

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLového
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **06.09.2007**
(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **18.03.2009**
(Věstník č. 11/2009)

(21) Číslo dokumentu:

2007-606

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. CL:

<i>C08B 37/08</i>	(2006.01)
<i>C08B 37/00</i>	(2006.01)
<i>A61K 31/715</i>	(2006.01)
<i>A61K 31/728</i>	(2006.01)
<i>A61K 8/73</i>	(2006.01)
<i>A61K 9/70</i>	(2006.01)
<i>A61K 47/36</i>	(2006.01)

(71) Přihlašovatel:

CPN spol. s r. o., Dolní Dobrouč, CZ

(72) Puvodec:

Velebný Vladimír RNDr. CSc., Ústí nad Orlicí, CZ

Šedová Petra Ing., Dolní Dobrouč, CZ

Knotková Kateřina Ing. Ph.D., Choceň, CZ

(74) Zástupce:

Ing. František Kania, Mendlovo nám. 1a, Brno, 60300

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Příprava hyaluronanu modifikovaného
cyklodextrinem a jeho aplikace**

(57) Anotace:

Řešení se týká způsobu přípravy derivátu hyaluronanu modifikovaného cyklodextriny α , β , γ nebo jejich deriváty připravenými reakcí příslušného cyklodextrinu nebo jeho derivátu s 1-chlór-2,3-epoxypropanem a hyaluronanem. Fyzikálně chemické vlastnosti takto modifikovaného hyaluronanu významně rozšiřují jeho možnosti užití ve farmacii a v lékařství jako nosiče nízkomolekulárních aktivních látek k cílenému transportu a řízenému uvolňování nebo jako látky vhodné pro tvorbu filmů, tuhých pěn a nanosů pro bandáže ran a skeföldů ve tkáňovém inženýrství.

Příprava hyaluronanu modifikovaného cyklodextrinem a jeho aplikace

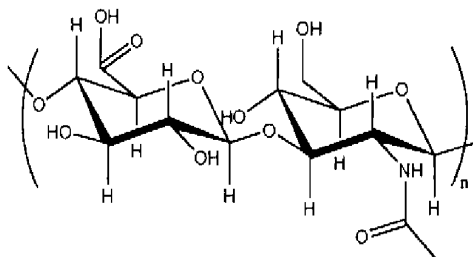
Oblast techniky

Vynález spadá do oblasti bio-medicínských přípravků založených na hyaluronanu nebo jeho solích a na jejich derivátech s cyklodextriny vzniklých chemickou reakcí.

Dosavadní stav techniky

Kyselina hyaluronová je významným polysacharidem a v přírodě se nachází zejména ve formě soli – hyaluronátu sodného, který je stabilnější než volná kyselina při fyziologickém pH. Kyselina hyaluronová a hyaluronát je souhrnně nazýván hyaluronan. Základní jednotkou hyaluronanu je disacharid tvořený kyselinou D-glukuronovou a N-acetyl-D-glukosaminem, které jsou mezi sebou spojeny glykosidickou vazbou $\beta(1\rightarrow3)$ ⁱ (obr. 1).

Volný hyaluronan se v organismu nachází v synoviální tekutiněⁱⁱ kloubu, v oku a ve formě komplexu s různými glykoproteiny a proteoglykanovými podjednotkami v mimobuněčné matrix vyšších živočichů, především v pojivových tkáníchⁱⁱⁱ.

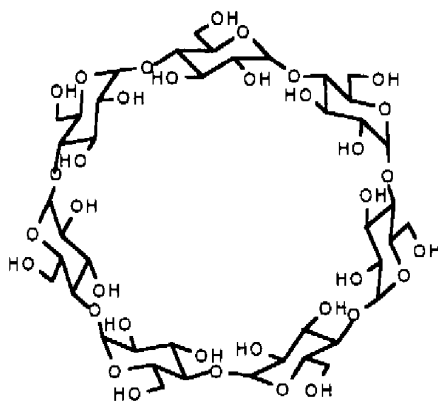


Obr. 1 Kyselina hyaluronová

Hyaluronan se ve tkáních vyskytuje v širokém spektru molekulových hmotností od několika set až po miliony g/mol, a jeho strukturou jsou podmíněny unikátní biologické i fyzikálně chemické vlastnosti. Jako vysokomolekulární reguluje obsah vody v extracelulární matrix, jako např. v pokožce, kloubu apod.^{iv}. V závislosti na své molekulové hmotnosti vykazuje charakteristické pasivní i aktivní biologické vlastnosti. Je imunologicky aktivní a váže se na proteiny v mimobuněčné matrix a na povrch buněk, což hraje roli například v buněčném dělení, v embryonálním vývoji^v, ve vývoji rakoviny^{vi, vii}, a při zánětech^{viii, xiv}. Nemodifikovaný hyaluronan našel důležité uplatnění v transportu léčiv a v chirurgii^{ix}. Je používán v oftalmologii^{x, xi}, při léčbě ran^{xii, xiii} a za jeho přítomnosti se zvyšuje účinek některých léků^{xiv}.

