
			1075,0	66	30
$HA20^{AN}$	1269,2	3-	113,0	88	74
			1201,4	88	32
$HA4^{AN\ RED.}$	778,3	1-	193,0	44	34
			399,1	30	30
$HA6^{AN\ RED.}$	578,3	2-	113,0	50	34
			193,0	50	26

S tímto nastavením experimentu se v každém časovém bodě stanoví koncentrace v μg ml^{-1} každého hyaluronanového oligosacharidu ($HA4^{AN}$-$HA20^{AN}$) a přepočítá se na hm.% derivátu přítomného v roztoku (50 μg/ml). Typický časový průběh experimentu je znázorněn na **obrázku 19**. Koncentrace větších HA oligosacharidů (≥ $HA8^{AN}$) má tendenci se zvyšovat v první části experimentu a dosahuje maxima v časovém rozmezí 30-300 min (v závislosti na DS a distribuci modifikace). Množství menších HA oligosacharidů (≤ $HA6^{AN}$), finální produkty štěpení BTH, se s časem po celou dobu experimentu zvyšuje. V důsledku toho je maximum dosaženo v čase 330 min. Pro každý vzorek se $w_{max.}^{HA4-HA20}$ vypočítá podle rovnice 2:

$$w_{max.}^{HA4-HA20} = \sum_{i=HA4}^{HA20} w_{max.}^{i} \quad (2)$$

kde $w_{max.}^{i}$ je maximum obsahu oligosacharidu *i* přítomného ve vzorku. Jak již bylo uvedeno dříve, obvykle je to při 330 minutách pro HA4 a HA6 a někde do 30 až 300 minut pro větší HA oligosacharidy.

Tabulka 9. Hodnoty $w_{max.}^{HA4-HA20}$ určené pro 3 typy vzorků. Symbol • znamená, že deriváty byly připraveny podle patentu WO/ 2016 /141903A1 a používají se jako standard pro srovnání s jinými derivátovými přípravky. Symbol Δ znamená, že deriváty byly připraveny podle tohoto vynálezu za vysoce zředěných podmínek a produkují ve vodě rozpustné deriváty HA-C12 s homogenní distribucí modifikace podél řetězce HA. Symbol □ znamená, že deriváty byly připraveny podle tohoto vynálezu za podmínek zapletení řetězce HA a produkují ve vodě nerozpustné deriváty HA-C12 s heterogenní / nerovnoměrnou distribucí substituentů podél řetězce HA. Tabulka je připravena z údajů uvedených na **obrázku 13.**

Příklad/Reference	Rozpouštědlo	Koncentrace (hm. %)	DS_{GC} (%)	$w_{max.}^{HA4-HA20}$ (hm. %)	Vyhodnocení	Symbol z **Obrázku 15**
WO/2016/141903A1	THF	5	25,5	57,08	Standard	•
WO/2016/141903A1	THF	5	31,5	50,40	Standard	•
WO/2016/141903A1	THF	5	31,8	45,38	Standard	•
WO/2016/141903A1	THF	5	37,9	36,12	Standard	•

WO/2016/141903A1	THF	5	36,75	38,04	Standard	•
WO/2016/141903A1	THF	5	43,98	24,43	Standard	•
WO/2016/141903A1	THF	5	11,8	78,75	Standard	•
40	THF	1	18	49,94	dobré	Δ
37	THF	1	14,4	61,03	dobré	Δ
36	DX	1	14	58,78	dobré	Δ
41	DX	1	18,7	45,97	dobré	Δ
3	THF	1	14,5	65,08	dobré	Δ
1	THF	0,50	7,12	68,74	dobré	Δ
4	THF	1,50	20,4	61,49	přiměřené	Δ
5	THF	2,50	28,4	55,72	slabé	□
6	THF	3	29,85	53,61	slabé	□
7	THF	5	35,76	53,01	slabé	□
42	TBA	2,50	19,3	74,28	slabé	□
24	TBA	1	9,3	86,01	slabé	□
38	TBA	0,80	14,5	72,31	přiměřené	□
33	TBA	1	11,8	79,83	slabé	□

Příklad 57. Celková enzymatická hydrolýza pomocí hyaluronan-lyázy ze *Streptococcus Pneumoniae*

Derivát (HA-C12 nebo HA-C18: 1, 3-5 mg) byl rozpuštěn ve směsi 0,1 M pufru fosforečnanu sodného pH 5,0 a isopropanolu (1: 1, obj./obj.) v koncentraci 2 mg.ml^{-1}. Po úplném rozpuštění byl vzorek zředěn 0,1 M pufrem fosforečnanu sodného na konečnou koncentraci derivátu a isopropanolu 1 mg ml^{-1} a 25 % (obj./obj.), respektive. Poté byl do alikvotu (1 ml) přidán roztok hyaluronan-lyázy ze *Streptococcus Pneumoniae* (SpHyl, 25 µl, přibližně 6500 IU ml^{-1}) a inkubován při 37 ° C po dobu 2 hodin. Vzorek byl zředěn na 20 µg / ml pomocí 30 % methanolu ve vodě (obj./obj.), když byl analyzován pomocí LC-MS.

Pro strukturní charakterizaci hyaluronanu modifikovaného C12/C18:1 byl použit chromatografický systém Acquity UPLC I třídy připojený k hmotnostnímu spektrometru Synapt G2-Si (Waters, Manchester, Velká Británie). Separace byla prováděna na koloně Waters Acquity UPLC Protein BEH C4 (1,7 µm, 300Å, 150 × 2,1 mm) při 40 ° C. Chromatografický eluent sestával z 0,1% kyseliny mravenčí ve vodě a acetonitrilu. Průtok byl nastaven na 0,4 ml · min^{-1} a byl použit následující gradient acetonitrilu: 0 min 30 %, 16,5 min 95 %, 17 min 95 %, 17,1 min 30 %. Vstřikovaný objem byl 5 µl.

Hmotnostní spektrometr byl vybaven elektrosprejovým zdrojem ionizace pracujícím v negativním iontovém režimu. Pro kalibraci přístroje byl použit mravenčan sodný (0,5 mmol l^{-1} ve vodě / isopropanolu = 10/90, obj./obj.) v rozmezí m/z 50–1850. Instrumentální parametry pro analýzu C12/C18:1 modifikovaného oligosacharidu byly nastaveny následovně (pokud není uvedeno jinak): nástřikové kapilární napětí 2,7 kV, teplota zdroje 100 °C, kónické napětí vzorku 140 V, offset zdroje 80 V, teplota desolvace 500 °C , kónický průtok plynu (N_2) 50 l.h^{-1}, průtok deolvačního plynu (N_2) 850 l h^{-1}, průtok plynu rozprašovače (N_2) 6,0 bar, kolizní napětí zachycení 4,0 V, přenos kolizního napětí 2,0 V, průtok zachyceného plynu (Ar) 2,0 ml min^{-1}, průtok heliového plynu (He) 180,0 ml min-1, průtok plynu (driftového plynu) iontové mobility (N_2) 90 ml min^{-1} a výška vlny 40,0 V. Byla nastavena vlnová rychlost iontové mobility při 500 m s^{-1}. Leucin enkefalin (200 ng ml^{-1}) při průtokové rychlosti 5 µl min^{-1} byl použit jako blokovací hmota, když byla měřena plná MS spektra. Získaná data byla zpracována pomocí softwaru MassLynx 4,1 (Waters, Milford, MA, USA). Naměřené hodnoty *m / z* jsou uvedeny v průběhu celého textu.

Měření se musí provádět za stejných podmínek, jaké jsou zde popsány, protože chromatografické a hmotnostní spektrometrické podmínky spolu s použitým hmotnostním spektrometrem významně ovlivňují výsledky.

Měřené specifické hmotnostní chromatogramy patřící k nenasyceným modifikovaným oligosacharidům (jmenovitě ΔHA2 + C12, ΔHA4 + C12, ΔHA4 + 2 * C12 a ΔHA4 + 3 * C12 pro derivát HA-C12; a ΔHA2 + C18: 1, ΔHA4 + C18: 1, $\Delta HA3^{AA}$ + C18: 1, AHA4 + 2 * C18: 1 a $AHA3^{AA}$ + 2 * C18: 1 pro derivát HA-C18: 1) byly extrahovány z chromatogramů celkového proudu iontů (TIC) a integrovány. Množství specifického modifikovaného oligosacharidu (A_i) přítomného ve směsi se vypočítá podle rovnice (3):

$$A_i = 100 \times \frac{Pk_i}{\sum_i^n Pk_i} \qquad (3)$$

kde a Pk_i - Pk_n jsou píky patřící nenasyceným modifikovaným oligosacharidům (HA-C12 nebo HA-C18:1). *A (i)* je vyjádřeno v %.

Jak je vidět z **tabulky 10**, hodnoty $A_{\Delta HA4+C12}$ nad 35 % a hodnoty $A_{\Delta HA4+2*C12}$ pod 40 % jsou pozorovány u derivátů s dobrou rozpustností ve vodě (homogennější distribuce modifikace C12 podél HA polymerního řetězce). Tyto deriváty byly připraveny za vysoce zředěných podmínek v THF a dioxanu. Modifikace provedená v TBA nebo v koncentrovaném HA roztoku neposkytuje derivát se stejnými vlastnostmi (stejná distribuce modifikace C12 podél polymerního řetězce). Poměr $A_{\Delta HA4+2*C12}$ / $A_{\Delta HA4+C12}$ je nižší než 1,5 pro vzorky s dobrou / přijatelnou rozpustností ve vodě / pufru, zatímco vyšší hodnoty jsou typické pro vzorky se špatnými vlastnostmi.

Tabulka 10. Stanovení množství modifikovaných hyaluronanových oligosacharidů (A_i), které jsou výsledkem štěpení derivátů HA-C12 s různými DS.

Příklad	Rozpouštědlo	Koncentrace (hm. %)	Vyhodnocení	DS_{GC} (%)	$A_{\Delta HA2+C12}$	$A_{\Delta HA4+C12}$	$A_{\Delta HA4+2*C12}$	$A_{\Delta HA4+3*C12}$	$\frac{A_{\Delta HA4+2*C12}}{A_{\Delta HA4+C12}}$
1	THF	0,5 %	dobré	7,1	3,95	57,03	38,35	0,68	0,67
24	TBA	1,0 %	přiměřené	9,3	2,22	39,63	53,38	4,77	1,35
33	TBA	1,0 %	přiměřené	11,8	2,66	38,50	51,11	7,74	1,33
37	THF	1,0 %	dobré	14,4	3,54	50,34	33,25	12,86	0,66
36	DX	1,0 %	dobré	14,0	4,91	54,37	29,65	11,07	0,55
38	TBA	0,8 %	dobré	14,5	2,27	29,34	66,11	2,28	2,25
3	THF	1,0 %	dobré	14,5	4,13	57,30	37,03	1,54	0,65
40	THF	1,0 %	dobré	18,0	2,30	52,38	31,34	13,98	0,60
41	DX	1,0 %	dobré	18,7	4,08	54,78	28,95	12,19	0,53
42	TBA	2,5 %	slabé	19,3	1,71	29,34	53,86	15,09	1,84
4	THF	1,5 %	přiměřené	20,4	4,18	37,93	53,88	4,01	1,42
5	THF	2,5 %	slabé	28,4	4,57	24,42	66,62	4,39	2,73
6	THF	3,0 %	slabé	29,9	4,14	23,47	67,04	5,35	2,86
7	THF	5,0 %	slabé	35,8	3,48	13,50	74,64	8,38	5,53
WO/2016/141903A1	THF	5,0 %	velmi slabé	20,0	5,3	0,55	91,59	2,54	166

Polymery připravené v 1,4-dioxanu vykazovaly korelaci nebo přímou korelaci mezi tetramery ($_{\Delta}$HA4 * 2C18:1) a stupněm substituce stanoveným plynovou chromatografií (DS_{GC}) (černé skvrny, **viz obrázek 15**), zatímco stejný polymer připravený v terc.butanolu vykazoval náhodnou substituci (bílé skvrny). Kromě toho, **tabulka 11** (položky 1 a 2) ukazuje, že množství monosubstituovaných tetramerů ($A_{\Delta HA4+C18:1}$) za vysoce zředěných podmínek je téměř dvojnásobné množství disubstituovaných tetramerů ($A_{\Delta HA4+2*C18:1}$). Naopak, nerovnoměrná substituce C18: 1 podél HA řetězce je typická pro větší množství ΔHA4+2*C18:1 ($A_{\Delta HA4+2*C18:1} \geq 35$ %). V případě chemické modifikace provedené v alkoholech podle patentového dokumentu W02014082609 **(jako je IPA, položka 6)**, nižší množství $A_{\Delta HA4+C18:1}$ a vyšší množství $A_{\Delta HA4+2*C18:1}$ znamená nerovnoměrné rozdělení C18: 1 substituentů podél polymerního řetězce.

