

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

304 512

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

C08B 37/08 (2006.01)
A61K 31/728 (2006.01)
A61K 47/36 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2012-537**
(22) Přihlášeno: **08.08.2012**
(40) Zveřejněno: **19.03.2014**
(Věstník č. 12/2014)
(47) Uděleno: **30.04.2014**
(24) Oznámení o udělení ve věstníku: **11.06.2014**
(Věstník č. 24/2014)

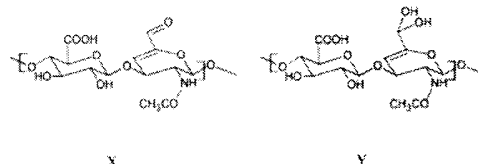
(56) Relevantní dokumenty:
Bo Jiang a kol.: Study on TEMPO-mediated selective oxidation of hyaluronan and the effects of salt on the reaction kinetics, Carbohydrate Research 327 (2000), str.155-461; Bin Ding a kol.: TEMPO-mediated selective oxidation of substituted polysaccharides-an efficient approach for determination of the degree of substitution at C-6, Carbohydrate Research 343 (2008), str.3112-3116.
CZ 302504 B6; CZ 302503 B6; WO 99/57158; US 2007/0149441 A1.

(73) Majitel patentu:
Contipro Biotech s.r.o., Dolní Dobrouč, CZ

(72) Původce:
Radovan Buffa, Humenné, SK
Petra Šedová, Česká Třebová, CZ
Lucie Wolfová, Opava, CZ
Ivana Basarabová, Medzilaborce, SK
Robert Pospíšil, Spojil, CZ
Martina Hašová, Letohrad, CZ
Kristina Nešporová, Brno, CZ
Vladimír Velebný, Žamberk, CZ

(74) Zástupce:
KANIA, SEDLÁK, SMOLA
Patentová a známková kancelář, Mgr. Martina
Dvořáková, Mendlovo nám. 1a, 603 00 Brno

je možné připravit síťované deriváty hyaluronanu. Popsané řešení dává významnou výhodu nejenom v oblasti nosičů biologicky aktivních látek, ale také ve tkáňovém inženýrství, kde je síťování s biologicky akceptovatelnými amino sloučeninami ve fyziologických podmínkách velmi žádané.



(54) Název vynálezu:
Derivát kyseliny hyaluronové, způsob jeho přípravy, způsob jeho modifikace a použití

(57) Anotace:
Řešení se týká přípravy a použití α,β -nenasyceného aldehydu hyaluronanu s dvojnou vazbou v polohách 4 a 5 a aldehydickou skupinou v poloze 6 glukosaminové části polysacharidu podle strukturního vzorce X nebo jeho hydratované formy podle strukturního vzorce Y. Způsob přípravy je založen na dehydrataci hyaluronanu s aldehydickou skupinou v poloze 6 glukosaminové části polysacharidu. Byly popsány dvě metody, a to dehydratace v roztoku, anebo zahřátí v suchém stavu bez přítomnosti rozpouštědel, bází nebo jiných aditiv. Tento derivát umožňuje stabilizovat konjugáty hyaluronanu s aminosloučeninami pomocí násobné vazby ze strany aldehydu, takže na takto modifikovaný hyaluronan je možné efektivně imobilizovat ve fyziologických podmínkách prakticky jakoukoliv sloučeninu obsahující amino skupinu. V případě použití diaminu nebo sloučenin případně polymerů s obsahem tří nebo víc aminoskupin,

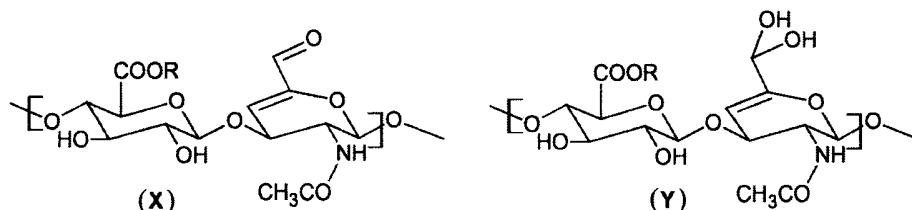
CZ 304512 B6

Derivát kyseliny hyaluronové, způsob jeho přípravy, způsob jeho modifikace a použitíOblast techniky

5

Vynález se týká přípravy a použití nového derivátu kyseliny hyaluronové s dvojnou vazbou v polohách 4 a 5 glukosaminové části polysacharidu a aldehydickou skupinou v poloze 6 glukosaminové části polysacharidu podle vzorce X, nebo jeho hydratované formy s geminálním diolem v poloze 6 glukosaminové části polysacharidu a zachovanou dvojnou vazbou v polohách 4 a 5 glukosaminové části polysacharidu podle vzorce Y.

10



kde R může být vodík, libovolný kation kovu nebo organický kation.

15

Tento nenasycený derivát aldehydu hyaluronanu je vhodný na vázání sloučenin obsahujících amino skupinu, a to ve fyziologických podmínkách. V případě, že vázaná sloučenina obsahuje dvě nebo víc amino skupin, lze připravit síťované materiály.

20

Dosavadní stav techniky

Kyselina hyaluronová je glykosaminoglykan složený ze dvou opakujících se jednotek β -(1,3)-D-glukuronové kyseliny a β -(1,4)-N-acetyl-D-glukosaminu.

25

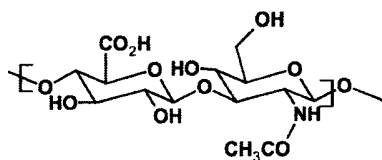


Schéma 1 Kyselina hyaluronová

30

Vyznačuje se velkou molekulovou hmotností $5 \cdot 10^4$ až $5 \cdot 10^6$ g.mol⁻¹, která závisí na způsobu izolace a výchozím materiálu. Tento značně hydrofilní polysacharid je ve vodě rozpustný ve formě soli v celé šíři pH. Tvoří součást pojivových tkání, kůže, synoviální tekutiny kloubů, hraje významnou roli v řadě biologických procesů jako hydratace, organizace proteoglykanů, diferenciacce buněk, proliferace a angiogenese. Protože je tento polymer tělu vlastní a tudíž biodegradovatelný, stává se vhodným substrátem pro tkáňové inženýrství, nebo jako nosič biologicky aktivních látek.

