

# PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(21) Číslo dokumentu:

**2018-428**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.:

**A61K 9/70** (2006.01)  
**A61K 47/36** (2006.01)  
**A61K 33/18** (2006.01)  
**A61P 31/02** (2006.01)

(19)  
ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **23.08.2018**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **04.12.2019**  
(Věstník č. 49/2019)

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

(72) Původce:  
Radovan Buffa, Humenné, SK  
Vít Svozil, Ústí nad Orlicí, CZ  
Kateřina Knotková, Choceň, CZ  
Veronika Štěpánková, Chotěnov, CZ  
Jaromír Kulhánek, Pardubice, Bílé Předměstí, CZ  
Josef Chmelař, Ústí nad Orlicí, Hylváty, CZ  
Lucie Marholdová, Choceň, CZ  
Ivana Basarabová, Medzilaborce, SK  
Michaela Morávková, Žamberk, CZ  
Helena Krejčí, Svitavy, Předměstí, CZ  
Kristýna Lipenská, Letohrad, CZ  
Jaroslav Novotný, Letohrad, CZ  
Stanislav Pepeliaev, Česká Třebová, CZ  
Luboš Sobotka, Hradec Králové, Malšovice, CZ  
Vladimír Velebný, Žamberk, CZ

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

(54) Název přihlášky vynálezu:  
**Kompozice obsahující jodid a derivát  
kyseliny hyaluronové s oxidačním účinkem,  
způsob její přípravy a použití**

(57) Anotace:  
Vynález se týká přípravy a použití různých forem obsahujících jodidy a derivát kyseliny hyaluronové - chloramid hyalurononanu. Tyto kompozice po smíchání ve vodném prostředí uvolňují sloučeniny jodu v oxidačním stupni vyšším než -1, tudíž vykazují širokospektrální antimikrobiální aktivitu. Díky biokompatibilitě a stabilitě jsou tyto kompozice vhodné pro aplikace v oblasti krytů ran nebo na přípravu široké škály implantabilních zdravotnických prostředků.

## Kompozice obsahující jodid a derivát kyseliny hyaluronové s oxidačním účinkem, způsob její přípravy a použití

### 5 Oblast techniky

Vynález se týká kompozic obsahujících jodid a derivát kyseliny hyaluronové nazývaný chloramid hyaluronanu, ve kterém je většina atomů vodíků amidické skupiny -NH-CO- nahrazena za atomy chloru -NCl-CO-. Tato směs v přítomnosti vody generuje jod v oxidačním stupni vyšším než -I, který má širokospektrální antimikrobiální účinky. Finální kompozice zahrnují formy jako jsou například tenký film, lyofilizát, vrstva ze staplových vláken, nekonečné vlákno, tkanina, splétaná textilie nebo nanovláknenná vrstva, ve kterých bude jodid a chloramid hyaluronanu aplikován do zdravotnických prostředků nebo i léků.

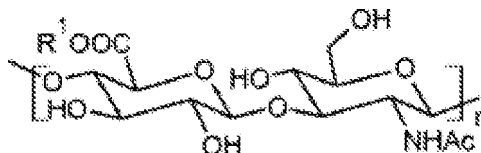
Dále se vynález týká použití finálních kompozic s obsahem jodidu a chloramidu hyaluronanu v oblastech, kde jsou vyžadovány následující vlastnosti, nebo jejich libovolné kombinace:

- oxidační nebo antimikrobiální nebo antifungální nebo antivirální aktivita
- biokompatibilita a biodegradovatelnost
- možnost přípravy různých forem s vyhovující stabilitou
- významná podpora procesu hojení

### 25 Dosavadní stav techniky

#### Kyselina hyaluronová

Kyselina hyaluronová nebo její sodná sůl je nesulfatovaný glykosaminoglykan, který je složený ze dvou opakujících se jednotek D-glukuronové kyseliny a N-acetyl-D-glukosaminu, viz vzorec I,



(I)

kde

35

R<sup>1</sup> je vodík nebo sodík.