Tabulka 11. Stanovení množství modifikovaných hyaluronanových oligosacharidů (A_i), které jsou výsledkem štěpení derivátů HA-C18: 1 s různými DS.

Příklad	Rozpouštědlo	Koncentrace (hm. %)	DS_{GC} (%)	$A_{\Delta HA3+C18:1}$	$A_{\Delta HA4+C18:1}$	$A_{\Delta HA3AA+C18:1}$	$A_{\Delta HA4+2*C18:1}$	$A_{\Delta HA3AA+2*C18:1}$	$A_{\Delta HA4+1*C18:1}$ / $A_{\Delta HA4+C18:1}$
9	DX	**0,8 nebo (HD)**	5,5	6,77	**36,92**	10,00	22,77	23,54	0,62
10	DX	**0,8 nebo (HD)**	6,5	7,47	**48,42**	3,38	33,37	7,35	0,69
8	DX	2,5	4,5	3,42	17,15	7,95	**44,34**	**27,14**	2,59
11	DX	2,5	11,2	3,25	17,42	8,74	**55,10**	**15,50**	3,16
12	DX	2,5	12,4	5,81	23,06	5,75	**57,61**	**7,77**	2,50
WO2014082609	IPA	2,5	3,6	3,42	23,93	16,75	37,68	18,23	1,57
14	TBA	**0,8 nebo (HD)**	6,0	9,56	**59,51**	7,50	20,25	3,19	0,34
15	TBA	**0,8 nebo (HD)**	7,3	11,21	**40,51**	17,98	21,98	8,32	0,54
13	TBA	2,5	3,1	3,97	18,22	17,55	**37,63**	**22,63**	2,07
16	TBA	2,5	8,9	7,17	29,13	5,62	**50,13**	**7,95**	1,72
17	TBA	2,5	15,9	3,94	14,94	15,86	**42,57**	**22,69**	2,85

Příklad 58. Stanovení zákalu a rozpustnosti vybraných derivátů

Zákal 0,15 hm. % roztoku derivátů připravených v předchozích příkladech byl nefelometricky stanoven třikrát nezávisle (90 ° rozptýlené světlo) při pokojové teplotě, v Turbidimetru (TB 300IR) se zdrojem světla IR-LED (860 nm) použitým v rozsah 0,01 - 1100 NTU s přesností ± 2% odečtu (0-500 NTU). Výsledky spektrofotometrických měření budou uvedeny v podobě zákalu (NTU). Rozpustnost roztoků je znázorněna na **obrázku 16.**

Příklad 59. Analýza optické propustnosti

Optická propustnost roztoků založených na derivátech z výše uvedených příkladů byla analyzována pomocí UV-Vis spektrometru (**tabulka 12**). Připravené roztoky derivátů byly umístěny do měřícího držáku a propustnost byla měřena při vlnové délce 200 až 800 nm.

Tabulka 12. Stanovení zákalu a optické propustnosti popsané pro roztoky HA-C12 různých DS (Mw = 290000 g/mol)

Vstup	GC DS (%)	rozpouštědlo	(c hm%)	Vzhled	Zákal NTU	Absorb.	Propustnost
1	8,0	DX	2,5	slabý	43,8	0,046	90,8
2	8,9	THF	1,0	dobrý	2.,2	0,006	98,9
3	9,7	DX	1,0	dobrý	172,7	0,023	94,9
4	10,5	THF	1,0	dobrý	2,2	0,007	98,9
5	10,8	THF	1,0	dobrý	3,5	0,003	99,4
6	11,4	THF	1,0	dobrý	9,7	0,009	98,0
7	11,8	TBA	1,0	přiměřený	4,9	0,013	97,0
8	13,2	DX	1,0	dobrý	10,0	0,009	98,1
9	14,8	DX	1,0	dobrý	9,0	0,010	97,7
10	20,7	DX	2,5	slabý	209,7	0,608	25,3
11	28,0	THF	2,5	slabý	20,3	0,189	64,4
12	32,7	TBA	2,5	slabý	35,4	0,208	60,2

Příklad 60. Stanovení viskozity připravených kompozic vyrobených z derivátů syntetizovaných v různých rozpouštědlech.

Všechna měření byla prováděna pomocí reometru Malvern Kinexus Ultra s 50 mm, ve způsobu geometrie soustředných válců. V jedné baňce bylo zváženo 30 mg HA-C12 a rozpuštěno ve 20 ml fyziologického roztoku a rozpouštěno po dobu alespoň 24 hodin. Poté byl zapotřebí objem vzorku 0,3 ml pro naplnění reometru s danou geometrií. Všechny testy byly provedeny při teplotě místnosti. Ke snížení odpařování vzorku byla použita základní deska s lapačem vody. Vzorek byl poté potažen hliníkovými, a plastovými kryty, respektive. Pro každý test byly dokončeny tři opakování. Výsledky uvedené v tabulce 13 jsou průměrem všech tří dokončených běhů. Smyková viskozita byla poté vyhodnocena v rozmezí smyku 0,1 až 10 000 s^{-1} při teplotě místnosti (25 ° C).

Tabulka 13. Stanovení dynamické viskozity derivátu HA-C12 připraveného v různých rozpouštědlech při teplotě místnosti 25 ° C.

Konc. (hm. %)	Příklad	Vzorek	DS_{GC}	Rozpouštědlo pro reakci	Viskozita (mPa.s) γ = 1/s	Viskozita (mPa.s) γ = 10/s	Viskozita (mPa.s) γ = 100/s	Viskozita (mPa.s) γ = 1000/s
0,25	**31**	HA-C12	11,2	1,4-Dioxan	2940,3	805.8	80,0	13,2
	32		11,4	THF	5455,6	733.7	71,8	14,0
	33		11,8	terc-butanol	120,4	135.8	31,7	9,5
	34		12,2	2-propanol	1725,5	527.8	56,7	11,2
0,15	**31**	HA-C12	11,2	1,4-Dioxan	23,7	11.7	10,1	5,2
	32		11,4	THF	87,7	72.9	16,1	5,6
	33		11,8	terc-butanol	13,4	6.0	4,5	4,0
	34		12,2	2-propanol	15,4	7.6	5,9	4,3

Příklad 61. Stanovení viskozity připravených kompozic při 37 ° C připravených z derivátů syntetizovaných v různých rozpouštědlech.

Všechna měření byla prováděna pomocí reometru Malvern Kinexus Ultra s 50 mm, ve způsobu geometrie soustředných válců. Pro naplnění reometru danou geometrií byl vyžadován objem vzorku 0,3 ml. Všechny testy byly prováděny při 37 ° C. Pro snížení odpařování vzorku byla použita základní deska s lapačem vody. Vzorek byl poté potažen hliníkovými a respektive plastovými kryty. Pro každý test byla provedena tři opakování. Výsledky uvedené v **tabulce 14** jsou průměrem všech tří dokončených běhů. Smyková viskozita byla poté vyhodnocena v rozmezí smyku 0,1 až 1000 s^{-1}.

Tabulka 14. Stanovení dynamické viskozity derivátu HA-C12 připraveného v různých rozpouštědlech při 37 °C.

Konc. (hm. %)	Příklad	Vzorek	DS_{GC}	Rozpouštědlo pro reakci	Viskozita (mPa.s) γ = 1/s	Viskozita (mPa.s) γ = 10/s	Viskozita (mPa.s) γ = 100/s	Viskozita (mPa.s) γ = 1000/s
0,25	**31**	HA-C12	11,2	1,4-dioxan	354,9	583	97,3	13,8
	32		11,4	THF	3060	601,4	70,9	12,3
	33		12,2	2-propanol	136,4	212,9	58,8	10,0
	34		11,8	terc.butanol	73,3	64,5	27,4	8.,0
0,15	**31**	HA-C12	11,2	1,4-dioxan	17,7	6,4	4,8	4,0
	32		11,4	THF	31,4	13,3	10,9	4,6

	33		12,2	2-propanol	15,5	3,9	3,0	2,8
	34		11,8	terc.butanol	12,3	4,4	3,3	2,9

Příklad 62. Sterilizace derivátu HA-C12 připraveného v příkladu 28

0,15% roztok derivátu byl připraven v pufru popsaném v tabulce s pH 7,2 a filtrován filtrací přes 0,2 mm Ophtalsart hydrofilní stříkačkové filtry (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen, Německo). Viskozita roztoku byla stanovena a je uvedena v **tabulce 15.**

Tabulka 15. Kompozice

Složka	množství
Kyselina chlorovodíková	0,01 obj./obj. %
Chlorid sodný	0,2 hm. %
Chlorid draselný	0,14 hm. %
Trehalóza	2,1 hm. %
Tromethamol	0,12 hm. %
Přečištěná voda Q.S	do 250 ml.
Viskozita (mPa.s)	
y = 10 / s	25
Viskozita (mPa.s)	
y = 1000 / s	5,0

Příklad 63. Sterilizace derivátu HA-C12 připraveného v příkladu 28.

Roztoky HA-C12 (0,15 mg / ml) byly připraveny v níže popsaném roztoku a sterilizovány pomocí filtrace přes 0,2 mm hydrofilní stříkačkové filtry Ophtalsart (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen, Německo). Viskozita roztoku byla stanovena a je uvedena v tabulce 16.

Tabulka 16. Kompozice

Složka	množství
Trehalóza	2,8 hm. %
Chlorid sodný	0,2 hm. %
Kyselina chlorovodíková	0,01 obj./obj. %
Tromethamol	0,121 hm. %
Přečištěná voda Q.S	do 250 ml.

Viskozita (mPa.s)

y = 10 / s 25

Viskozita (mPa.s)

y = 1000 / s 5,0

Příklad 64. Sterilizace derivátu HA-C12 připraveného v příkladu 28.

0,25 % (hm.) roztok derivátu byl připraven v pufru o pH 7,2, popsáno v tabulce, a filtrován filtrací přes hydrofilní stříkačkové filtry 0,2 mm Ophtalsart (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen, Německo). Viskozita roztoku byla stanovena a je uvedena v **tabulce 17.**

Tabulka 17. Kompozice

Složka	množství
Kyselina chlorovodíková	0,01 obj./obj. %
Chlorid sodný	0,2 hm. %
Chlorid draselný 0,14 hm. %	
Tromethamol	0,12 hm. %
Přečištěná voda Q.S	do 250 ml.
Viskozita (mPa.s)	
y = 10 / s	20
Viskozita (mPa.s)	
y = 1000 / s	5,8

Příklad 65. Sterilizace derivátu HA-C12 připraveného v příkladu 28.

0,4 % (hm.) roztok derivátu byl připraven v pufru o pH 7,2, který je popsán v tabulce, a filtrován filtrací přes hydrofilní stříkačkové filtry 0,2 mm Ophtalsart (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen, Německo). Viskozita roztoku byla stanovena a je uvedena v **tabulce 18.**

Tabulka 18. Kompozice

Kyselina chlorovodíková	0,01 obj./obj. %
Chlorid sodný	0,2 hm. %
Chlorid draselný	0,14 hm. %
Trehalóza	1,5 hm. %
Tromethamol	0,12 hm. %
Přečištěná voda Q.S	do 250 ml.