35

Modifikace kyseliny hyaluronové na HA-aldehyd

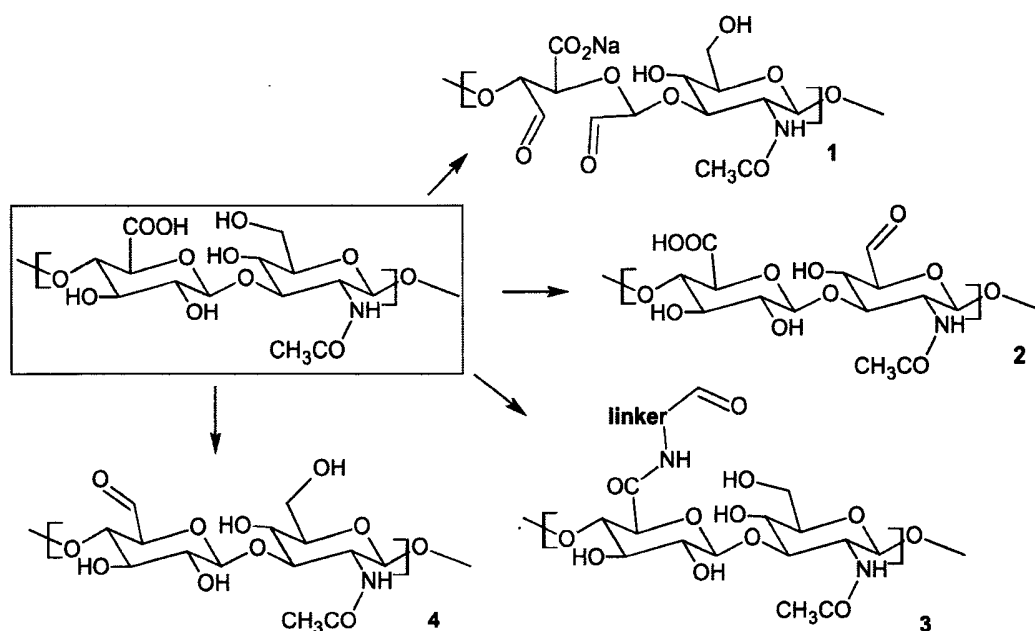
40

HA-aldehyd se nejčastěji připravuje selektivní oxidací nativního hyaluronanu. Oxidace polysacharidů je proces, ve kterém dochází ke změně oxidačního stupně funkčních skupin polysacharidu. V případě vzniku aldehydu, dochází ke zvýšení oxidačního stavu formálně o jeden stupeň. Často dochází také ke vzniku karboxylových kyselin (oxidace o dva stupně), které mohou být

vedlejším produktem oxidace na aldehyd. V případě kyseliny hyaluronové je známo několik přístupů k přípravě hyaluronanu s navázanou aldehydickou skupinou (HA–aldehyd). Tyto deriváty hyaluronanu jsou jedním z nejvíce využívaných prekurzorů pro přípravu bio materiálů z chemicky modifikovaného hyaluronanu. Hlavním důvodem je, že aldehydické skupiny jsou stabilní ve fyziologických podmínkách, ale přitom ještě dost reaktivní pro rychlou a efektivní chemickou reakci například s aminy.

Hlavní způsoby přípravy HA–aldehydů popisuje následující schéma 2.

Schéma 2



Zdaleka nejčastějším způsobem zavedení aldehydické skupiny na hyaluronan je oxidace pomocí NaIO_4 ve vodě (Schéma 2, struktura 1) (Spiro Robert a kol.: WO 99/01 143, Aeschlimann Daniel, Bulpitt Paul: WO 2007/01 49 441). Tato modifikace vede k otevření sacharidického cyklu za vzniku dvou aldehydických skupin.

Další metodou je oxidace primární hydroxylové skupiny v poloze 6–glukosaminové části polysacharidu na aldehyd (Schéma 2, struktura 2) pomocí systému $\text{NaClO}/\text{TEMPO}$ ve vodě (Buffa R., Kettou S., Velebný V. a kol. WO 2011/069 475) nebo pomocí Dess–Martin periodátu v DMSO (Buffa R., Kettou S., Velebný V. a kol. WO 2011/069 474). Na rozdíl od struktury 1, aldehydická skupina v této poloze zachovává rigiditu polymerního řetězce.

Zajímavým způsobem zavedení aldehydické skupiny na hyaluronan je možnost navázat tuto skupinu přes linker (Schéma 2, struktura 3). Zde jsou možné různé přístupy, například zavedení vicinálního diolu na karboxylovou skupinu hyaluronanu přes amid a následná oxidace diolu s NaIO_4 , která dává aldehyd vázaný přes linker (Hilborn J. a kol.: WO 2010/138 074). Tato strategie může mít výhodu v tom, že aldehydická skupina je stericky přístupnější pro případné další modifikace.

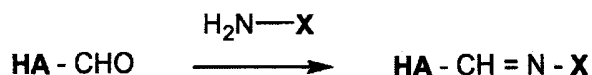
V další přihlášce vynálezu (Aeschlimann Daniel a Bulpitt Paul: WO 200701 49 441) byla zmíněná možnost připravit HA–aldehyd pomocí redukce karboxylové skupiny hyaluronanu s použitím činidla 9–BBN (9–borabicyclo[3,3,1]nonan). Výsledkem je hyaluronan s aldehydickou skupinou v poloze 6 glukuronové části polysacharidu (Schéma 2, struktura 4).

Kondenzace HA-aldehydu s N-nukleofily

Hlavní aplikační výhodou kondenzace HA-aldehydů s N-nukleofily (aminy) je, že může být uskutečněna ve fyziologických podmínkách. Obecně tuto reakci popisuje následující schéma 3:

5

Schéma 3



10

Hydrolytická stabilita vzniklého iminového $-\text{CH}=\text{N}-$ spojení je do značné míry závislá na charakteru skupiny **X**. Pokud je **X** atom, který nanese volný elektronový pár, například $-\text{CH}_2-$ skupina, vzniklá hydrolyticky velmi nestabilní imin $\text{HA}-\text{CH}=\text{N}-\text{CH}_2-$. Pokud je **X** atom, který nese volný elektronový pár, vzniká hydrolyticky stabilnější konjugát (oxim $\text{HA}-\text{CH}=\text{N}-\text{O}-$, hydrazon $\text{HA}-\text{CH}=\text{N}-\text{NH}-$, semikarbazon $\text{HA}-\text{CH}=\text{N}-\text{NH}-\text{CO}-$ a podobně), kde je iminová vazba $-\text{CH}=\text{N}-$ stabilizována konjugací s volným elektronovým párem atomu **X**. Je známo mnoho patentů popisujících vázání aminů obecného vzorce $\text{NH}_2-\text{X}-$, kde **X** je dusík nebo kyslík, na hyaluronan oxidovaný na aldehyd, a kde finální materiály vznikají při fyziologicky akceptovatelných podmínkách, takže jsou použitelné na širokou škálu biomedicínských aplikací. Z novějších lze zmínit patent (Bergman K., a kol: WO 2009/108 100), kde se obecně nárokují materiály na bázi kyseliny hyaluronové modifikované elektrofilními skupinami jako je aldehyd, maleinimid, akrylát, akrylamid, metakrylát, metakrylamid, vinylsulfon a aziridin. Jako síťovací nukleofily jsou zmíněny hydrazidy, semikarbazidy, thiosemikarbazidy, aminooxy, thiolové a β -aminothiolové skupiny. Podobná je další přihláška vynálezu (Hilborn J. a kol: WO 2010/138 074) popisující vázání N, S nebo současně N a S nukleofilů přímo na hyaluronan oxidovaný na aldehyd pomocí oxidace s jodistanem sodným.