Hyaluronan poskytuje dostatečné množství vhodných funkčních skupin k umělému navázání léčiv. Jeho užití může být rozšířeno chemickou modifikací polysacharidu, například navázáním cyklodextrinu.

Cyklodextriny (obr.2) jsou cyklické oligosacharidy tvořené α -D-glukopyranosami spojenými $\alpha(1\rightarrow4)$ vazbou, které obsahují relativně hydrofobní centrální kavitu a hydrofilní vnější povrch. Podle počtu α -D-glukopyranosových jednotek v molekule cyklodextrinu se rozlišuje několik druhů, mezi nejznámější a nejfrekventovanější patří α , β , γ -cyklodextrin. Ve farmaceutickém průmyslu jsou cyklodextriny hlavně užívány jako komplexační činidla pro zvýšení rozpustnosti málorozpustných látek (např. léčiv), ke zvýšení jejich chemické a fyzikální stability, k přenosu léčiv k a přes biologické membrány, k redukci lokálního podráždění po kožní či orální aplikaci, k redukci nebo eliminaci nepříjemných pachů a chuti a k prevenci interakci léčivo-léčivo nebo léčivo-pomocná látka^{xv}. Zvýšení účinnosti je pak možné přidavkem malého množství vodou rozpustného polymeru, který zároveň stabilizuje komplex^{xvi}.



Obr. 2 β -cyklodextrin

Šoltés *et al.* publikoval popis přípravy derivátu hyaluronanu s navázaným cyklodextrinem^{xvii}. Hyaluronát se rozpustil v dioxanu s diethyl azodikarboxylátem, k této disperzi se přidal β -cyklodextrin opět v dioxanu s přidavkem trifenyfosfinu. Po odpaření dioxanu se produkt vysrážel etanolem a rozpustil ve vodě a posléze zakoncentroval na ultrafiltru. Obsah cyklodextrinu se stanovil acidobazickou titrací. Ve stejné publikaci je také zmíněna možnost přípravy derivátu hyaluronanu s β -cyklodextrinem využívající epichlorhydrin, ale ani v odkazovaném článku^{xviii} není tato příprava popsána a tudíž ji nelze považovat za současný stav techniky.

Syntéza derivátu hyaluronanu a β -cyklodextrinu navázaného pomocí spaceru tvořeného dihydrazidem kyseliny adipové byla popsána ve zveřejněné mezinárodní přihlášce WO0166601^{xix}. Nejprve reaguje dihydrazid kyseliny adipové s hyaluronanem v přítomnosti 1-

-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimidu a derivát se izoluje dialýzou. Hydroxylové skupiny cyklodextrinu jsou aktivovány 1-kyano-4-dimethylaminopyridinium tetrafluoroborátem s triethylaminem. Derivát hyaluronanu pak reaguje s takto aktivovaným cyklodextrinem. Podobně pak reagují další deriváty cyklodextrinu jako např. hydroxyethyl-, hydroxypropyl- a sulfobutyl-cyklodextrin.

ⁱ Cen L., Neoh K.G., Kang E.T.: *Langmuir* 2002, 18, 8633.

ⁱⁱ G.D. Prestwich: www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA18/HA18E.html.

ⁱⁱⁱ Vercruyse K.P., Prestwich G.D.: *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 1998, 15, 513.

^{iv} Fraser J.R.E., Laurent T.C., Laurent U.B.G.: *J. Intern. Med.* 1997, 242, 27.

^v Toole B.P.: *Semin. Cell & Dev. Biol.* 2001, 12, 79.

^{vi} Delpech B., Girard N., Bertrand P. *et al.*: *J. Intern. Med.* 1997, 242, 41.

^{vii} Sakurai K., Horie K., *et al.*: 1984, JP 61000017.

^{viii} Gerdin B., Hallgren R.: *J. Intern. Med.* 1997, 242, 49.

^{ix} Drobník J.: *Adv. Drug Delivery Rev.* 1991, 7, 295.

^x Sacttone M.F., Giannaccini B., Chetoni P.: *Int. J. Pharm.* 1991, 72, 131.

^{xi} Nakada K., Kondo N.: 2000, JP 2000119196.