Viskozita (mPa.s)	
y = 10 / s	65,0
Viskozita (mPa.s)	
y = 1000 / s	6,8

Příklad 66. Sterilizace derivátu HA-C12 připraveného v příkladu 28.

0,25 % (hm.) roztok derivátu HA-C12 byl připraven v pufru o pH 7,2, popsaném v tabulce a filtrován filtrací přes 0,2 mm stříkačkové filtry Optex s filtrem (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen, Německo). Viskozita roztoku byla stanovena a je uvedena v **tabulce 19.**

Tabulka 19. Připravená kompozice

Složka	množství
Kyselina chlorovodíková	0,01 obj./obj. %
Chlorid sodný	0,2 hm. %
Chlorid draselný	0,14 hm. %
Trehalóza	2,8 hm. %
Tromethamol	0,12 hm. %
Přečištěná voda Q.S	do 250 ml.
Viskozita (mPa.s)	
y = 10 / s	35,0
Viskozita (mPa.s)	
y = 1000 / s	5,4

Příklad 67. Sterilizace derivátu HA-C12 připraveného v příkladu 28.

0,25 % (hm.) roztok derivátu byl připraven v pufru o pH 7,2, popsán v tabulce a filtrován pomocí filtrace přes 0,2 mm Optex filtr 0,22 μm (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen, Německo). Viskozita roztoku byla stanovena a je uvedena v **tabulce 20.**

Tabulka 20. Kompozice

Složka	množství
Citrát sodný	3 hm.%
Kyselina citronová	0,2 obj./obj. %
Trehalóza	3 hm. %

Přečištěná voda Q.S	do 250 ml.
Viskozita (mPa.s)	
y = 10 / s	42,2
Viskozita (mPa.s)	
y = 1000 / s	6,4

Příklad 68. Sterilizace derivátu HA-C12 připraveného v příkladu 28.

0,25 % (hm.) roztok derivátu byl připraven v pufru o pH 7,2, který je popsán v tabulce, a filtrován pomocí filtrace přes 0,2 mm hydrofilní stříkačkové filtry Ophtalsart (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen, Německo). Viskozita roztoku byla stanovena a je uvedena v tabulce 21.

Tabulka 21. Kompozice

Složka	množství
$Na_2B_4O_7$	2,5 hm.%
H_3BO_3	1,5 obj./obj. %
Trehalóza	3,8 hm. %
Chlorid sodný	0,3 hm. %
Tromethamol	0,17 hm. %
Přečištěná voda Q.S	do 250 ml.
Viskozita (mPa.s)	
y = 10 / s	19,2
Viskozita (mPa.s)	
y = 1000 / s	6,5

Příklad 69. Sterilizace derivátu HA-C12 připraveného v příkladu 28.

0,25 % (hm.) roztok derivátu byl připraven v pufru o pH 7,2, který je popsán v tabulce, a filtrován pomocí filtrace přes 0,2 mm hydrofilní stříkačkové filtry Ophtalsart (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen, Německo). Viskozita roztoku byla stanovena a je uvedena v tabulce 22.

Tabulka 22. Kompozice

Složka	množství
$Na_2B_4O_7$	2,5 hm. %
H_3BO_3	1,5 obj./obj. %
Trehalóza	2,77 hm. %

Chlorid sodný	0,3 hm. %
Tromethamol	0,05 hm.%
Přečištěná voda Q.S	do 250 ml.
Viskozita (mPa.s)	
y = 10 / s	35,2
Viskozita (mPa.s)	
y = 1000 / s	7,9

Příklad 70. Sterilizace derivátu HA-C12 připraveného v příkladu 28.

0,25 % (hm.) roztok derivátu byl připraven v pufru o pH 7,2, který je popsán v tabulce, a filtrován pomocí filtrace přes 0,2 mm hydrofilní stříkačkové filtry Ophtalsart NML (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen, Německo). Viskozita roztoku byla stanovena a je uvedena v **tabulce 23.**

Tabulka 23. Kompozice

Složka	množství
$Na_2B_4O_7$	2,5 hm.%
H_3BO_3	1,5 obj./obj. %
Trehalóza	2,9 hm.%
Chlorid sodný	0,3 hm.%
glycin	0,12 hm.%
Přečištěná voda Q.S	do 250 ml.
Viskozita (mPa.s)	
y = 10 / s	25,8
Viskozita (mPa.s)	
y = 1000 / s	6,7

Příklad 71. Sterilizace derivátu HA-C12 připraveného v příkladu 28 ve směsi s HA.

0,25 % (hm.) roztok derivátu a HA Mw = 1 600 000 g / mol (4: 1) byl připraven v pufru o pH 7,2, který je popsán v tabulce a filtrován pomocí filtrace přes NML filtr 0,22 hydrofilní stříkačkové filtry (Sartorius) Stedim Biotech GmbH, Göttingen, Německo). Viskozita roztoku byla stanovena a je uvedena v **tabulce 24.**

Tabulka 24. Kompozice

Složka	množství
$Na_2B_4O_7$	2,5 hm.%
H_3BO_3	1,5 obj./obj. %
Trehalóza	3 hm.%
Chlorid sodný	0,3 hm.%
Přečištěná voda Q.S	do 250 ml.
Viskozita (mPa.s)	
y = 10 / s	105,8
Viskozita (mPa.s)	
y = 1000 / s	8,7

Příklad 72. Testování filtrace derivátu HA-C12 jako funkce iontové síly

0,10 % (hm.) roztok derivátu (HA-C12 Mw = 290 000 g / mol, DS_{GC} = 9,2) byl připraven v pufru s různou iontovou silou, jak je popsáno v **tabulce 25**, a filtrován přes NML filtr 0,22 hydrofilní stříkačkový filtr (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen, Německo).

Tabulka 25. Připravená kompozice obsahující chlorid sodný a HA-C12

Roztok	Procento filtrovaného roztoku
0,1 hm.% NaCl + 0,1 hm.% HA-C12	cca. 100 % celkového objemu
0,2 hm.% NaCl + 0,1 hm.% HA-C12	cca. 100 % celkového objemu
0,3 hm.% NaCl + 0,1 hm.% HA-C12	cca. 100 % celkového objemu
0,4 hm.% NaCl + 0,1 hm.% HA-C12	75 % celkového objemu
0,5 hm.% NaCl + 0,1 hm.% HA-C12	25 % celkového objemu

Příklad 73. Testování filtrace derivátu HA-C12 jako funkce iontové síly

0,10 % (hm.) roztok derivátu (HA-C12 Mw = 290000 g/mol, DS_{GC} = 9,2) a HA 1500000 g/mol (0,30 hm.%.) byl připraven v pufru s různou iontovou silou, jak je popsáno v **tabulce 26** a filtrován přes filtr NML 0,22 hydrofilní stříkačkový filtr (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen, Německo).

Tabulka 26. Připravená kompozice HA a HA-C12 za použití několika koncentrací chloridu sodného.

Roztok	Procento filtrovaného roztoku

0,1 hm.% NaCl + 0,1 hm.% HA-C12+ HA 0,3 hm.%	cca. 100 % celkového objemu
0,2 hm.% NaCl + 0,1 hm.% HA-C12+ HA 0,3 hm.%	cca. 100 % celkového objemu
0,3 hm.% NaCl + 0,1 hm.% HA-C12+ HA 0,3 hm.%	cca. 100 % celkového objemu
0,4 hm.% NaCl + 0,1 hm.% HA-C12+ HA 0,3 hm.%	75 % celkového objemu
0,5 hm.% NaCl + 0,1 hm.% HA-C12+ HA 0,3 hm.%	25 % celkového objemu

Příklad 74. Příprava polymerních micel vyrobených na bázi derivátu popsaného v příkladu 1

Modifikovaný derivát HA připravený v příkladu 1 byl naplněn kurkuminem do vytvořených micel pomocí metody hydratace tenkým filmem. Metoda je obecná a je stručně popsána pro jeden z modelů jako příklad. 2 mg kurkuminu byly rozpuštěny ve 2,5 ml isopropanolu a přidány k 10 ml 1% hm. /obj. roztoku **HA-C12**. K odstranění rozpouštědel a vytvoření tenkého filmu směsi léčiva / micely bylo použito rotační vakuové odpařování. Vysušený film byl dále hydratován 10 ml vody, následovala filtrace přes 1 μm stříkačkový filtr, aby se odstranilo jakékoli nezačleněné léčivo, které je stále v roztoku. Výsledný filtrát obsahující polymerní micely byl lyofilizován. Enkapsulované množství stanovené pomocí HPLC bylo 0,3%.

Příklad 75. Příprava polymerních micel vyrobených na bázi derivátu HA-C12 popsaného v příkladu 2

Modifikovaný derivát HA připravený v **příkladu 2** byl naplněn kurkuminem do vytvořených micel pomocí metody hydratace tenkým filmem. Metoda je obecná a je stručně popsána pro jeden z modelů jako příklad. 2 mg kurkuminu byly rozpuštěny ve 2,5 ml isopropanolu a přidány k 10 ml 1% hm./obj. roztoku **HA-C12**. K odstranění rozpouštědel a vytvoření tenkého filmu směsi léčiva / micely bylo použito rotační vakuové odpařování. Vysušený film byl dále hydratován 10 ml vody, následovala filtrace přes 1 μm stříkačkový filtr, aby se odstranilo jakékoli nezačleněné léčivo, které je stále v roztoku. Výsledný filtrát obsahující polymerní micely byl lyofilizován. Enkapsulované množství stanovené pomocí HPLC bylo 0,5%.

Příklad 76. Příprava polymerních micel vyrobených na bázi derivátu HA-C12 popsaného v příkladu 4

Modifikovaný derivát HA připravený v **příkladu 4** byl naplněn kurkuminem do vytvořených micel pomocí metody hydratace tenkým filmem. Metoda je obecná a je stručně popsána pro jeden z modelů jako příklad. 2 mg kurkuminu byly rozpuštěny ve 2,5 ml isopropanolu a přidány k 10 ml 1% hm./obj. roztoku **HA-C12**. K odstranění rozpouštědel a vytvoření tenkého filmu směsi léčiva / micely bylo použito rotační vakuové odpařování. Vysušený film byl dále hydratován 10 ml vody, následovala filtrace přes 1 μm stříkačkový filtr, aby se odstranilo jakékoli nezačleněné léčivo, které je stále v roztoku. Výsledný filtrát obsahující polymerní micely byl lyofilizován. Enkapsulované množství stanovené pomocí HPLC bylo 0,8%.

Příklad 77. Životaschopnost buněk pomocí použití myších swiss-3T3 fibroblastů

Vzorky byly rozpuštěny v kultivačním médiu v následujících koncentracích: 10, 100, 500 a 1000 μg/ml. Test byl proveden s použitím myších fibroblastů swiss-3T3 a životaschopnost buněk byla stanovena testem MTT. Hodnocení souvisí s kontrolou neošetřených buněk (0%). Data v grafu - každý bod představuje průměr ze 6 měření (2 opakování v triplikátech)

Příklad 78. Hydratace buněk a retence povrchu

Roztoky byly připraveny v pufru popsaném v příkladu 16 a filtrovány pomocí membrán Ophtalsart. Buňky HaCaT (linie lidských epidermálních keratinocytů) byly naočkovány na 48-jamkovou destičku. Po dosažení 100 % konfluence bylo kultivační médium odstraněno a po filtraci bylo přidáno 150 µl kompozic. Buňky byly inkubovány po dobu 30 minut (37 ° C, 5 % CO_2). Poté byly kompozice odstraněny a destička bez víka byla umístěna do klimatické komory (37 ° C, 45% vlhkost) na dalších 30 minut. Byly zajištěny dvě kontroly - „mokrá kontrola“ znamená buňky s kultivačním médiem a „suchá kontrola“ znamená, že buňky byly udržovány bez kultivačního média během inkubace (30 minut). Data jsou vyjádřena s použitím „suché kontroly“, aby se otestovala účinnost kompozice. Nakonec byla měřena životaschopnost buněk pomocí metody MTT. Do každé jamky byly přidány MTT (5 mg / ml) a buňky byly inkubovány po dobu 2,5 hodiny. Poté byly buňky lyzovány pomocí 550 µl IPA: DMSO (1: 1), Triton X-100 (10 %). Absorbance byla měřena čtečkou mikrodestiček při referenční vlnové délce 570 nm a zkušební vlnové délce 590 nm.