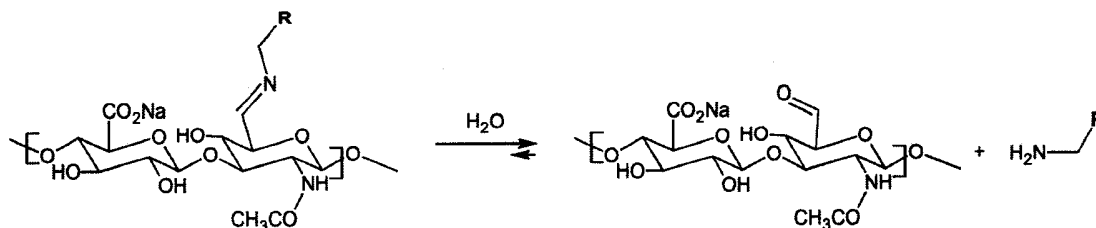
20

25

30

Pokud je **X** alifatický uhlík (Schéma 3), je obecně známo, že vzniklé iminy nejsou hydrolyticky stabilní (vazba $-\text{C}=\text{N}-$ nemá partnera na konjugaci) a vratně přecházejí na výchozí aldehyd a amin (Buffa R., Kettou S., Velebný V. a kol. WO 2011/069 474). Situaci popisuje Schéma 4.

Schéma 4

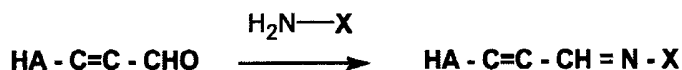


35

Další možností, jak stabilizovat zmíněné iminy, je rozšířit konjugaci z opačné strany, čili ze strany aldehydu, to znamená poskytnout vzniklému iminu konjugaci s násobnou $-\text{C}=\text{C}-$ vazbou. Obecnou reakci popisuje Schéma 5.

40

Schéma 5

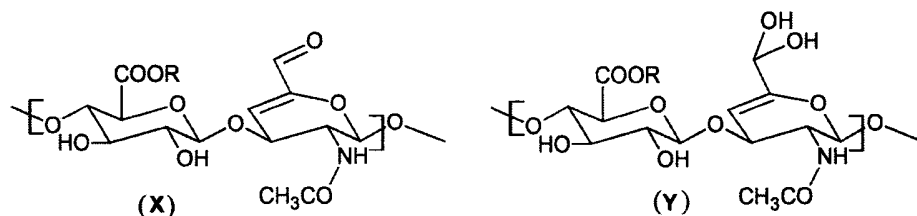


45

Tento přístup je v literatuře zmíněn jen velmi zřídka, a to například pro reakce aromatických aldehydů s aminy za vzniku tzv. Schiffových bází, kde je stabilita podpořena konjugací s aromatickým cyklem $\text{Ar-CHO} + \text{H}_2\text{N-R} \rightarrow \text{Ar-CH=N-R}$. V případě polysacharidů nebo polymerů obecně však nebyl nalezen analogický příklad. U této modifikace polymerů by bylo nutné zavést na aldehyd aromatickou skupinu nebo obecně nějaké konjugované násobné vazby přes linker, což je technologická komplikace a není zaručena biokompatibilita materiálu. Tento způsob však otevírá i další potenciální komplikaci. V případě přítomnosti aromatického systému nebo více konjugovaných násobných vazeb už může materiál absorbovat ve viditelné oblasti, takže látka bude barevná, což obecně není žádoucí (možná fotosenzitivita, komplikace v analýze při *in vitro* studiích).

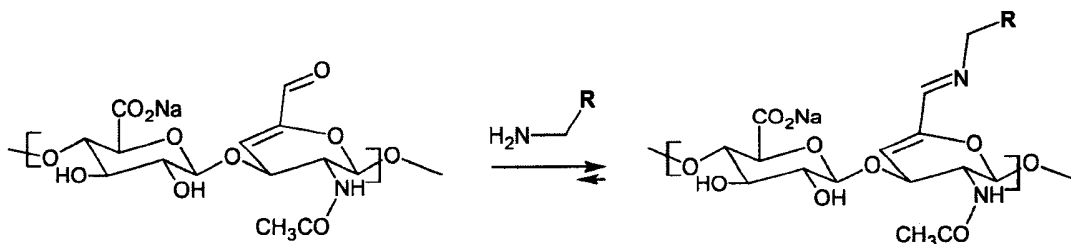
Podstata vynálezu

Předmětem vynálezu je kyselina hyaluronová strukturního vzorce **X** nebo **Y**, která má modifikované některé glukosaminové cykly polysacharidu s dvojnou vazbou v polohách 4 a 5, a současně je přítomna aldehydická skupina, respektive geminální diol (struktura **Y**) v poloze 6 glukosaminové části polysacharidu



kde R může být vodík, libovolný kation kovu nebo organický kation. Neomezujičím příkladem R je například kation sodíku, draslíku, vápníku nebo organický kation typu tetrabutylamonium nebo protonizovaný triethylamin. Tento derivát má s výhodou molekulovou hmotnost v rozsahu 1×10^3 až $5 \times 10^5 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$.

Toto řešení umožňuje stabilizovat konjugáty hyaluronanu s aminosloučeninami pomocí násobné vazby ze strany aldehydu, takže na takto modifikovaný hyaluronan je možné vázat ve fyziologických podmínkách prakticky jakoukoliv sloučeninu obsahující amino skupinu.



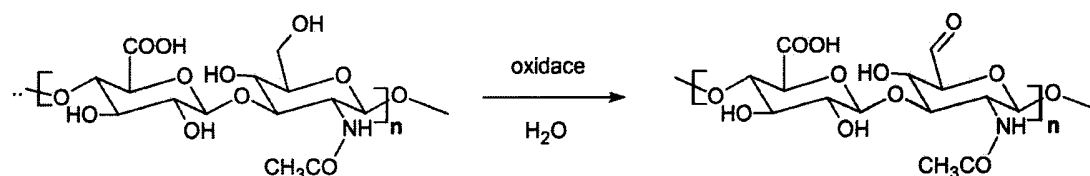
Toto je významný rozdíl oproti nasyceným aldehydům hyaluronanu, které dokážou ve fyziologických podmínkách pevně vázat sloučeniny obecného vzorce $\text{H}_2\text{N-X-}$, kde **X** je atom nesoucí volný elektronový pár, obvykle kyslík nebo dusík. Jelikož jen málo přírodních látek obsahuje seskupení $\text{H}_2\text{N-X-}$, dává řešení popsané v tomto vynálezu velkou výhodu nejenom jako potenciální nosič biologicky aktivních látek, ale taky v tkáňovém inženýrství, kde se velmi často používají deriváty hyaluronanu síťované ve fyziologických podmínkách s biologicky akceptovatelnými amino sloučeninami.