^{xii} Juhlin L.: *J. Intern. Med.* 1997, 242, 61.

^{xiii} Kuroyanagi Y.: 2002, WO 0245767.

^{xiv} Miller J.A., Ferguson R.L., Powers D.L. *et al.*: *J. Biomed. Mater. Res.* 1997, 38, 25.

^{xv} Loftsson T., http://www.cyclodextrin.is/About_Cyclodextrins.htm.

^{xvi} Kaur, I. P., Chhabra, S., Aggarwal, D. Role of Cyclodextrin in Ophthalmics. *Current Drug Delivery* 1, 2004, 351-360.

^{xvii} Šoltés L., Steiner B., *et al.*: *Carbohydr. Polym.* 1999, 39, 17.

^{xviii} Šoltés, L., Mislovičová, D., Sébille, B., *Biomedical Chromatography* 1996, 10, 53-59.

^{xix} Šoltés L., Steiner B., *et al.*: 2001, WO 01/66601 A1.

Popis grafů

Graf 1. FTIR spektra připravených derivátů k příkladům 1 (—), 2 (), 3 ()

Graf 2. FTIR spektra připravených derivátů k příkladům 4 (—), 5 (), 6 ()

Graf 3. FTIR spektra připravených derivátů k příkladům 7 (—), 8 (), 9 ()

Graf 4. FTIR spektra připravených derivátů k příkladům 16 (—), 17 (), 18 ()

Graf 5. FTIR spektra připravených derivátů k příkladům 19 (—), 20 (), 21 ()

Popis obrázků

Obr. 1 Kyselina hyaluronová

Obr. 2 Cyklodextrin

Obr. 3 Schéma reakce

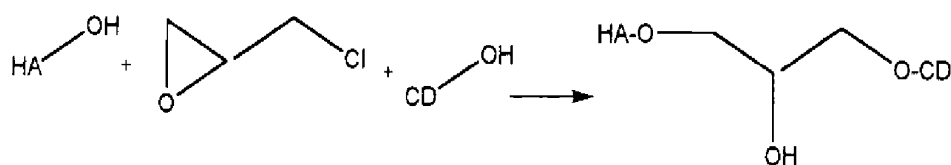
Obr. 4 SEM fotografie porézního nerozpustného materiálu dle příkladu 22 při různém zvětšení
A x 50; B x 400

Podstata vynálezu

Podstatou vynálezu je způsob přípravy modifikovaného hyaluronanu, kde hyaluronan je modifikovaný cyklodextriny α , β , γ nebo jejich deriváty připravenými reakcí příslušného cyklodextrinu nebo jeho derivátu s 1-chlór-2,3-epoxypropanem a hyaluronanem. Navázaný cyklodextrin vnese do struktury hyaluronanu hydrofobní kavitu, která ovlivní fyzikální a chemické vlastnosti hyaluronanu natolik, že významně rozšíří jeho možnosti užití ve farmacii a v lékařství. Rozpustný, částečně rozpustný nebo nerozpustný přípravek tvořený derivátem hyaluronanu modifikovaného cyklodextriny může být použit jako nosič nízkomolekulárních aktivních látek k cílenému transportu a řízenému uvolňování. Takto modifikovaný hyaluronan může být dále využíván jako látka vhodná pro tvorbu filmů, tuhých pěn a nanosů pro bandáže ran a skefoldů ve tkáňovém inženýrství.

Podstatnou výhodou tohoto vynálezu oproti stávajícím syntézám je, že v molekule hyaluronanu zůstávají zachovány karboxylové skupiny a tím i jeho polyelektrolytový (polyanionický) charakter, což je velmi důležité pro zachování biologických vlastností hyaluronanu. Hyaluronan je i po derivatizaci degradovatelný hyaluronidasou a je rozpoznatelný příslušnými buněčnými receptory.

Tento způsob výroby zahrnuje navázání cyklodextrinu nebo jeho amino či hydrazino derivátu na hyaluronan pomocí bifunkčního činidla. Bifunkční činidlo (1-halogen-2,3-epoxypropan) obsahující epoxidovou a halogenovou skupinu aktivuje v silně alkalickém ($\text{pH} > 8$) nebo silně kyselém prostředí ($\text{pH} < 5$) cyklodextrin nebo jeho deriváty (amino-cyklodextrin, hydrazin-cyklodextrin, amino-alkyl-cyklodextrin, karboxyalkyl cyklodextrin, 6-O- α -D-glykosyl- β -cyklodextrin, hydroxylethyl cyklodextrin, sukcinyl cyklodextrin, hydroxypropyl cyklodextrin a sulphobutyl-cyklodextrin), který následně reaguje s hydroxylovou skupinou hyaluronanu o různé molekulové hmotnosti ($1\,000 - 10\,000\,000 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$) za vzniku éterové, esterové nebo aminové vazby (celkové schéma reakce je zobrazeno na obr. 3). Příprava probíhá ve dvou krocích.