Příklad 79. Roztok kontaktních čoček používající derivát popsaný v příkladu 28

Uchovávací roztoky a aplikační roztoky pro přípravu roztoku kontaktních čoček obsahujících HA derivát.

1. Kyselina citronová 0,5 obj./obj. %

2. Na citrát 1,0 hm. %

3 NaCl do 300 mOsm

4. Na-EDTA 0,02 hm. %

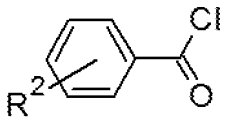
5. HA-C12 0,15 hm. %

6. pH (úprava pomocí NaOH nebo HC1) 7,2

7. HA-C12 byl rozpuštěn v médiu obsahujícím složky 1-6 v koncentraci 0,01 hm. %

PATENTOVÉ NÁROKY

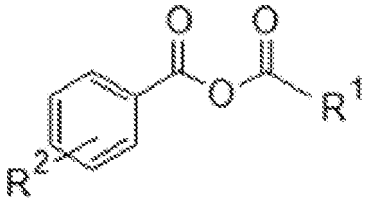
1. Způsob přípravy ve vodě rozpustného esterového derivátu kyseliny hyaluronové nebo její farmaceuticky přijatelné soli, **vyznačující se tím**, že karboxylová kyselina obecného vzorce (I), R^1COOH, kde R^1 je C_xH_y, přičemž x je celé číslo v rozmezí 10 až 17 a y je celé číslo 19 až 36, kde C_xH_y je lineární nebo rozvětvený, nasycený nebo nenasycený C_{12}-C_{31} alifatický řetězec nebo R^1 je sukcinylester cholesterolu, je aktivována pomocí substituovaného nebo nesubstituovaného benzoylchloridu nebo jeho derivátu obecného vzorce II



(II),

kde R^2 je jeden nebo více substituentů vybraných ze skupiny obsahující H, $-NO_2$, -COOH, halogenidy, C_1-C_6alkylkoxy, s výhodou halogenidy, methoxy nebo ethoxy, výhodněji Cl;

v přítomnosti organické báze, s výhodou terciárního aminu, výhodněji triethylaminu, diisopropylethylaminu nebo N,N-diisopropylethylaminu; a etherového rozpouštědla vybraného ze skupiny obsahující tetrahydrofuran (THF), dioxan (DX) za vzniku reaktivního anhydridu obecného vzorce III



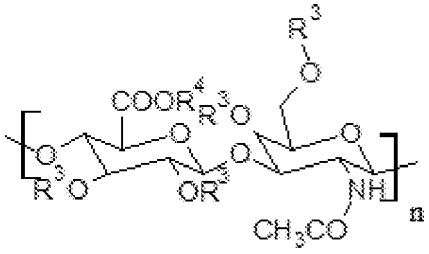
(III),

kde

R^1 a R^2 jsou jak je definovány výše,

který reaguje s kyselinou hyaluronovou nebo její farmaceuticky přijatelnou solí v množství 0,5 až 1,5 % (hm./obj.),

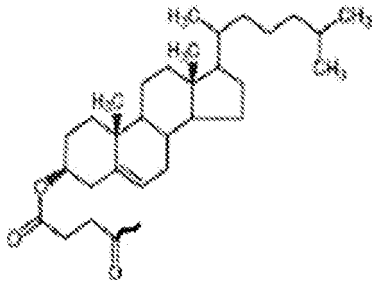
v přítomnosti organické báze, s výhodou terciárního aminu, výhodněji triethylaminu, diisopropylethylaminu nebo N,N-diisopropylethylaminu; směsi vody a etherového rozpouštědla mísitelného s vodou vybraného ze skupiny obsahující tetrahydrofuran (THF), dioxan (DX) a v přítomnosti dimethylaminopyridinu (DMAP) za vzniku esterového derivátu kyseliny hyaluronové, který má rovnoměrnou distribuci substituentů obecného vzorce IV



(IV),

kde n je celé číslo v rozmezí 500 až 1000 dimerů,

R^3 jsou nezávisle H nebo COR^3, kde R^3 je C_xH_y, přičemž x je celé číslo v rozmezí 10 až 17 a y je celé číslo 19 až 36, kde C_xH_y je lineární nebo rozvětvený, nasycený nebo nenasycený C_{12}-C_{31} alifatický řetězec nebo R^3 je zbytek sukcinylesteru cholesterolu vzorce V



(V),

kde ~ je místo kovalentní vazby zbytku sukcinylesteru cholesterolu vzorce V,

za předpokladu, že alespoň dva R^3 derivátu jsou COR^3;

R^4 je H^+ nebo farmaceuticky přijatelná sůl.

2. Způsob podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že aktivace mastné kyseliny se provádí při teplotě v rozmezí 20 °C až 60 °C, s výhodou při 20 ° C až 30 °C; po dobu 1 minuty až 0,5 hodiny, s výhodou 10 minut až 0,5 hodiny.

3. Způsob podle nároku 1 nebo nároku 2, **vyznačující se tím**, že množství etherového rozpouštědla při aktivaci karboxylové kyseliny je 30 % až 70 % obj./obj. z celkového objemu roztoku, s výhodou 50 % obj./obj. celkového objemu roztoku.

4. Způsob podle kteréhokoli z nároků 1 až 3, **vyznačující se tím**, že tvorba esterového derivátu kyseliny hyaluronové nebo její farmaceuticky přijatelné soli se provádí při teplotě 25 °C až 60 °C, s výhodou 25 ° C až 35 °C, výhodněji 25 °C; po dobu 1 až 3 hodiny, s výhodou 2 hodiny.

5. Způsob podle kteréhokoli z nároků 1 až 4, **vyznačující se tím**, že množství reaktivního anhydridu smíchaného s kyselinou hyaluronovou nebo její solí odpovídá 0,5 až 2,5 molárních ekvivalentům, s výhodou 0,8 až 1,5 molárním ekvivalentům, výhodněji 1,0 molárním ekvivalentům na dimer kyseliny hyaluronové nebo její soli.

6. Způsob podle kteréhokoli z nároků 1 až 5, **vyznačující se tím**, že

množství organické báze odpovídá 2 až 6 molárním ekvivalentům, s výhodou 4 molárním ekvivalentům na dimer kyseliny hyaluronové nebo její soli;

množství substituovaného nebo nesubstituovaného benzoylchloridu odpovídá 0,1 až 2 molárním ekvivalentům, s výhodou 1 molárním ekvivalentu na dimer kyseliny hyaluronové nebo její farmaceuticky přijatelné soli; množství mastné kyseliny odpovídá 0,1 až 2,0 molárním ekvivalentům, s výhodou 1,0 molárním ekvivalentům kyseliny hyaluronové nebo její soli.

7. Způsob podle kteréhokoli z nároků 1 až 6, **vyznačující se tím**, že množství vody ve směsi voda a etherové rozpouštědlo mísitelné s vodou je 90 až 40 % obj./obj., s výhodou 50 % obj./obj.

8. Způsob podle kteréhokoli z nároků 1 až 7, **vyznačující se tím**, že průměrná molekulová hmotnost kyseliny hyaluronové nebo její farmaceuticky přijatelné soli je v rozmezí 6000 g/mol až

1600000 g/mol, s výhodou 200000 g/mol až 700000 g/mol, výhodněji 200000 až 400000 g/ mol, nejlépe 300000 g/mol.

9. Ve vodě rozpustný esterový derivát kyseliny hyaluronové nebo její farmaceuticky přijatelné soli připravený podle způsobu definovaného ve kterémkoliv z nároků 1 až 8.

10. Esterový derivát kyseliny hyaluronové nebo její farmaceuticky přijatelné soli podle nároku 9, jeho průměrná molekulová hmotnost je průměrná molekulová hmotnost v rozmezí 100000 až 600000 g/mol, s výhodou 200000 g/mol až 400000 g/mol, výhodněji 300000 g/mol.

11. Esterový derivát kyseliny hyaluronové nebo její farmaceuticky přijatelné soli podle nároku 10 nebo 11, jeho stupeň substituce (DS_{GC}) je v rozmezí 8,0 až 12,5 %, výhodněji 8,5 až 9,5 %.

12. Kompozice **vyznačující se tím**, že obsahuje alespoň jeden esterový derivát kyseliny hyaluronové nebo její farmaceuticky přijatelné soli podle kteréhokoli z nároků 9 až 11, s výhodou je vybrán ze skupiny obsahující lauryl hyaluronan, oleyl hyaluronan.

13. Kompozice podle nároku 12, **vyznačující se tím**, že množství esterového derivátu kyseliny hyaluronové nebo její farmaceuticky přijatelné soli je v rozmezí od 0,01 % do 0,6 % hm., výhodněji od 0,15 do 0,25 % hm., nejlépe 0,2 % hm.

14. Kompozice podle nároku 12 nebo nároku 13, **vyznačující se tím**, že její pH je v rozmezí 6,6 až 7,8, s výhodou 7,2.

15. Kompozice podle kteréhokoli z nároků 12 až 14, **vyznačující se tím**, že její průměrná osmolalita je v rozmezí od 300 do 350 mOsmol / l, s výhodou 320 mOsmol / L.

16. Kompozice podle kteréhokoli z nároků 12 až 15, **vyznačující se tím**, že viskozita kompozice je v rozmezí od 25 do 100 mPa.s, měřeno při $\eta = 10/s$ až od 3,0 do 12 mPa.s, měřeno při $\eta = 1000/s$.

17. Kompozice podle kteréhokoli z nároků 12 až 16, **vyznačující se tím**, že dále obsahuje kyselinu hyaluronovou nebo její farmaceuticky přijatelnou sůl, která má průměrnou molekulovou hmotnost v rozmezí 200000 až 1600000 g/mol, s výhodou 1300000 g/mol.

18. Kompozice podle nároku 17**, vyznačující se tím**, že dále obsahuje kyselinu hyaluronovou nebo její farmaceuticky přijatelnou sůl, která má průměrnou molekulovou hmotnost 1300000 g/mol a 300000 g/mol esterových derivátů kyseliny hyaluronové obecného vzorce IV při hmotnostní poměru v rozmezí 6:4, 7:3 nebo 8:2, pokud jde o množství esterového derivátu kyseliny hyaluronové nebo jeho farmaceuticky přijatelné soli, s výhodou 8:2.

19. Kompozice podle kteréhokoli z nároků 12 až 18, **vyznačující se tím**, že se jedná o sterilní a / nebo izotonický vodný roztok, s výhodou ve formě očních kapek nebo víceúčelového roztoku pro kontaktní čočky; olejový roztok, emulzi, s výhodou nanoemulzi obsahující micely nebo suspenzi.

20. Kompozice podle nároku 19, **vyznačující se tím**, že obsahuje pufr pro úpravu správného pH vybraný ze skupiny zahrnující tris (tris (hydroxymethyl) aminomethan), hydroxid sodný, histidin, tricin, lysin, glycin, serin, fosfát, acetátový, citrátový nebo borátový pufr, přičemž množství pufru je v rozmezí 0,025 mol/l až 1 mol/l, s výhodou v rozmezí 0,125 mol/l až 0,175 mo /l a/nebo obsahuje regulační činidlo osmotického tlaku, které je vybráno ze skupiny zahrnující sorbitol, mannitol, ethylenglykol, propylenglykol, dextrózu, trometamol (tris(hydroxymethyl)aminomethan) nebo tetralózu, přičemž množství regulačního činidla je v rozmezí 0,04 až 0,12 mol/l, s výhodou 0,08 mol/l a/nebo obsahuje farmaceuticky přijatelnou sůl vybranou ze skupiny zahrnující chlorid alkalických kovů nebo chlorid kovů alkalických zemin, s výhodou chlorid sodný, chlorid draselný, přičemž množství farmaceuticky přijatelné soli je v rozmezí 0,05 až 0,3 mol/l, s výhodou 0,15 mol/l.