Dále se vynález týká způsobu přípravy derivátu strukturního vzorce **X** nebo **Y**, kde se nejprve oxiduje kyselina hyaluronová na HA-aldehyd v poloze 6 glukosaminové části (dále v textu ozna-

čováno jako Krok 1), a potom se HA–aldehyd dehydratuje buď v roztoku, nebo jednoduchým zahřátím bez přítomnosti rozpouštědel, báží nebo jiných aditiv (dále v textu označováno jako Krok 2). Tyto dva kroky jsou detailněji rozebrány níže:

5 Krok 1:

Selektivní oxidace primární hydroxylové skupiny kyseliny hyaluronové v poloze 6 glukosaminové části polysacharidu na aldehyd. Reakce lze provést například použitím oxidačního systému 2,2,6,6-tetramethyl-1-piperidinyloxyl radikálu R^1 -TEMPO / NaClO ve vodě, kde R^1 je vodík nebo skupina *N*-acetyl:



Tento krok probíhá s výhodou ve vodě při teplotě -5 až 10 °C, molární množství NaClO je v rozmezí 0,05 až 0,7 eq. a molární množství R^1 -TEMPO je v rozmezí 0,005 až 0,2 eq. vzhledem k dimeru kyseliny hyaluronové. Východí kyselina hyaluronová může mít molekulovou hmotnost v rozsahu 1×10^4 až 5×10^6 g.mol $^{-1}$.

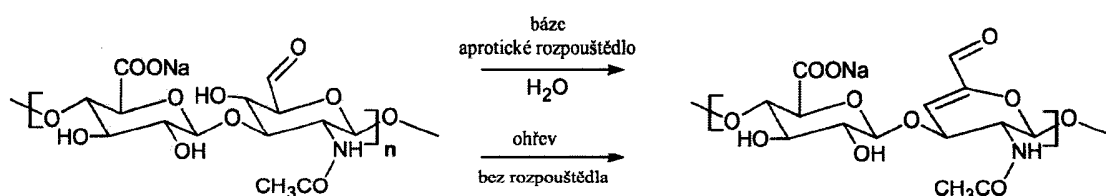
Krok 2:

20

možnost 1: Dehydratace HA–aldehydu v polárním aprotickém rozpouštědle a vodě při teplotě 30 až 80 °C, s výhodou při 50 až 60 °C, nebo

25

možnost 2: Zahřátí čistého nasyceného HA–aldehydu v suchém stavu na teplotu 50 až 100 °C, s výhodou na 70 až 80 °C.



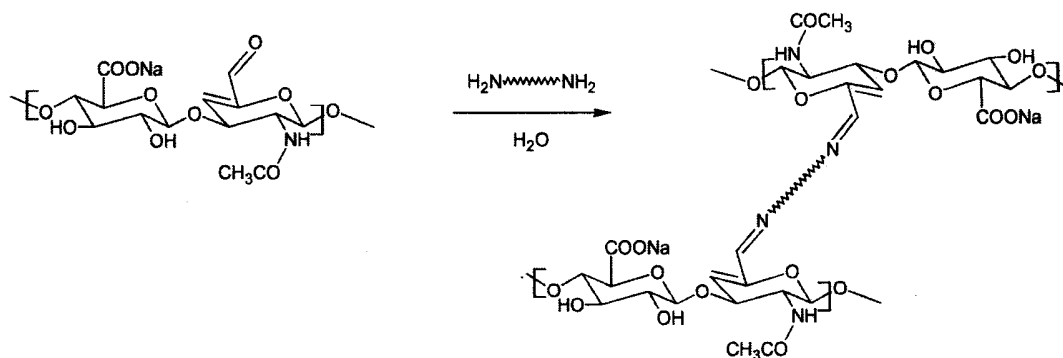
První možnost je dehydratace ve vodně–organickém prostředí, kde organické rozpouštědlo je mísitelné s vodou a objemový poměr rozpouštědlo/voda je v rozsahu 3/1 až 1/2. S výhodou lze v tomto kroku použít báze s omezenými nukleofilními vlastnostmi, například organické báze, např. triethylamin nebo *N*-diisopropyl-*N*-ethylamin, nebo anorganické báze, např. Ca(OH) $_2$. Množství báze v reakci je 0,01–20 ekvivalentů přepočteno na dimer hyaluronanu, s výhodou 5 až 10 ekvivalentů. Báze může podporovat eliminaci tím, že odštěpí proton v alfa poloze aldehydu (poloha 5 cyklu) a vzniklý karbanion eliminuje hydroxy skupinu v poloze 4 za vzniku násobné vazby. Jako organická rozpouštědla je možné použít aprotická polární rozpouštědla mísitelná s vodou, s výhodou DMSO nebo sulfolan. Reakce s výhodou probíhá 12 až 150 hodin.

Druhá, technologicky velmi atraktivní možnost, jak uskutečnit krok 2, je zahřívání východí nasycený aldehyd v suchém stavu bez přítomnosti jakýchkoliv aditiv na vyšší teplotu, s výhodou na teplotu 70 až 80 °C po dobu 12 hodin až 10 dnů, s výhodou 4 až 5 dnů.

Vynález se dále týká použití nenasyčeného HA–aldehydu pro vázání aminů. Konkrétněji se vynález týká způsobu modifikace derivátu kyseliny hyaluronové, podle vzorce X nebo Y, kde derivát reaguje s aminem obecného vzorce H $_2$ N- R^2 , kde R^2 je alkylový, aromatický, heteroaromatický,

lineární nebo rozvětvený řetězec $C_1 - C_{30}$, volitelně s obsahem N, S nebo O atomů. Uvedeným aminem může být například aminokyselina, peptid nebo polymer, který obsahuje volnou amino skupinu, přičemž takovým polymerem může být například deacetylovaná kyselina hyaluronová, kyselina hyaluronová s navázanou amino skupinou přes linker, nebo želatina, nebo jiný biologicky akceptovatelný polymer. Množství aminu, aminokyseliny, peptidu nebo volných amino skupin polymeru je s výhodou v rozmezí 0,05 až 2 ekvivalenty vzhledem k dimeru hyaluronanu.