Obr. 3 Schéma reakce

V prvním kroku probíhá aktivace hydroxylové skupiny cyclodextrinu, která se s výhodou provádí v alkalickém vodném roztoku při pH vyšším než 8. Reakce cyclodextrinu s aktivacním činidlem se s výhodou provádí při zvýšené teplotě v rozsahu 30 až 50 °C. Pro aktivaci cyclodextrinu dle vynálezu se využívá 1-chlór-2,3-epoxypropan. Aktivace hydroxylové skupiny cyclodextrinu se také provádí v kyselém vodném roztoku při pH nižším než 5.

Ve druhém kroku se pak hyaluronan rozpustí ve vodě a přidá se roztok aktivovaného cyclodextrinu a reakční směs se míchá při teplotě v rozmezí od 10 do 70 °C. Produkt se z reakční směsi izoluje dialýzou.

Produkt je dále upravován do formy vláken, folií, mikrosfér, hub a membrán, které mohou být dále používány pro tvorbu náhrady tkání. Na produkt je pak možno vázat biologicky aktivní látky jako léčiva, dezinfekční prostředky a antioxidanty (kys. ferulová, doxorubicin).

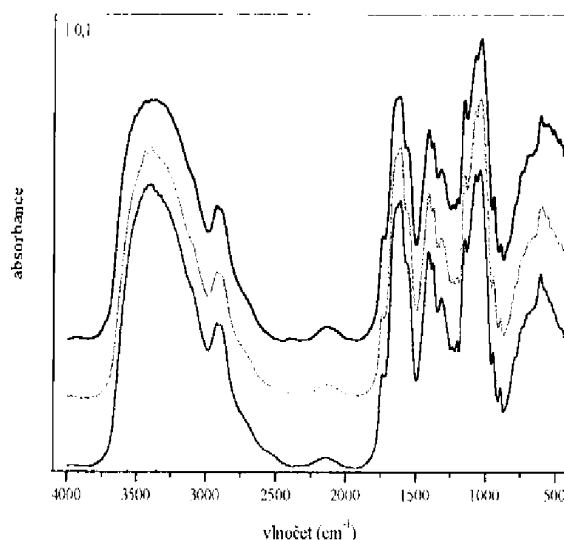
Příklady provedení vynálezu

Příklady 1 až 3: Vliv molekulové hmotnosti hyaluronanu na reakci

17,016 g β -cyclodextrinu se rozpustilo v 80 ml demineralizované vody při 40 °C a přidalo se 8 ml 1M NaOH. Do roztoku β -cyclodextrinu se přidalo 8,22 ml 1-chlór-2,3-epoxypropanu a roztok se míchal 10 min.

Roztok hyaluronanu se připravil rozpuštěním 4 g hyaluronanu o různých molekulových hmotnostech (viz. Tabulka I) v 400 ml demineralizované vody. Roztok se zahřál na 40 °C a přidal roztok aktivovaného cyclodextrinu. Reakční směs se udržovala při 40 °C za intenzivního míchání po dobu 20 h a následně dialyzovala proti demineralizované vodě přes dialyzační střevo (Cut off 12 000 – 14 000) a lyofilizovala.

Obsah β -cyclodextrinu se stanovil na základě absorpce fenolftaleinu v kavitě cyclodextrinu. Molekulová hmotnost se stanovila pomocí SEC-MALLS.



Graf 1. FTIR spektra připravených derivátů k příkladům 1 (---), 2(—), 3 (· · ·)

Tabulka I

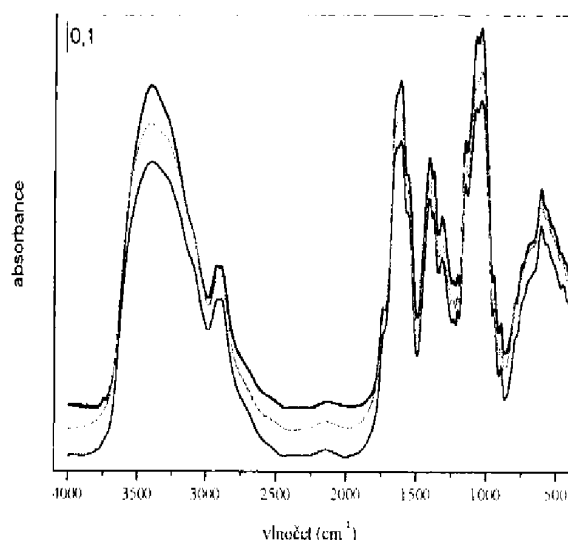
Příklady 1-3: Různé výchozí molekulové hmotnosti