21. Kompozice podle nároku 19, **vyznačující se tím**, že obsahuje kyselou složku, s výhodou kyselinu chlorovodíkovou, přičemž množství kyselé složky je v rozmezí 0,03 až 0,01 mol/l, s výhodou 0,025 mol/l.

22. Kompozice podle kteréhokoli z nároků 19 až 21, **vyznačující se tím**, že obsahuje

Lauryl hyaluronát sodný (HA C12)	0,10 až 0,6 hm. %
Kyselina chlorovodíková	0,01 obj. %
Chlorid sodný	0,2 hm. %
Chlorid draselný	0,14 hm. %
Trehalóza	3 hm. %
Tromethamol	0,12 hm. %
Přečištěná voda Q.S	250 ml.

22. Kompozice podle nároku 19 nebo 20, **vyznačující se tím**, že obsahuje

Lauryl hyaluronát sodný (HA-C12)	0,10 až 0,6 hm. %
Hyaluronát sodný	0,1 až 0,2 hm. %
Kyselina boritá	0,20 obj./obj. %
Chlorid sodný	0,58 hm. %
Chlorid draselný	0,14 hm. %
Trehalóza	3 hm. %
Tromethamol	0,5 hm.%
Přečištěná voda Q.S	do 100 ml.

23. Kompozice podle nároku 19 nebo 20, **vyznačující se tím**, že obsahuje

Lauryl hyaluronát sodný (HA-C12)	0,10 až 0,6 hm. %
Chlorid sodný	0,99 hm. %
Chlorid draselný	0,01 hm. %
sorbitol	5 hm.%
Tromethamol	1 hm.%
Hydrogenfosforečnan sodný	0,5 hm.%
Fosforečnan draselný	0,015 hm.%

Přečištěná voda Q.S	do 100 ml.

24. Kompozice podle kteréhokoli z nároků 19 až 23, **vyznačující se tím**, že obsahuje konzervační činidlo, s výhodou benzalkoniumchlorid, přičemž množství kyselé složky je v rozmezí 0,005 až 0,05 hm. %., s výhodou 0,01 hm. %.

25. Kompozice podle nároku 24, **vyznačující se tím**, že obsahuje

Lauryl hyaluronát sodný (HA-C12)	0,10 až 0,6 hm. %
Kyselina boritá	0,20 obj./obj. %
Chlorid sodný	0,58 hm. %
Dihydrogenfosforečnan sodný	0,15 hm. %
Trehalóza	3 hm. %
Tromethamol	1 hm.%
Chlorid benzalkonia	0,01 hm. %
Přečištěná voda Q.S	do 100 ml.

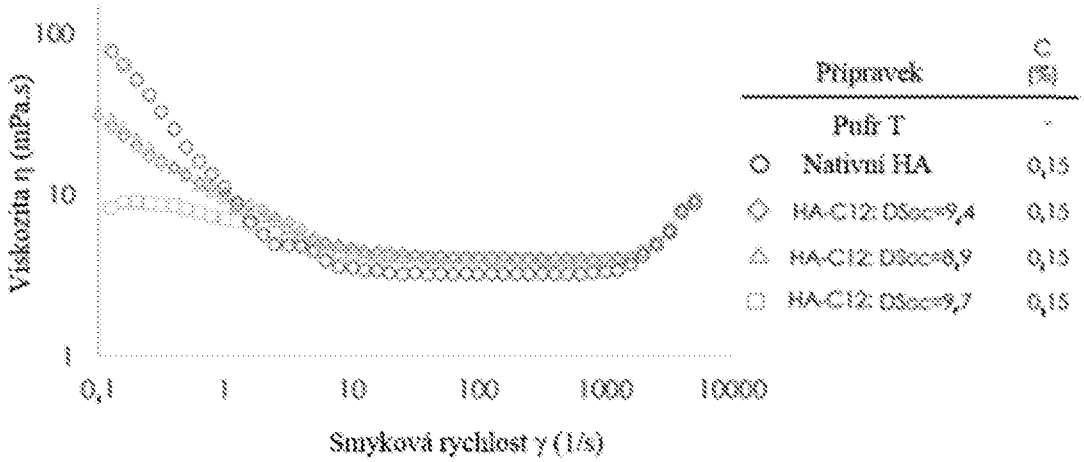
26. Kompozice podle nároku 24, **vyznačující se tím**, že obsahuje

Lauryl hyaluronát sodný (HA-C12)	0,10 až 0,6 hm. %
Chlorid sodný	0,9 hm. %
Trehalóza	2,8 hm. %
Mannitol	1 hm.%
Chlorid benzalkonia	0,01 hm.%
Přečištěná voda Q.S	do 100 ml.

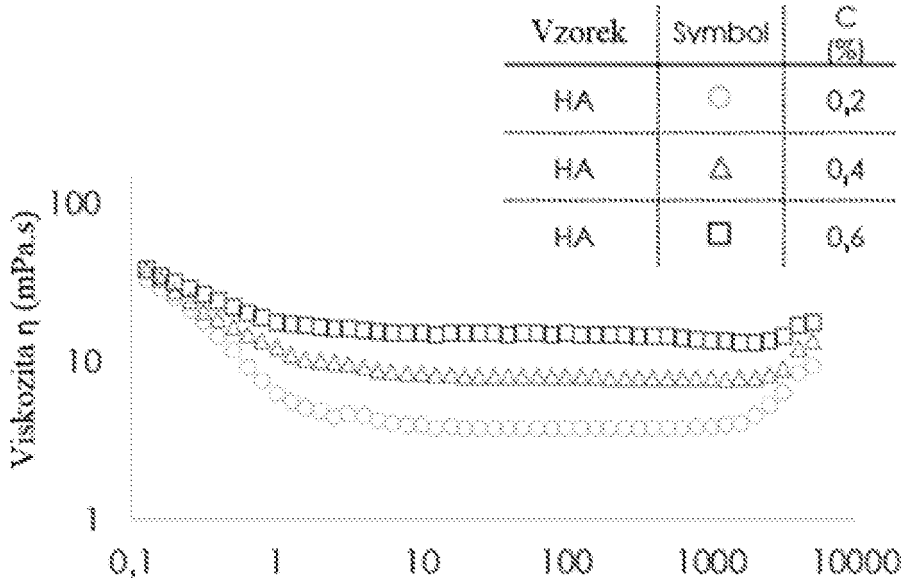
27. Kompozice podle kteréhokoli z nároků 12 až 26 pro použití v medicíně, s výhodou pro léčení nebo prevenci očních chorob nebo očních stavů, výhodněji suchých očních stavů; kosmetice nebo regenerativní medicíně.

11 výkresů

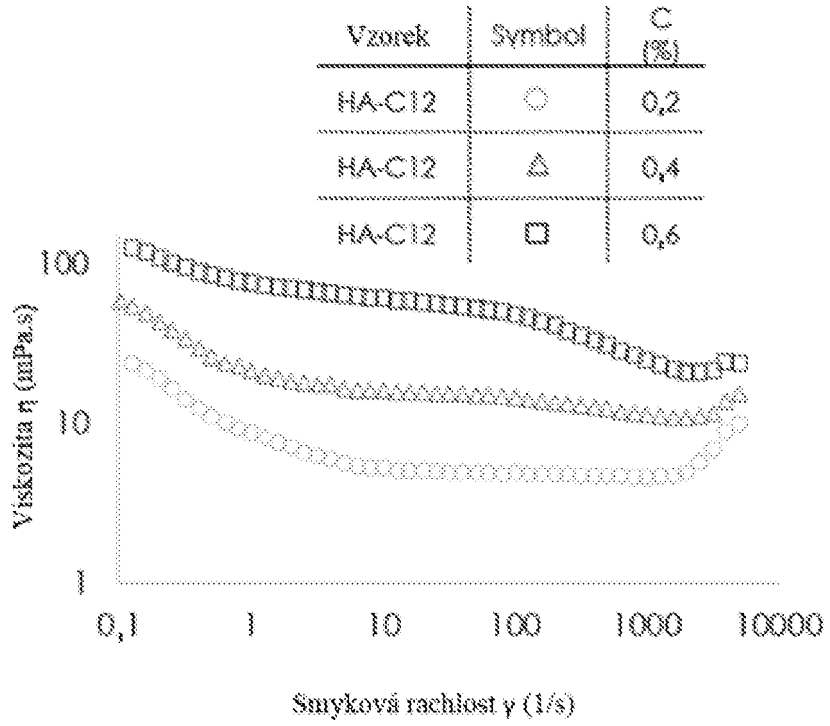
Výkresy



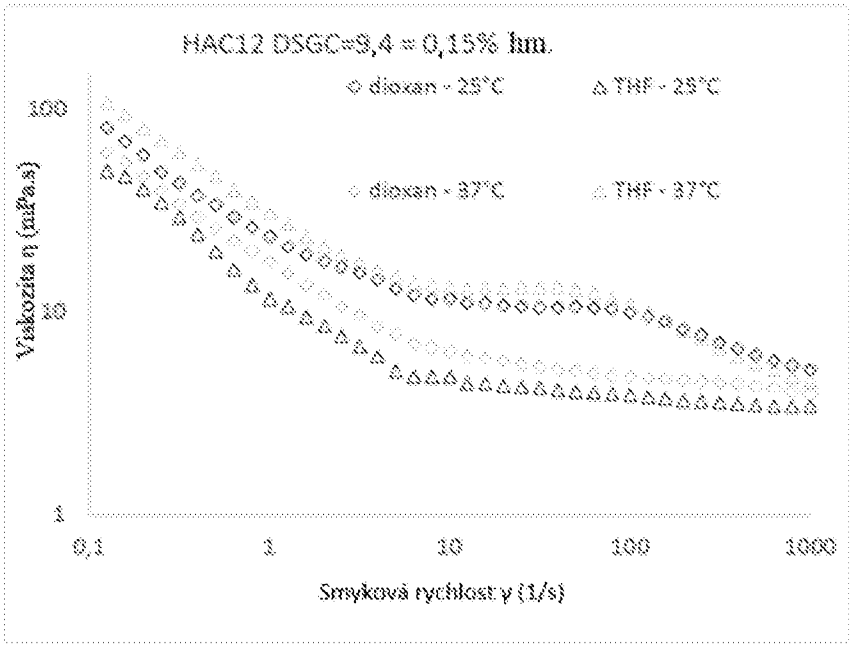
Obr. 1



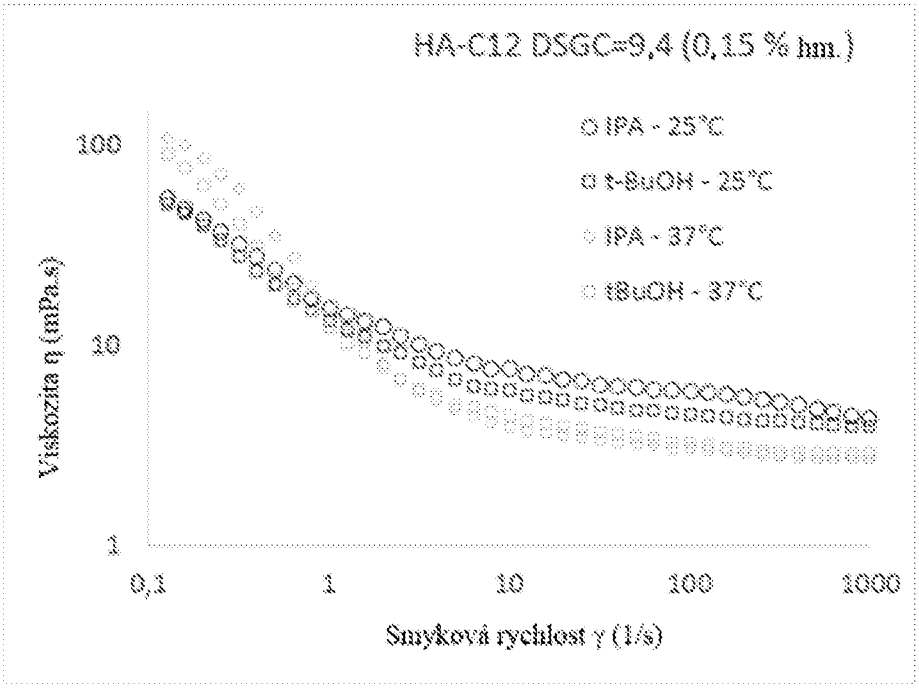
Obr. 2


Vzorek
Symbol
C (%)
HA-C12
0,2
HA-C12
0,4
HA-C12
0,6
100
10
1
Viskozita η (mPa.s)
0,1
1
10
100
1000
10000
Smyková rachlost γ (1/s)