Na přípravu těchto konjugátů nejsou nutné žádné specifické podmínky. Reakce může probíhat ve vodě, ve fosfátovém pufru nebo v systému voda–organické rozpouštědlo při teplotě v rozmezí 20 až 60 °C po dobu 10 minut až 150 h. Organické rozpouštědlo může být vybráno ze skupiny zahrnující s vodou mísitelné alkoholy, zejména isopropanol nebo etanol, a s vodou mísitelná polární aprotická rozpouštědla, zejména dimethylsulfoxid, přičemž obsah vody ve směsi je minimálně 50 % objemových. Reakce běží hladce ve fyziologických podmínkách, například ve fosfátovém pufru při pH = 7,4 a teplotě 37 °C, se širokou škálou různých aminů, počínaje jednoduchými aminokyselinami a složitými peptidy konče. V těchto podmínkách je také možné bez problémů vázat hydraziny, hydroxylaminy, hydrazidy, semikarbazidy nebo tiosemikarbazidy. Pokud jsou vázány sloučeniny obsahující dvě nebo více aminoskupin, je možné připravit nerozpustné síťované deriváty se širokou škálou viskoelastických vlastností.



20

Vyšší stabilita vazby aminu a nenasyceného HA–aldehydu v porovnání s jeho nasyceným analogem umožňuje připravit stabilnější a lépe prosítované nerozpustné biomateriály založené na hyaluronanu. Podrobněji je toto tvrzení popsáno v části Příklady provedení vynálezu, příklad 21, kde se porovnává nasycený a nenasycený derivát HA–aldehydu s podobným stupněm substituce a molekulovou hmotností z hlediska finálních reologických vlastností po síťování s deacetylovaným hyaluronanem.

Oproti analogům zmíněným v části „Dosavadní stav techniky“ je navržený způsob modifikace výhodnější v tom, že umožňuje pevněji vázat na kyselinu hyaluronovou ve fyziologických podmínkách podstatně širší škálu sloučenin obsahujících aminoskupinu. Tato skutečnost je velkou výhodou pro aplikaci hlavně v tkáňovém inženýrství, kde lze použít mnoho biokompatibilních síťovacích amino–linkerů ve fyziologických podmínkách i v přítomnosti živých buněk. Modifikované deriváty lze použít například pro přípravu síťovaných materiálů a hydrogelů, pro přípravu materiálů pro tkáňové inženýrství nebo pro biomedicínské aplikace. Na síťování lze použít i polysacharidy nebo obecně polymery, které obsahují amino skupiny. Také v oblasti nosičů biologicky aktivních látek lze popsat vynález s výhodou použít. Navržený způsob umožňuje imobilizovat na hyaluronan širší škálu biologicky aktivních aminů (např. peptidů), které pak mohou být přirozeně uvolněny v nativní (aktivní) podobě. Bylo zjištěno, že při nižším pH je vazba amin – nenasycený HA–aldehyd hydrolyticky méně stabilní, takže lze připravené konjugáty využít také jako pH responsivní biomateriály (nosiče, gely ...). Bylo prokázáno, že samotný nenasycený HA–aldehyd není cytotoxický, takže jeho konjugáty jsou vhodným kandidátem pro různé biomedicínské aplikace. Ačkoli byl odborník v oboru mohl očekávat, že konjugace ze strany aldehydu s $C=C$ násobnou vazbou povede ke zvýšené toxicitě, protože například akrolein $CH_2=CH-CHO$ je silně toxická a dráždivá látka, není tomu tak. Derivát podle vynálezu má dvojnou vazbu přímo

45

ve skeletu polymeru (bez linkeru) a výsledný substrát nevykázal toxické vlastnosti. Deriváty podle vzorce X nebo Y lze použít pro přípravu materiálů s antirakovinovým účinkem, jako nosičů biologicky aktivních látek v kosmetice a farmacii nebo jako nosičů biologicky aktivních látek s kontrolou uvolňování pomocí změny hodnoty pH.

5

Realizace řešení popsaného v tomto vynálezu není technologicky komplikovaná a nevyžaduje použití drahých chemikálií, rozpouštědel nebo izolačních postupů.

10 Přehled obrázku na výkrese

Obrázek 1 znázorňuje elastický materiál připravený podle příkladu 20.

15 Příklady provedení vynálezu

DS = stupeň substituce = $100 \% \cdot (\text{molární množství navázaného substituentu nebo modifikovaného dimeru}) / (\text{molární množství všech dimerů polysacharidu})$

20 Zde používaný výraz ekvivalent (eq) se vztahuje na dimer kyseliny hyaluronové, není-li uvedeno jinak. Procenta se uvádějí jako hmotnostní procenta, pokud není uvedeno jinak.

Molekulová hmotnost výchozí kyseliny hyaluronové (zdroj: CPN spol. s r.o., Dolní Dobrouč, (ČR) je hmotnostně střední a byla stanovena metodou SEC-MALLS.

25

Příklad 1 Příprava HA-aldehydu oxidovaného v poloze 6-glukosaminové části.

Oxidace kyseliny hyaluronové

30

Do jednocentního vodného roztoku hyaluronanu (1 g, $2 \times 10^5 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$), s obsahem NaCl 1%, KBr 1%), TEMPO (0,01 eq) a NaHCO_3 (20 eq.), se postupně přidával vodný roztok NaClO (0,5 eq) pod dusíkem. Směs se míchala 12 h při teplotě $-5 \text{ }^\circ\text{C}$, pak se přidal 0,1 g etanolu a směs byla míchaná ještě 1 hodinu. Výsledný roztok pak byl zředěn destilovanou vodou na 0,2 % a dialyzován oproti směsi (0,1% NaCl, 0,1% NaHCO_3) 3-krát 5 litrů (1 x denně) a oproti destilované vodě 7-krát 5 litrů (2 x denně). Výsledný roztok byl pak odpařen a analyzován.

35

DS 10 % (stanoveno z NMR)

$^1\text{H NMR (D}_2\text{O)}$ δ 5,26 (s, 1H, polymer- CH(OH)_2)

HSQC (D_2O) cross signál 5,26 ppm (^1H) – 90ppm(^{13}C) (polymer- CH(OH)_2)

40

Příklad 2 Dehydratace HA-aldehydu

Do tříprocentního roztoku HA-aldehydu (0,1 g, stupeň oxidace DS=10 %, příklad 1) ve vodě se přidalo 6,7 ml DMSO a báze DIPEA (5 eq). Směs se míchala 72 h při teplotě $40 \text{ }^\circ\text{C}$. Výsledný roztok byl pak srážen směsí isopropanol/hexan a tuhý podíl sušen ve vakuu.