Příklad	M_w (HA) (g. mol ⁻¹)	M_w (Prod) (g. mol ⁻¹)	Rozpustný podíl (%)	c(CD) %	Bobtnavost (%)
1	96210	107000	59,2	5,87	4539,76
2	380000	341500	73,00	1,17	727,83
3	1109000	262000	27,82	0,9	336,62

Příklady 4 až 6: Vliv přidaného množství 1-chlór-2,3-epoxypropanu

β -cyklodextrin se rozpustil v demineralizované vody při 40 °C a přidal se 1 ml 1M NaOH. Do roztoku β -cyklodextrinu se přidalo různé množství 1-chlór-2,3-epoxypropanu (viz Tabulka II) a po 5 minutách intenzivního míchání při 40 °C se roztok přidal postupně k roztoku hyaluronanu.

Roztok hyaluronanu (0,5 g) o koncentraci 1 hm. % se zahřál na 40 °C a intenzivně míchal s roztokem cyklodextrinu po dobu 20 h. Reakce se ukončila dialýzou proti demineralizované vodě přes dialyzační střevo (Cut off 12000-14000). Produkt se izoloval lyofilizací.



Graf 2. FTIR spektra připravených derivátů k příkladům 4 (—), 5 (—), 6 (—)

Tabulka II

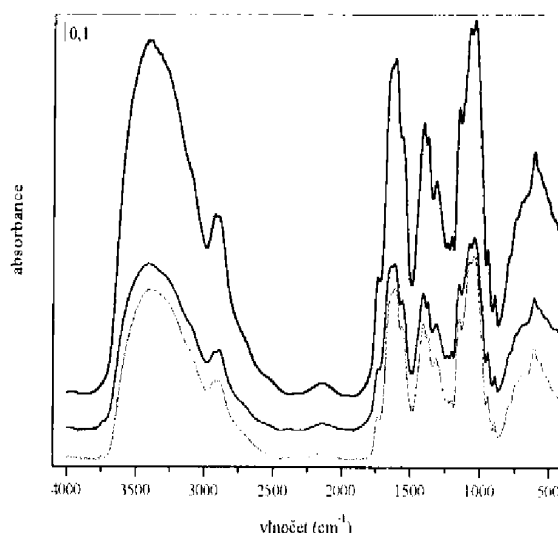
Příklady 4-6: Různá množství přidaného 1-chlór-2,3-epoxypropanu

V (1-chlór-2,3-								
příklad	m(β -CD)	-epoxypropan)	Poměr	M _w (HA)	M _w (Prod)	c(CD)	Rozpustný podíl	Bobtnavost
	(g)	(ml)	Epich./CD	(g. mol ⁻¹)	(g. mol ⁻¹)	(%)	(%)	(%)
4	2,127	1,365	0,64	380000	226600	0,43	39,11	532,1
5	1,418	0,685	0,48	380000	638350	0,40	54,78	2172,8
6	0,709	0,17	0,24	380000	439400	0,33	68,28	rozpustný

Příklady 7 až 9: Vliv doby reakce při bazické aktivaci cyklodextrinu

17,016 g β - cyklodextrinu se rozpustilo v 80 ml demineralizované vody při 40 °C a přidalo se 8 ml 1M NaOH. Do roztoku β -cyklodextrinu se přidalo 8,22 ml 1-chlór-2,3-epoxypropanu a roztok se míchal po různě dlouhou dobu (viz Tabulka III).

Roztok hyaluronanu se připravil rozpustěním 4 g hyaluronanu v 400 ml demineralizované vody. Roztok se zahřál na 40 °C a přidat se roztok aktivovaného cyklodextrinu. Reakční směs se udržovala při 40 °C za intenzivního míchání po dobu 20 h a následně dialyzovala proti demineralizované vodě přes dialyzační střevo (Cut off 12 000 – 14 000) a lyofilizovala.