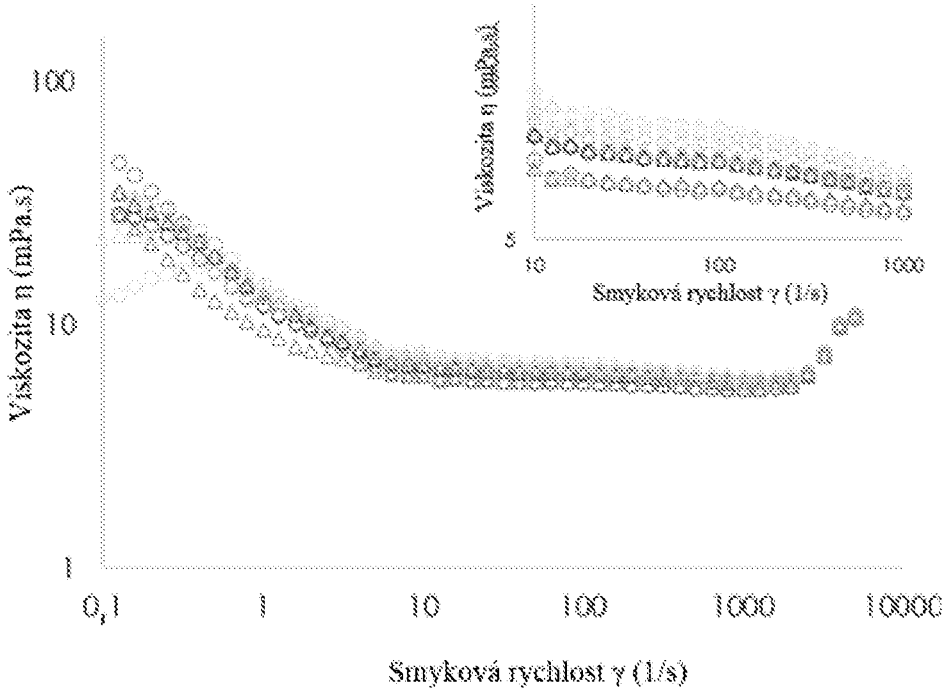
Obr. 3


HAC12 DSGC=9,4 = 0,15% hm.
dioxan - 25°C
THF - 25°C
dioxan - 37°C
THF - 37°C
100
10
1
Viskozita η (mPa.s)
0,1
1
10
100
1000
Smyková rychlost γ (1/s)

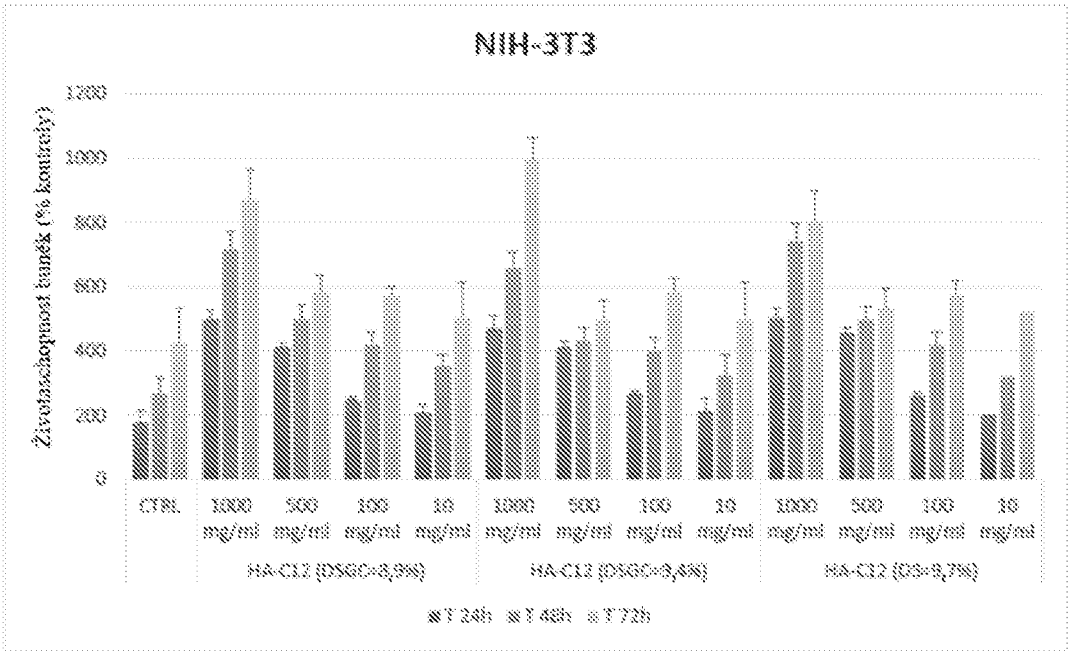
Obr. 4


HA-C12 DSGC=9,4 (0,15 % hm.)
IPA - 25°C
t-BuOH - 25°C
IPA - 37°C
tBuOH - 37°C
Viskozita η (mPa.s)
100
10
1
0,1
1
10
100
1000
Smyková rychlost γ (1/s)

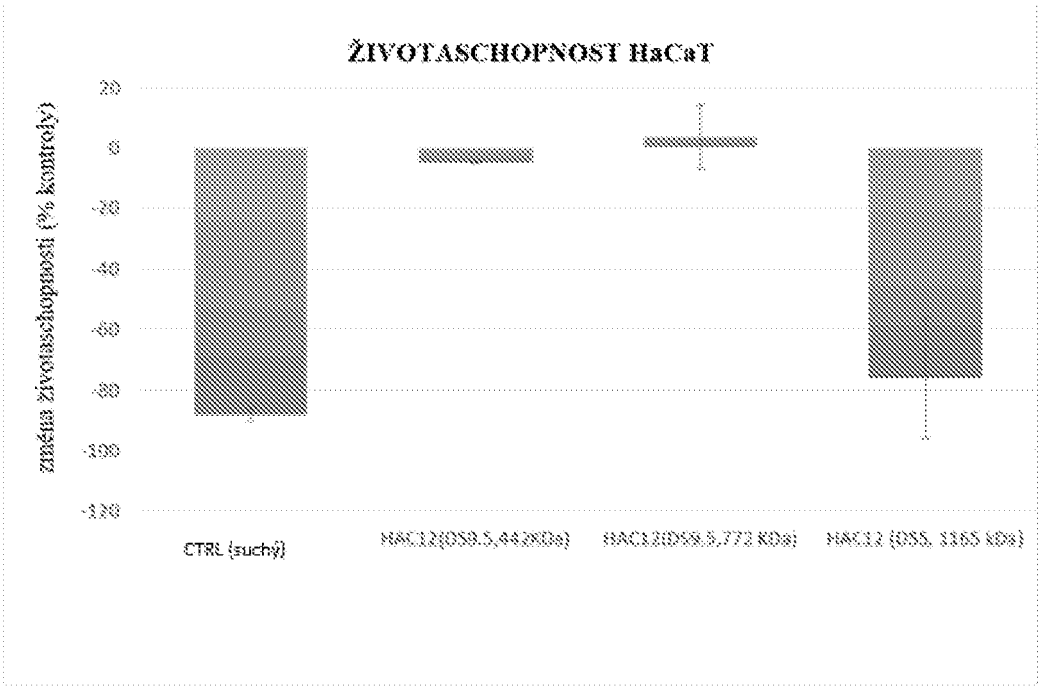
Obr. 5


Viskozita η (mPa.s)
100
10
1
0,1
1
10
100
1000
10000
Smyková rychlost γ (1/s)
Viskozita η (mPa.s)
5
10
100
1000
Smyková rychlost γ (1/s)

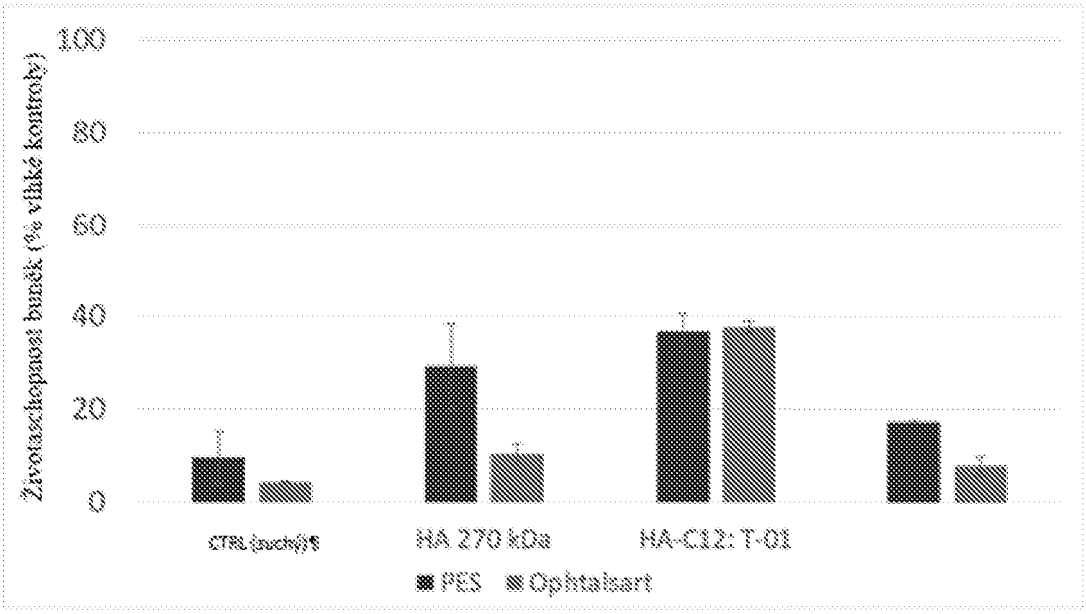
Obr. 6


NIH-3T3
Životaschopnost buněk (% kontroly)
1200
1000
800
600
400
200
0
CTRL
1000 mg/ml
500 mg/ml
100 mg/ml
10 mg/ml
1000 mg/ml
500 mg/ml
100 mg/ml
10 mg/ml
1000 mg/ml
500 mg/ml
100 mg/ml
10 mg/ml
HA-C12 (DSGC=8,9%)
HA-C12 (DSGC=8,4%)
HA-C12 (DS=8,7%)
T 24h
T 48h
T 72h