45

DS 6 % (stanoveno z NMR), $M_w = 11 \times 10^4 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ (stanoveno SEC MALLS)

$^1\text{H NMR (D}_2\text{O)}$ δ 9,24 (s, 1H, $-\text{CH}=\text{O}$), 6,32 (m, 1H, $-\text{CH}=\text{C}-\text{CH}=\text{O}$)

UV-Vis (D_2O) 252 nm, $\pi-\pi^*$ přechod α,β -nenasycený aldehyd

50

Příklad 3 Dehydratace HA–aldehydu

Do čtyřprocentního roztoku HA–aldehydu (0,1 g, stupeň oxidace DS=10 %, příklad 1) ve vodě se
 5 přidalo 7,5 ml DMSO a báze DIPEA (5 eq). Směs se míchala 72 h při teplotě 50 °C. Výsledný
 roztok byl pak srážen směsí isopropanol/hexan a tuhý podíl sušen ve vakuu.
 DS 5 % (stanoveno z NMR, podrobně příklad 2)

Příklad 4 Dehydratace HA–aldehydu

10 Do dvouprocentního roztoku HA–aldehydu (0,1 g, stupeň oxidace DS=10 %, příklad 1) ve vodě
 se přidalo 2,5 ml DMSO a báze DIPEA (5 eq). Směs se míchala 72 h při teplotě 50 °C. Výsledný
 roztok byl pak srážen směsí isopropanol/hexan a tuhý podíl sušen ve vakuu.
 DS 2 % (stanoveno z NMR, podrobně příklad 2)

15

Příklad 5 Dehydratace HA–aldehydu

20 Do tříprocentního roztoku HA–aldehydu (0,1 g, stupeň oxidace DS=10 %, příklad 1) ve vodě se
 přidalo 6,7 ml sulfolanu. Směs se míchala 72 h při teplotě 60 °C. Výsledný roztok byl pak srážen
 směsí isopropanol/hexan a tuhý podíl sušen ve vakuu.
 DS 1 % (stanoveno z NMR, podrobně příklad 2)

25 Příklad 6 Dehydratace HA–aldehydu

Do tříprocentního roztoku HA–aldehydu (0,1 g, stupeň oxidace DS=10 %, příklad 1) ve vodě se
 přidalo 6,7 ml sulfolanu a báze Et₃N (5 eq). Směs se míchala 72 h při teplotě 50 °C. Výsledný
 roztok byl pak srážen směsí isopropanol/hexan a tuhý podíl sušen ve vakuu.
 30 DS 5 % (stanoveno z NMR, podrobně příklad 2)

Příklad 7 Dehydratace HA–aldehydu

35 Do tříprocentního roztoku HA–aldehydu (0,1 g, stupeň oxidace DS=10 %, příklad 1) ve vodě se
 přidalo 6,7 ml sulfolanu a báze DIPEA (2 eq). Směs se míchala 12 h při teplotě 80 °C. Výsledný
 roztok byl pak srážen směsí isopropanol/hexan a tuhý podíl sušen ve vakuu.
 DS 2 % (stanoveno z NMR, podrobně příklad 2)

40

Příklad 8 Dehydratace HA–aldehydu

Do tříprocentního roztoku HA–aldehydu (0,1 g, stupeň oxidace DS=10 %, příklad 1) ve vodě se
 přidalo 6,7 ml sulfolanu a báze Ca(OH)₂ (1 eq). Směs se míchala 150 h při teplotě 30 °C. Vý-
 45 sledný roztok byl pak srážen směsí isopropanol/hexan a tuhý podíl sušen ve vakuu.
 DS 2 % (stanoveno z NMR, podrobně příklad 2)

Příklad 9 Dehydratace HA–aldehydu

50 HA–aldehyd (0,1 g, stupeň oxidace DS=10 %, příklad 1) se zahříval v tuhém stavu 5 dnů při
 80 °C. Pak byl analyzován pomocí NMR.
 DS 3 % (stanoveno z NMR, podrobně příklad 2)

Příklad 10 Dehydratace HA–aldehydu

HA–aldehyd (0,1 g, stupeň oxidace DS=10 %, příklad 1) se zahříval 12 h tuhém stavu při 10 °C. Pak byl analyzován pomocí NMR.

5 DS 2 % (stanoveno z NMR, podrobně příklad 2)

Příklad 11 Dehydratace HA–aldehydu

10 HA–aldehyd (0,1 g, stupeň oxidace DS=10 %, příklad 1) se zahříval v tuhém stavu 10 dnů při 50 °C. Pak byl analyzován pomocí NMR.

DS 2 % (stanoveno z NMR, podrobně příklad 2)

15 Příklad 12 Vázání aminů na α,β –nenasycený HA–aldehyd

Do jednoprocenního roztoku nenasyčeného HA–aldehydu (0,1 g, stupeň substituce DS=6 %, příklad 2) v 0,1M vodném fosfátovém pufru při pH 7,4 se přidal n–butylamin (2 eq). Směs se míchala 5 h při teplotě 37 °C. Výsledný roztok byl pak srážen směsí isopropanol/hexan a tuhý podíl sušen ve vakuu.

DS 5 % (stanoveno z NMR)

^1H NMR (D_2O) δ 7,74 (s, 1H, $-\text{CH}=\text{N}-\text{Bu}$), 5,68 (m, 1H, $-\text{CH}=\text{C}-\text{CH}=\text{N}-\text{Bu}$)

HSQC (D_2O) cross signál 7,74 ppm (^1H) – 158 ppm (^{13}C) $-\text{CH}=\text{N}-\text{Bu}$
cross signál 5,68 ppm (^1H) – 112 ppm (^{13}C) $-\text{CH}=\text{C}-\text{CH}=\text{N}-\text{Bu}$

25

Příklad 13 Vázání aminů na α,β –nenasycený HA–aldehyd

30 Do jednoprocenního roztoku nenasyčeného HA–aldehydu (0,1 g, stupeň substituce DS=6 %, příklad 2) v 0,1M vodném fosfátovém pufru při pH 7,4 se přidal n–butylamin (0,05 eq). Směs se míchala 150 h při teplotě 20 °C. Výsledný roztok byl pak srážen směsí isopropanol/hexan a tuhý podíl sušen ve vakuu.

DS 2 % (stanoveno z NMR, podrobně příklad 12)

35

Příklad 14 Vázání aminů na α,β –nenasycený HA–aldehyd

40 Do jednoprocenního roztoku nenasyčeného HA–aldehydu (0,1 g, stupeň substituce DS=6 %, příklad 2) ve vodě se přidal n–butylamin (0,3 eq). Směs se míchala 10 min při teplotě 60 °C. Výsledný roztok byl pak srážen směsí isopropanol/hexan a tuhý podíl sušen ve vakuu.

DS 5 % (stanoveno z NMR, podrobně příklad 12)

45 Příklad 15 Vázání lysinu na α,β –nenasycený HA–aldehyd

Do jednoprocenního roztoku nenasyčeného HA–aldehydu (0,1 g, stupeň substituce DS=6 %, příklad 2) v 0,1M vodném fosfátovém pufru při pH 7,4 se přidal lysin (0,3 eq). Směs se míchala 24 h při teplotě 20 °C. Výsledný roztok byl pak srážen směsí isopropanol/hexan a tuhý podíl sušen ve vakuu.