Graf 3. FTIR spektra připravených derivátů k příkladům 7 (—), 8 (---), 9 (····)

Tabulka III

Příklady 7-9: Různá doba reakce 1-chlór-2,3-epoxypropanu s cyklodextrinem

Příklad	Doba (h)	M _w (HA) (g. mol ⁻¹)	M _w (Prod) (g. mol ⁻¹)	c(CD) %	Rozpustný podíl (%)	Bobtnavost (%)
7	0,16	310000	341500	1,17	73,00	728
8	1	310000	383800	1,02	66,20	483
9	2	310000	291000	1,65	69,50	486

Příklady 10 až 12 : Vliv doby reakce v kyselém pH

4,254 g β -cyklodextrinu se rozpustilo ve 20 ml demineralizované vody při 40 °C a následně se přidal 1ml 1M HCl. 2,055 ml 1-chlór-2,3-epoxypropanu se přidalo do okyseleného roztoku cyklodextrinu za intenzivního míchání. Reakční směs se míchala dobu uvedenou v tabulce IV, a po jejím uplynutí se přidal roztok hyaluronanu.

Roztok hyaluronanu se připravil rozpuštěním 1 g hyaluronanu o molekulové hmotnosti 350000 g.mol⁻¹ ve 100 ml demineralizované vody. Po přidání roztoku hyaluronanu do roztoku aktivovaného cyklodextrinu se roztok udržoval při 40 °C za stálého míchání při této teplotě 20 h. Reakční produkt se izoloval dialýzou proti demineralizované vodě přes dialyzační střeva (Cut off 12000 – 14000).

Tabulka IV

Příklady 10-12: Různá doba aktivace v kyselém prostředí

Příklad	Doba (h)	M _w (HA) (g.mol ⁻¹)	M _w (Prod) (g.mol ⁻¹)	c (CD) (%)	Rozpustný podíl (%)	Bobtnavost (%)
10	0,5	350 000	562300		44,2	4200
11	1	350 000	550800	8,4	30	6389
12	2	350 000	638000	8,3	50,5	2894

Příklady 13 až 15: Různá množství β-cyklohextrinu

Různá množství β-cyklohextrinu se rozpustila v 10 ml demineralizované vody při 40 °C a následně se přidal 1ml 1M NaOH a do roztoku se přidalo ekvivalentní množství 1-chlór-2,3-epoxypropanu za intenzivního míchání (Reakční směs a výsledky jsou uvedeny v tabulce V). Reakční směs se míchala po 10 min a poté se přidal roztok hyaluronanu.

Roztok hyaluronanu se připravil rozpuštěním 0,5 g hyaluronanu o molekulové hmotnosti 350000 g.mol⁻¹ ve 50 ml demineralizované vody. Po přidání roztoku hyaluronanu do roztoku aktivovaného cyklohextrinu se roztok udržoval při 40 °C a udržoval za stálého míchání při této teplotě 20 h. Reakční produkt se izoloval dialýzou proti demineralizované vodě přes dialyzační střeva (Cut off 12000 – 14000).

Tabulka V

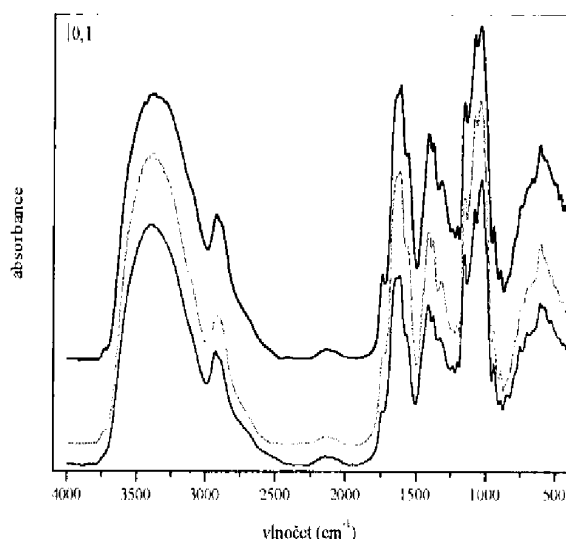
Příklady 13-15: Vliv množství β-cyklohextrinu

Příklad	m (β-CD) (g)	V (EP) (ml)	M _w (HA) (g.mol ⁻¹)	M _w (Prod) (g.mol ⁻¹)	c(CD) (%)	Rozpustný podíl (%)	Bobtnavost (%)
13	2,127	1,365	350 000	226600	5,7	39,11	238,2
14	1,418	0,685	350 000	638350	4,1	54,78	rozpuštěno
15	0,709	0,345	350 000	701650	1,8	68,96	rozpuštěno

Příklady 16 až 18: Příprava derivátu s γ-cyklohextrinem

19,444 g γ-cyklohextrinu se rozpustilo v 80 ml demivody při 40 °C a následně se přidal 1M NaOH (8 ml) a za intenzivního míchání se přidávalo do roztoku 9,395 ml 1-chlór-2,3-epoxypropanu. Po 10 minutách se přidal roztok hyaluronanu.