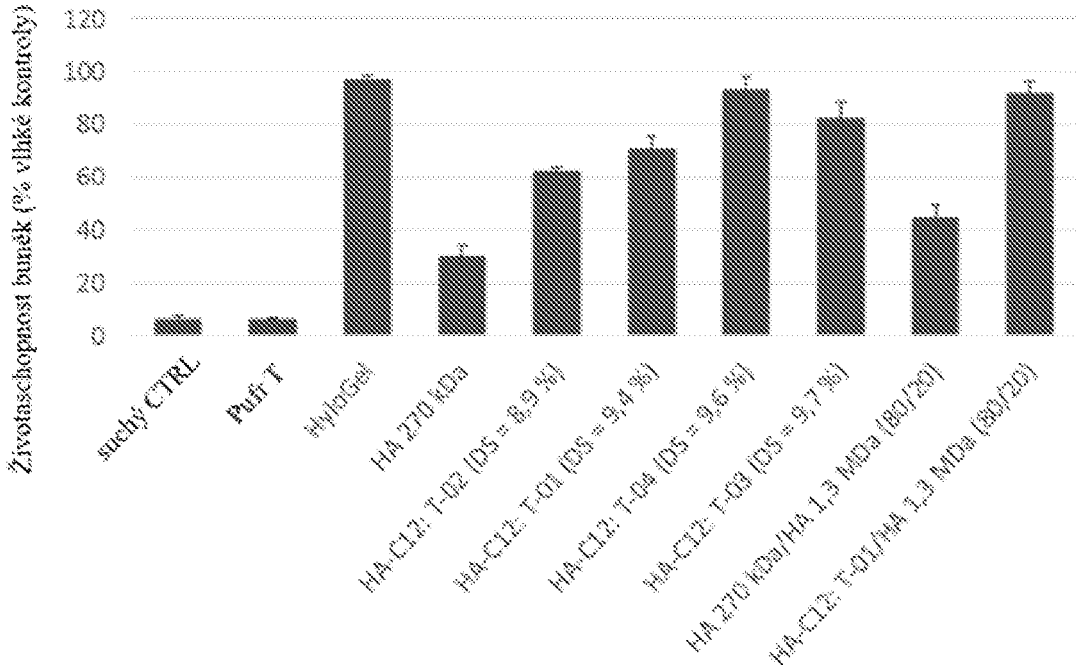
Obr. 7


ŽIVOTASCHOPNOST HaCaT
změna životaschopnosti (% kontroly)
20
0
-20
-40
-60
-80
-100
-120
CTRL (suchý)
HAC12(DS8.5,442KDa)
HAC12(DS8.9,772 KDa)
HAC12 (DS5, 1165 KDa)

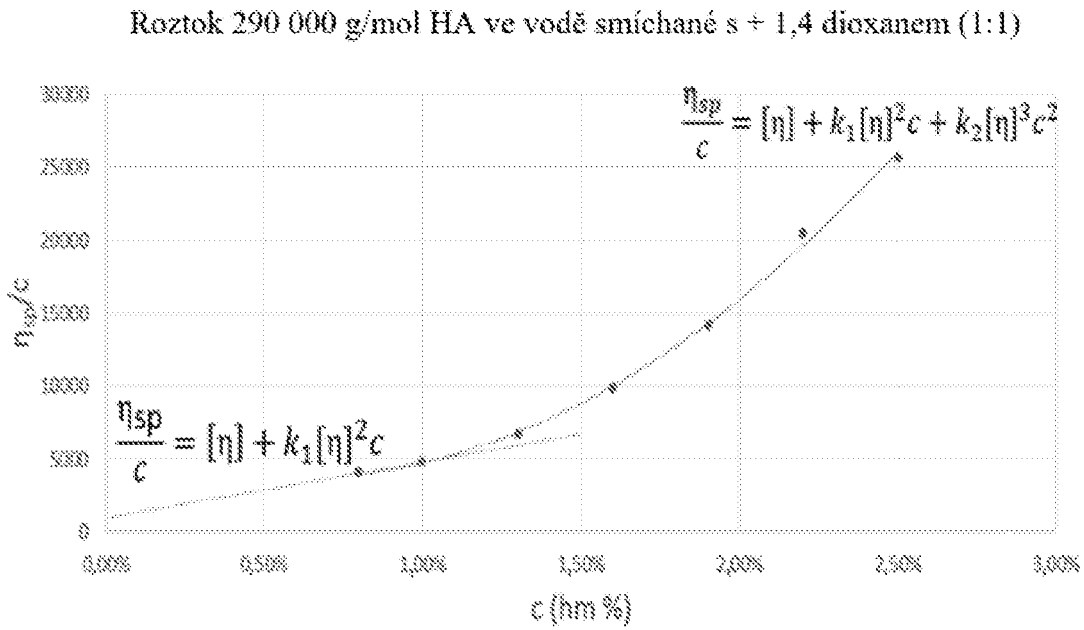
Obr. 8


Životaschopnost buněk (% vlhké kontroly)
100
80
60
40
20
0
CTRL (suchý)
HA 270 kDa
HA-C12: T-01
PES
Ophtalkart

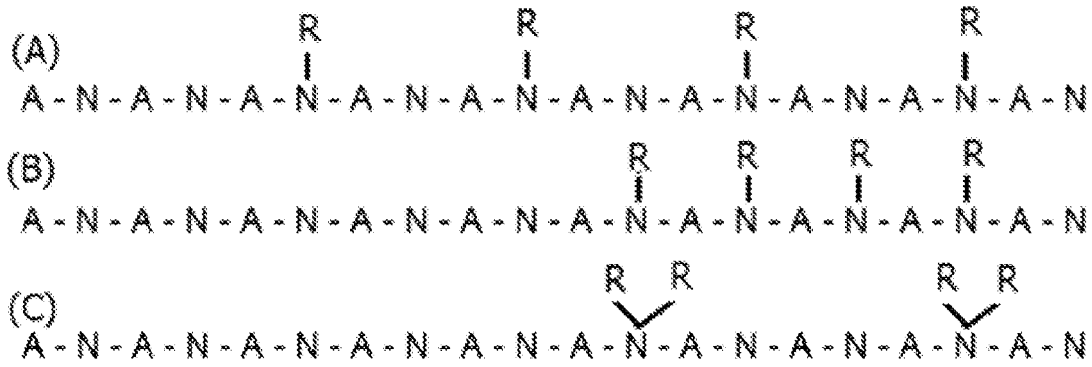
Obr. 9


Životaschopnost buněk (% vlhké kontroly)
120
100
80
60
40
20
0
suchý CTRL
Pufr T
HyloGel
HA 270 kDa
HA-C12: T-02 (DS = 8,9 %)
HA-C12: T-01 (DS = 9,4 %)
HA-C12: T-04 (DS = 9,6 %)
HA-C12: T-03 (DS = 9,7 %)
HA 270 kDa/HA 1,3 MDa (80/20)
HA-C12: T-01/HA 1,3 MDa (80/20)

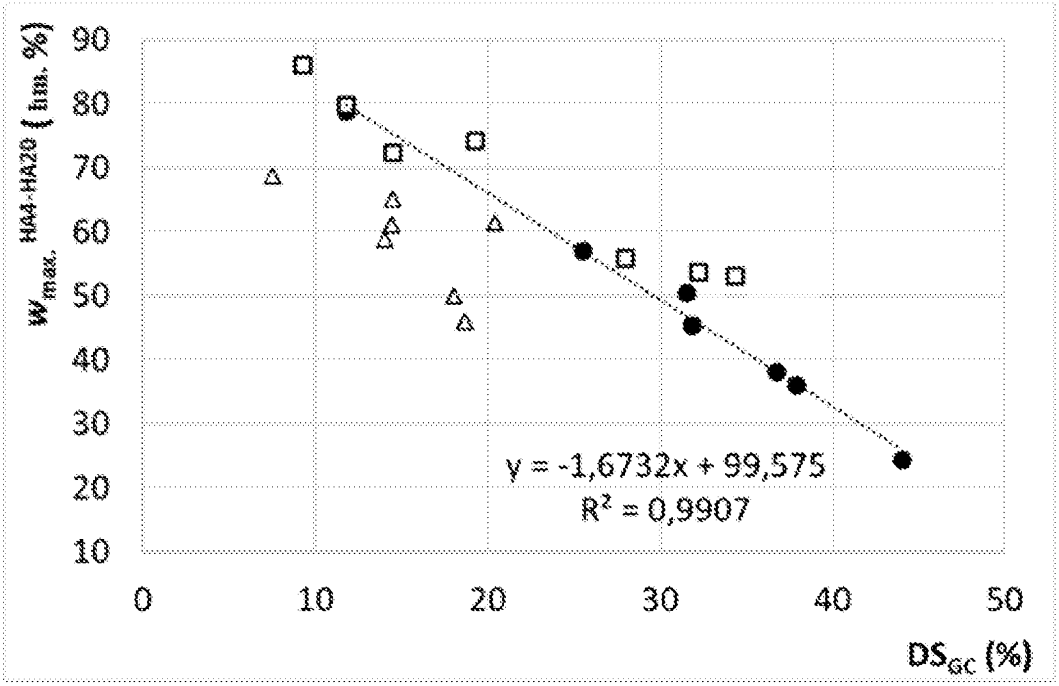
Obr. 10


Roztok 290 000 g/mol HA ve vodě smíchané s + 1,4 dioxanem (1:1)
$\frac{\eta_{sp}}{c} = [\eta] + k_1[\eta]^2 c + k_2[\eta]^3 c^2$
$\frac{\eta_{sp}}{c} = [\eta] + k_1[\eta]^2 c$
η_{sp}/c
0
5000
10000
15000
20000
25000
30000
0,00%
0,50%
1,00%
1,50%
2,00%
2,50%
3,00%
c (hm %)

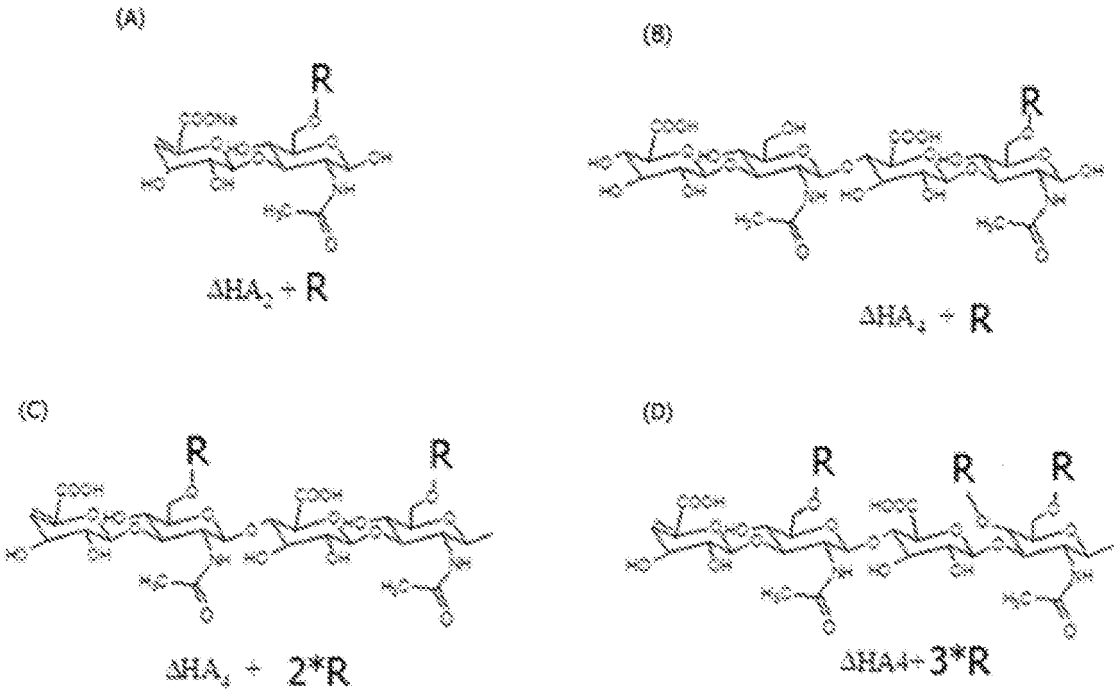
Obr. 11


(A)
A-N-A-N-A-N-A-N-A-N-A-N-A-N-A-N-A-N-A-N-A-N
R
(B)
A-N-A-N-A-N-A-N-A-N-A-N-A-N-A-N-A-N-A-N-A-N
R
(C)
A-N-A-N-A-N-A-N-A-N-A-N-A-N-A-N-A-N-A-N-A-N
R R