50 DS 5 % (stanoveno z NMR)

^1H NMR (D_2O) δ 7,76 (s, 1H, $-\text{CH}=\text{N}-\text{lysin}$), 5,65 (m, 1H, $-\text{CH}=\text{C}-\text{CH}=\text{N}-\text{lysin}$)

Příklad 16 Vázání pentapeptidu pal-KTTKS (palmytoyl-Lys-Thr-Thr-Lys-Ser) na α,β -nenasycený HA-aldehyd

5 Do jednoprocenního roztoku nenasyčeného HA-aldehydu (0,1 g, stupeň substituce DS=6 %, příklad 2) v 0,1M vodném fosfátovém pufru při pH 7,4 se přidalo 5 ml IPA a pak roztok substituovaného pentapeptidu pal-KTTKS (0,1 eq) v 5 ml isopropylalkoholu. Směs se míchala 72 h při teplotě 20 °C. Výsledný roztok byl odpařen na rotační vakuové odparce na třetinu objemu a pak srážen směsí isopropanol/hexan a tuhý podíl sušen ve vakuu.

DS 1 % (stanoveno z NMR)

10 $^1\text{H NMR}$ (D_2O) δ 7,75 (s, 1H, $-\text{CH}=\text{N}$ -peptid), 5,66 (m, 1H, $-\text{CH}=\text{C}-\text{CH}=\text{N}$ -peptid)

Příklad 17 Síťování α,β -nenasyceného HA-aldehydu lysinem

15 Do pětiprocenního roztoku nenasyčeného HA-aldehydu (0,1 g, stupeň substituce DS=6 %, příklad 2) v 0,1M vodném fosfátovém pufru při pH 7,4 se přidal jednoprocenní roztok lysinu ve vodě (0,1 eq). Směs se míchala 24 h při teplotě 20 °C. Byl pozorován nárůst viskozity výsledného roztoku.

20

Příklad 18 Síťování α,β -nenasyceného HA-aldehydu dihydrazid adipatem

25 Do pětiprocenního roztoku nenasyčeného HA-aldehydu (0,015 g, stupeň substituce DS=6 %, příklad 2) v 0,1M vodném fosfátovém pufru při pH 7,4 se přidal jednoprocenní roztok dihydrazid adipátu ve vodě (0,1 eq). Směs se míchala 24 h při teplotě 20 °C. Byl pozorován nárůst viskozity výsledného roztoku.

Příklad 19 Příprava deacetylovaného hyaluronanu

30

Do tříprocenního roztoku hyaluronanu (1g , $83 \times 10^4 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) v hydrazin hydrátu s obsahem 30 g hydrazin sulfátu se přidalo 65 ml sulfolanu a směs se zahřívala 48 hodin při 70 °C. Výsledný roztok je zředěn destilovanou vodou na 0,2% a dialyzován oproti směsi (0,1% NaCl, 0,1% NaHCO_3) 3-krát 5 litrů (1x denně) a oproti destilované vodě 7-krát 5 litrů (2x denně). Výsledný roztok byl pak odpařen a analyzován.

35

DS 32 % (stanoveno z NMR), M_w $37 \times 10^3 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ (Stanoveno SEC-MALLS)

$^1\text{H NMR}$ (1% NaOD v D_2O) δ 2,75 (s, 1H, $-\text{CH}-\text{NH}_2$)

40 Příklad 20 Síťování α,β -nenasyceného HA-aldehydu pomocí deacetylovaného hyaluronanu

Do tříprocenního roztoku nenasyčeného HA-aldehydu (0,025 g, stupeň substituce DS=6 %, příklad 2) v 0,1M vodném fosfátovém pufru při pH 7,4 se přidal tříprocenní roztok deacetylovaného hyaluronanu (0,015 g, příklad 19) v 0,1M vodném fosfátovém pufru při pH 7,4 (0,1 eq). Směs se míchala 24 h při teplotě 20 °C. Byl pozorován výrazný nárůst viskozity výsledného roztoku.

45

Příklad 21 Porovnání mechanických a viskoelastických vlastností hydrogelů na bázi síťovaného α,β -nenasyceného HA-aldehydu a síťovaného nasyceného HA-aldehydu.

50

- síťování s deacetylovaným hyaluronanem

Materiál 1: Nenasycený HA–aldehyd (0,06 g, DS = 6 %, $M_w = 11 \times 10^4 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, příklad 2) 3% roztok v PBS pH 7,4 + deacetylovaný hyaluronan (0,02 g, příklad 19) 3% roztok v PBS pH 7,4.

Materiál 2: Nasycený HA–aldehyd (0,06 g, DS = 7 %, $M_w = 1 \times 10^5 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) 3% roztok v PBS pH 7,4 + deacetylovaný hyaluronan (0,02 g, příklad 19) 3% roztok v PBS pH 7,4.

5

Z výše popsaných materiálů byly připraveny vzorky hydrogelů, a to smícháním a důkladnou homogenizací jejich obou složek (3% roztoku nenasyceného HA–aldehydu v PBS / 3% roztok nasyceného HA–aldehydu a 3% roztoku deacetylovaného hyaluronanu v PBS). Vzorky byly vždy ponechány po dobu 240 minut dozrát při laboratorní teplotě, kdy poté dochází ke vzniku homogenního transparentního gelu. Všechny vzorky měly stejné rozměry a byly proměřovány za konstantních laboratorních podmínek (teplota, tlak, vlhkost).

10

U vzorků byly stanovovány jejich mechanické vlastnosti. Konkrétně se jednalo o Youngův modul pružnosti v kompresi udávající tvrdost / pružnost materiálu, houževnatost udávající pevnost vzorku a jakou energii je materiál schopný absorbovat, aniž by došlo k jeho trvalé deformaci. Dále mezi pevností v kompresi udávající, jaké maximální zatížení je materiál schopný absorbovat, aniž by došlo k jeho trvalé deformaci, a v rámci viskoelastických vlastností modul pružnosti ve smyku a ztrátový úhel.

15

Materiál číslo	Youngův modul pružnosti v kompresi (kPa)	Mez pevnosti (kPa)	Houževnatost (J/m^3)	Modul pružnosti ve smyku (Pa)	Ztrátový úhel δ (°)
1	0,844	382,06	29690	160	2,36
2	0,482	309,29	19488	55	10,3

20

Dosažené výsledky uvedené v rámci tohoto příkladu ukazují výhodnost použití nenasyceného HA–aldehydu oproti nasycenému HA–aldehydu z pohledu přípravy tužších a houževnatějších (lépe prosítovaných) materiálů vhodných pro tkáňové inženýrství.