Roztok hyaluronanu se připravil rozpuštěním 4 g hyaluronanu o různých molekulových hmotnostech (viz. Tabulka VI) v 400 ml demineralizované vody. Po přidání roztoku hyaluronanu do reakční směsi cyklodextrinu se roztok udržoval při teplotě 40 °C a intenzivně míchal po dobu 20 h. Reakční produkt se izoloval dialýzou proti demineralizované vodě přes dialyzační střevo (Cut off 12000-14000).



Graf 4. FTIR spektra připravených derivátů k příkladům 16 (—), 17 (---), 18 (···)

Tabulka VI

Příklady 16-18: Derivát s γ -cyklodextrinem

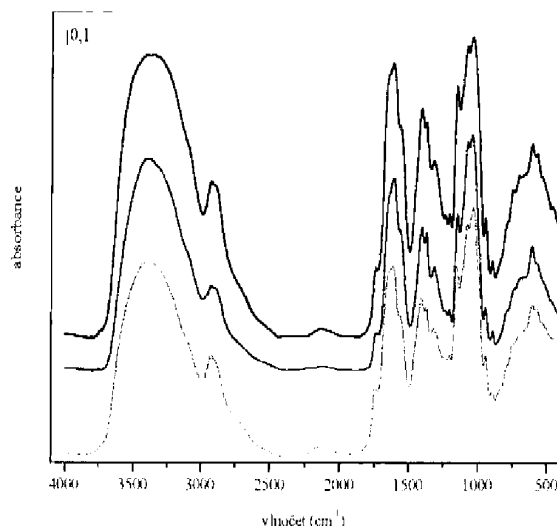
Příklad	M_w (HA) (g. mol ⁻¹)	M_w (Prod) (g. mol ⁻¹)	Rozpustný podíl (%)	c(CD) %	Bobtnavost (%)
16	96210	131900	61,90	1,1	918
17	310000	243600	41,90	2,6	1029
18	1109000	450600	61,60	4,2	228

Příklady 19 až 21: Příprava derivátu s α -cyklodextrinem

14,5872 g α -cyklodextrinu se rozpustilo v 80 ml demivody při 40 °C a následně se přidalo 8 ml 1M NaOH a 7,046 ml epichlorhydrinu do roztoku za intenzivního míchání. Po 10 minutách se přidal roztok hyaluronanu.

Roztok hyaluronanu se připravil rozpuštěním 4 g hyaluronanu o různých molekulových hmotnostech (viz. Tabulka VII) v 400 ml demineralizované vody. Po přidání roztoku

hyaluronanu do reakční směsi cyklodextrinu se roztok udržoval při teplotě 40 °C a intenzivně míchal po dobu 20 h. Reakční produkt se izoloval dialýzou proti demineralizované vodě přes dialyzační střevo (Cut off 12000-14000).



Graf 5. FTIR spektra připravených derivátů pro příklady 19 (—), 20 (---), 21 (···)

Tabulka VII

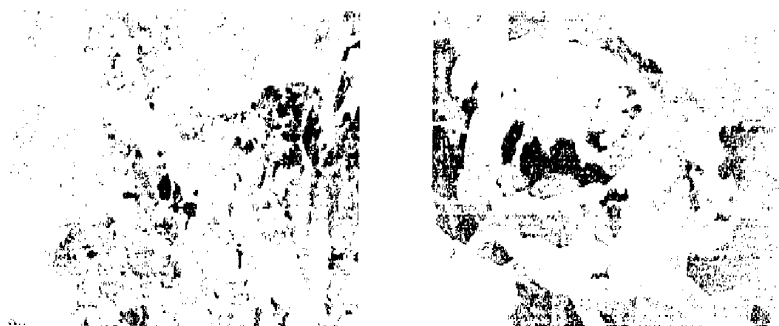
Příklady 19-21: Derivát s α -cyklodextrinem

Příklad	M_w (HA) (g·mol ⁻¹)	M_w (Prod) (g·mol ⁻¹)	Rozpustný podíl (%)	c(CD) %	Bobtnavost (%)
19	96210	100200	60,70	0,06	940
20	310000	427800	69,00	1,76	1271
21	1109000	241700	54,57	4,26	440

Příklad 22: Tvorba porézního nerozpustného materiálu

Derivát připravený dle příkladu 3 se rozpustil v demineralizované vodě, nalil na Petriho misku a vysušil při teplotě 55 °C. Vzniklá fólie se následně ponořila na 24 h do demineralizované vody, kde nabobtnala a po zamražení se lyofilizovala.