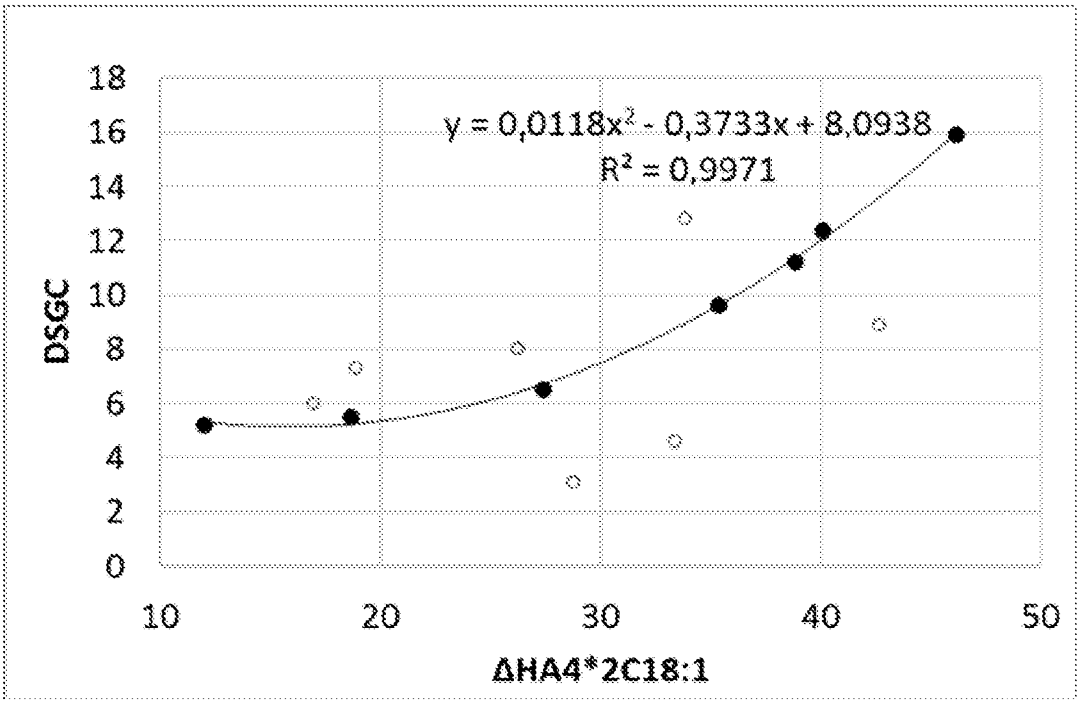
Obr. 12


$W_{max.\ HA4-HA20}$ (lim. %)
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
10
20
30
40
50
DS_{GC} (%)
y = -1,6732x + 99,575
R^2 = 0,9907

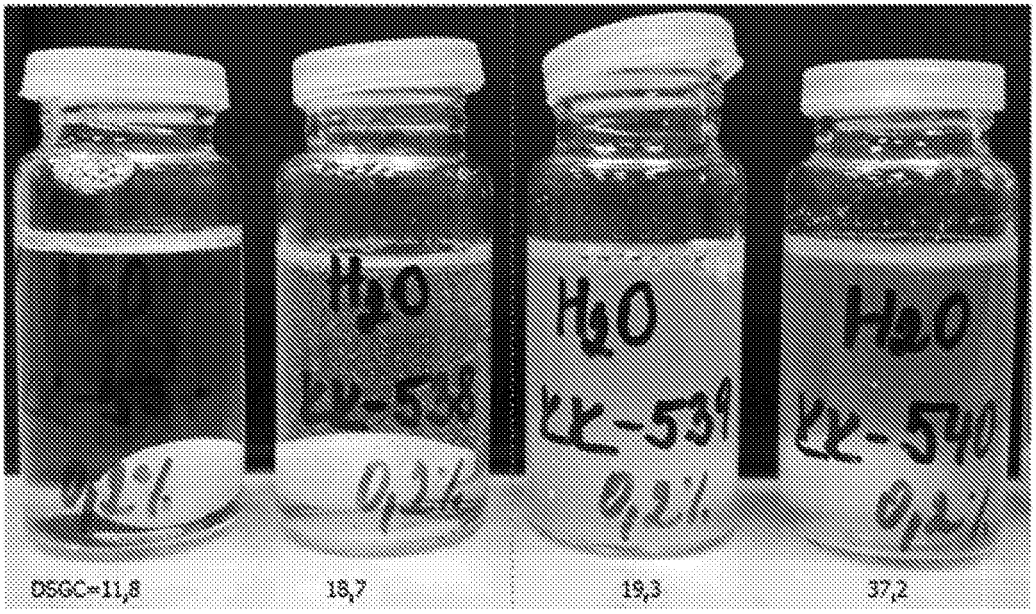
Obr. 13



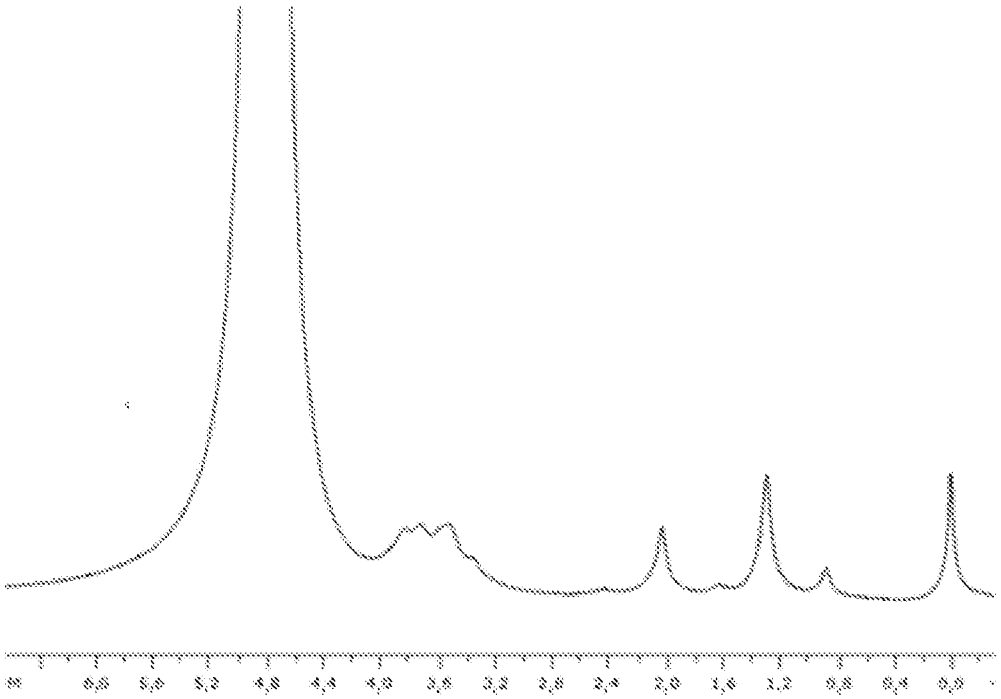
Obr. 14


y = 0,0118x² - 0,3733x + 8,0938
R² = 0,9971
DSGC
ΔHA4*2C18:1
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
10
20
30
40
50

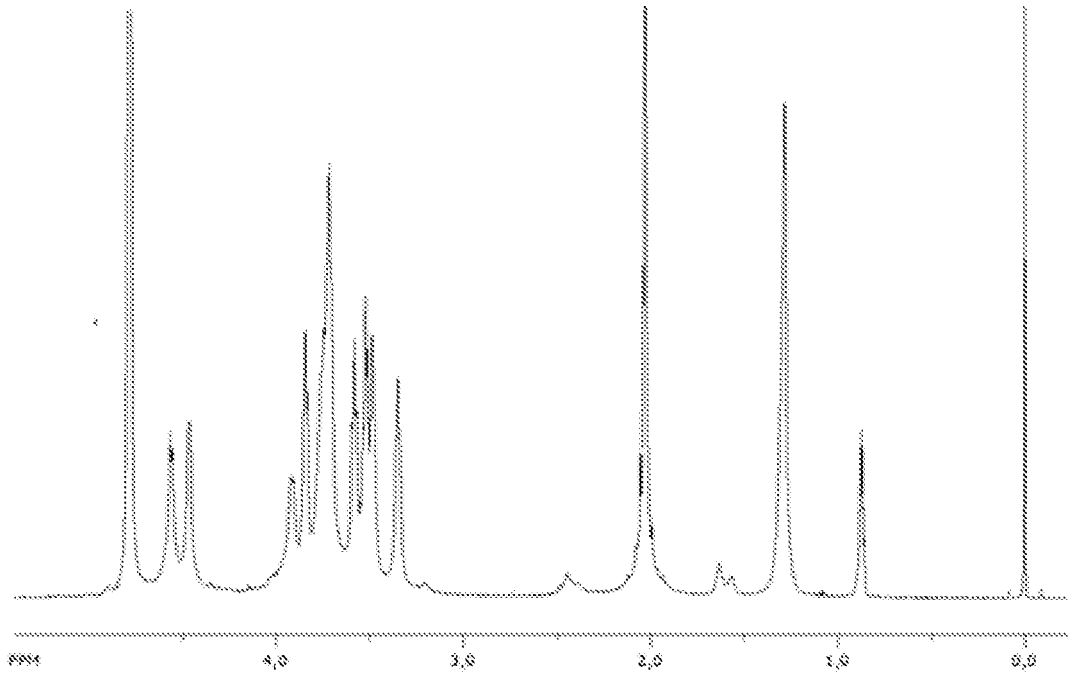
Obr. 15



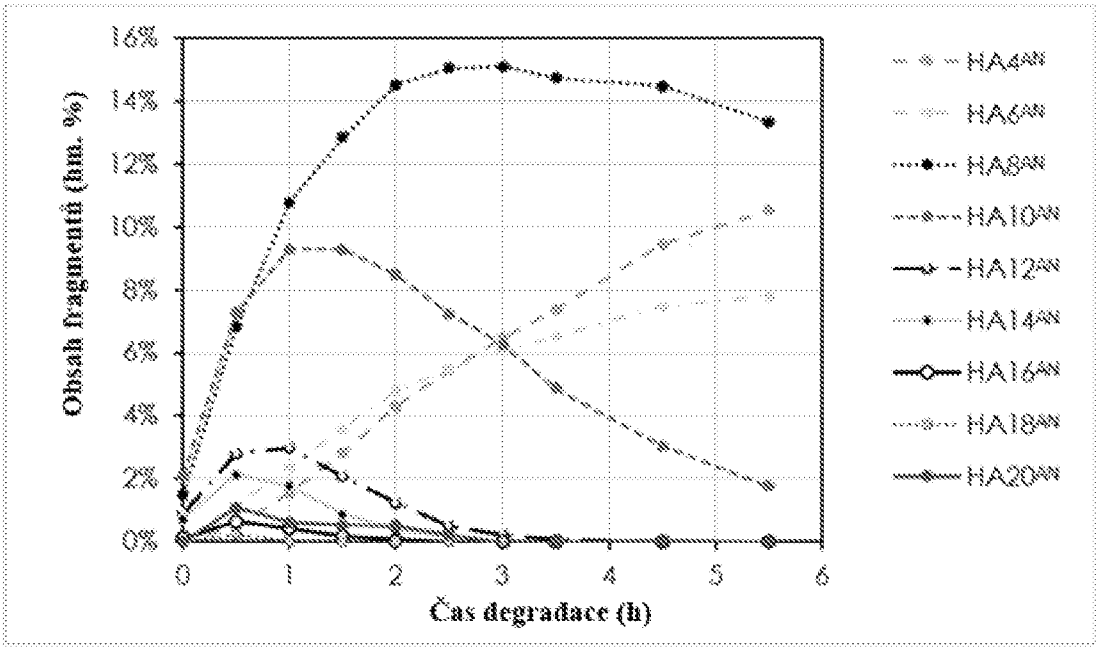
Obr. 16



Obr. 17


ppm
4,0
3,0
2,0
1,0
0,0

Obr. 18


Obsah fragmentů (hm. %)
16%
14%
12%
10%
8%
6%
4%
2%
0%
0
1
2
3
4
5
6
Čas degradace (h)
HA4AN
HA6AN
HA8AN
HA10AN
HA12AN
HA14AN
HA16AN
HA18AN
HA20AN

Obr. 19