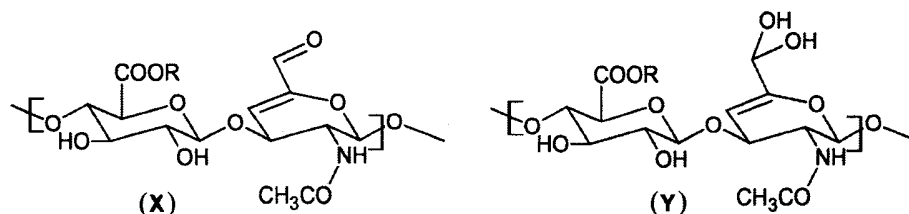
25

PATENTOVÉ NÁROKY

30

1. Derivát kyseliny hyaluronové, modifikovaný dvojnou vazbou v polohách 4 a 5 glukosaminové části polysacharidu a současně oxidovaný na aldehyd v poloze 6 glukosaminové části polysacharidu, podle strukturního vzorce X, nebo jeho hydratovaná forma podle strukturního vzorce Y

35



40

kde R je vodík, libovolný kation kovu nebo organický kation vybraný ze skupiny obsahující organický kation typu tetrabutylamonium nebo protonizovaný triethylamin.

2. Derivát kyseliny hyaluronové podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že má molekulovou hmotnost v rozmezí 1 až 5×10^5 g.mol⁻¹ a R je kation sodíku, draslíku, vápníku nebo organický kation typu tetrabutylamonium nebo protonizovaný triethylamin.
- 5 3. Způsob přípravy derivátu kyseliny hyaluronové definovaného v nároku 1 nebo 2, **vyznačující se tím**, že kyselina hyaluronová v prvním kroku oxiduje v poloze 6 glukosaminové části s výhodou pomocí systému R¹-TEMPO/NaClO, kde R¹ je vodík nebo skupina N-acetyl, ve vodě při teplotě -5 až 10 °C, molární množství NaClO je v rozmezí 0,05 až 0,7 ekvivalentu a molární množství R¹-TEMPO je v rozmezí 0,005 až 0,2 ekvivalentu vzhledem
- 10 k dimeru kyseliny hyaluronové, načež se oxidovaná kyselina hyaluronová ve druhém kroku dehydratuje v polohách 4 a 5 glukosaminové části ve směsi voda/polární aprotické rozpouštědlo při teplotě 30 až 80 °C, s výhodou při teplotě 50 až 60 °C.
4. Způsob přípravy podle nároku 3, **vyznačující se tím**, že směs dále obsahuje bázi v množství 0,01 až 20 ekvivalentů, s výhodou 5 až 10 ekvivalentů, vzhledem k dimeru kyseliny hyaluronové, přičemž báze je vybrána ze skupiny zahrnující organické báze, například triethylamin nebo diisopropylethylamin, nebo anorganické báze, například Ca(OH)₂.
- 15 5. Způsob přípravy podle nároku 3, **vyznačující se tím**, že aprotické rozpouštědlo je mísitelné s vodou a zahrnuje například DMSO nebo sulfolan, a objemový poměr rozpouštědlo/voda je v rozsahu 3/1 až 1/2.
- 20 6. Způsob přípravy podle kteréhokoli z nároků 3 až 5, **vyznačující se tím**, že reakce probíhá po dobu 12 až 150 hodin.
- 25 7. Způsob přípravy podle kteréhokoli z nároků 3 až 6, **vyznačující se tím**, že oxidovaná kyselina hyaluronová ve druhém kroku dehydratuje v pevné fázi bez použití rozpouštědel nebo jiných aditiv zahřátím na teplotu 50 až 100 °C, s výhodou 70 až 80 °C po dobu 12 hodin až 10 dnů, s výhodou 4 až 5 dnů.
- 30 8. Způsob přípravy podle kteréhokoliv z nároků 3 až 7, **vyznačující se tím**, že výchozí kyselina hyaluronová má molekulovou hmotnost v rozsahu 1×10^4 g.mol⁻¹ až 5×10^6 g.mol⁻¹.
- 35 9. Způsob modifikace derivátu kyseliny hyaluronové definovaného v nároku 1 nebo 2, **vyznačující se tím**, že derivát reaguje s aminem obecného vzorce H₂N-R², kde R² je alkylový, aromatický, heteroaromatický, lineární nebo rozvětvený řetězec C₁ až C₃₀, volitelně s obsahem N, S nebo O atomů.
- 40 10. Způsob modifikace derivátu kyseliny hyaluronové podle nároku 9, **vyznačující se tím**, že derivát reaguje s aminokyselinou nebo s peptidem.
11. Způsob modifikace derivátu kyseliny hyaluronové podle nároku 9, **vyznačující se tím**, že derivát reaguje s polymerem, který obsahuje volnou amino skupinu.
- 45 12. Způsob modifikace derivátu kyseliny hyaluronové podle nároku 11, **vyznačující se tím**, že polymerem je například deacetylovaná kyselina hyaluronová, kyselina hyaluronová s navázanou amino skupinou přes linker, nebo želatina, nebo jiný biologicky akceptovatelný polymer.
- 50 13. Způsob modifikace podle kteréhokoli z nároků 9 až 12, **vyznačující se tím**, že množství aminu, aminokyseliny, peptidu nebo volných amino skupin polymeru je v rozmezí 0,05 až 2 ekvivalentů vzhledem k dimeru kyseliny hyaluronové.

14. Způsob modifikace podle kteréhokoli z nároků 9 až 13, **vyznačující se tím**, že reakce s aminem, aminokyselinou, peptidem nebo polymerem obsahujícím volnou amino skupinu probíhá ve vodě, ve fosfátovém pufru nebo v systému voda–organické rozpouštědlo při teplotě v rozmezí 20 až 60 °C po dobu 10 minut až 150 h.

5

15. Způsob modifikace podle nároku 14, **vyznačující se tím**, že organické rozpouštědlo je vybráno ze skupiny zahrnující s vodou mísitelné alkoholy, zejména isopropanol nebo ethanol, a s vodou mísitelná polární aprotická rozpouštědla, zejména dimethylsulfoxid, přičemž obsah vody ve směsi je minimálně 50 % objemových.

10

16. Použití derivátů definovaných v kterémkoli z nároků 1 a 2 jako nosičů biologicky aktivních látek v kosmetice a farmacii nebo jako nosičů biologicky aktivních látek s kontrolou uvolňování pomocí změny hodnoty pH.

15

17. Použití derivátů připravených způsobem definovaným v kterémkoli z nároků 9 až 15 pro přípravu síťovaných materiálů a hydrogelů, pro přípravu materiálů pro tkáňové inženýrství nebo pro biomedicínské aplikace.

20

1 výkres



Obr. 1

Konec dokumentu