Derivát připravený dle příkladu 3 se rozpustil v demineralizované vodě, zamrazil při teplotě -30 °C a lyofilizoval. Tato porézní struktura se impregnovala 80% 2-propanolem a stabilizovala působením teploty 55 °C po dobu 12 h. Poréznost materiálů se charakterizovala pomocí rastrovací elektronové mikroskopie.



Obr. 4 SEM fotografie porézního nerozpustného materiálu dle příkladu 22 při různém zvětšení A x 50; B x 400

Příklad 23: Navázání léčiva

K roztoku derivátu γ IIA-CD (10 mg/2,5 ml pufru o pH = 10,5) se přidalo 1,5 ml roztoku 2-amino-4,6-dimethylpyrimidinu o koncentraci 7,3mg/250 ml pufru o pH = 10,5. 2-Amino-4,6-dimethylpyrimidin je léčivo s antimikrobiálními a antituberkolozními účinky. Množství navázaného léčiva se kvantifikovalo pomocí fluorimetru při vlnových délkách λ_{ex} = 290 nm a λ_{em} = 344 nm.

K roztoku derivátu β HA-CD o koncentraci 0,01 mmol/l se přidalo různé množství ferulové kyseliny. Maximální přidané množství bylo 1,2E-05 mmol/l. Toto množství se beze zbytku navázalo v komplexu HA-CD s ferulovou kyselinou. Komplexace byla ověřena měřením UV-VIs spektrofotometru a spektrofluorofotometru.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Způsob přípravy hyaluronanu modifikovaného cyklodextriny α , β , γ nebo jejich deriváty, **vyznačující se tím**, že hyaluronan se modifikuje cyklodextriny α , β , γ nebo jejich deriváty připravenými reakcí příslušného cyklodextrinu nebo jeho derivátu s 1-chlór-2,3-epoxypropanem a hyaluronanem.
2. Způsob přípravy modifikovaného hyaluronanu podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že reakce se provádí v alkalickém prostředí s pH vyšším než 8 nebo v kyselém prostředí s pH nižším než 5.
3. Způsob přípravy modifikovaného hyaluronanu podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že hyaluronan má molekulovou hmotnost v rozmezí 1 000 až 10 000 000 g.mol⁻¹.
4. Způsob přípravy modifikovaného hyaluronanu podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že hyaluronan je ve formě volné kyseliny nebo jakákoli farmakologicky přijatelné soli.
5. Způsob přípravy modifikovaného hyaluronanu podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že derivát je vybrán ze skupiny látek obsahující amino, hydrazino a alkyl-amino skupinu, jako například amino-cyklodextrin, hydrazin-cyklodextrin, amino-alkyl-cyklodextrin, karboxyalkyl cyklodextrin, 6-O- α -D-glykosyl- β -cyklodextrin, hydroxyethyl cyklodextrin, sukcinyl cyklodextrin, hydroxypropyl cyklodextrin a sulphobutyl-cyklodextrin.
6. Způsob přípravy modifikovaného hyaluronanu podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že reakční poměr cyklodextrinu ku 1-halogen-2,3-epoxypropanu je v rozmezí 0,05:1 až 0,4:1, výhodně 0,106:1.
7. Způsob přípravy modifikovaného hyaluronanu podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že reakční poměr cyklodextrinu ku dimeru hyaluronanu je v rozmezí 0,3:1 až 2:1, výhodně 1,5:1.

8. Přípravek tvořený hyaluronanem modifikovaným cyklodextriny α , β , γ nebo jejich deriváty připravenými reakcí příslušného cyklodextrinu nebo jeho derivátu s 1-chlór-2,3-epoxypropanem a hyaluronanem **vyznačující se tím**, že je zpracovaný do formy folií, vláken, mikrosfér, hub, membrán.
9. Přípravek podle nároku 8, **vyznačující se tím**, že je rozpustný ve vodě.
10. Přípravek podle nároku 8, **vyznačující se tím**, že je nerozpustný ve vodě.
11. Přípravek podle nároku 8, **vyznačující se tím**, že je možno jej použít jako prostředek pro tvorbu náhrady tkání.
12. Přípravek podle nároku 11, **vyznačující se tím**, že struktury prostředku pro tvorbu náhrady tkání tvoří krycí a antiadhezní materiály pro použití v dermatologii, traumatologii nebo ortopedii.
13. Přípravek podle nároku 8, **vyznačující se tím**, že jsou na něj vázány biologicky aktivní látky.
14. Přípravek podle nároku 13, **vyznačující se tím**, že biologicky aktivní látky jsou léčiva, dezinfekční prostředky nebo antioxidanty.