Molekulová hmotnost nativní kyseliny hyaluronové se pohybuje v rozsahu 5.10<sup>4</sup> až 5.10<sup>6</sup> g.mol<sup>-1</sup>. Tento hydrofilní polysacharid hraje významnou roli v řadě biologických procesů jako je organizace proteoglykanů, hydratace a diferenciacie buněk a tvoří významnou součást kůže, synoviální tekutiny kloubů a pojivových tkání. Tento polymer se v biologických systémech přirozeně vyskytuje, tudíž je možné ho charakterizovat jako biodegradovatelný a biokompatibilní. Proto je vhodným substrátem pro oblast nosičů biologicky aktivních látek v široké škále biomedicinských aplikací.

45

#### Chemické modifikace kyseliny hyaluronové a její formy

Je známo mnoho způsobů, jak chemicky modifikovat kyselinu hyaluronovou za účelem změny jejích fyzikálních a biologických vlastností (Burdick J. A. a Prestwich G. D. *Adv. Mater.* 23, 41-56, 2011). V případě, že je pro určitou aplikaci žádaná zásadní změna v rozpustnosti, nejčastější

50

řešení je kovalentní navázání hydrofobního řetězce formou biodegradovatelné esterové vazby na strukturu polymeru (Kettou S. a kol. PV 2009-399, Buffa R. a kol. WO 2010105582). Z takto modifikovaných materiálů lze pak vytvářet různé formy, jako jsou například vlákna (Ščudlová J. a kol. EP 2925916 A1), pleteniny a splétané textilie (Pitucha T. a kol., CZ 306354), samonosné filmy (Foglarová M. a kol. PV 2015-166; Foglarová M. a kol. *Carbohydrate Polymers*, 144, 68-75, 2016) nebo vrstvy z nanovláken (Růžicková J. a kol. PV 2013-913). Netkané textilie jsou tvořeny spojením staplových mikrovláken, která jsou připravována metodou mokrého zvlákňování v nestacionární koagulační lázni (Zápotocký V. a kol. *International Journal of Biological Macromolecules*, 95, 903-909, 2017).

#### *Oxidace s trichlorisokyanurovou kyselinou nebo s dichlorisokyanurátem sodným*

Trichlorisokyanurová kyselina (TCC) se často používá na N-chloraci strukturně jednodušších amidů na N-chloramidy (Hiegel G. A. a kol. *Synthetic Communications*, 35, 2099-2105, 2005) většinou v nevodných rozpouštědlech. V přítomnosti vody je zase TCC často zmiňována v kombinaci se stabilními radikály typu piperidinyloxy (TEMPO) na selektivní oxidaci primárních hydroxylových skupin. Pro kyselinu hyaluronovou bylo například použito TCC s TEMPO ve vodě popsáno v patentu (Buffa R. a kol. WO 2011069475A3), kde nebyla pozorována tvorba žádných chloramidů, ale jenom oxidace primární hydroxylové skupiny na aldehyd a karboxylovou kyselinu. Takže v případě substrátů obsahujících velké množství sekundárních i primárních alkoholů (polysacharidy) se při použití TCC a jeho analogů dají očekávat reakce na hydroxylových skupinách. Monosodná sůl TCC známá jako dichlorisokyanurát sodný (DCC-Na) je méně reaktivní analog TCC, který je ale lépe rozpustný ve vodě. Bylo popsáno použití DCC-Na na oxidaci několika aminů a amidů, které ale neobsahují hydroxylové skupiny (Sun X. a kol., *Ind. Eng. Chem. Res.*, 49, 22, 2010). Výsledné chloraminy byly pak polymerizovány a finální substráty byly úspěšně testovány jako antibakteriální, antifungální a antivirální substance ve formě latexové emulze (Cao Z. a kol. *App. Mat. Inter.* 1, 2, 494-504, 2009).

Z těchto výstupů lze usoudit, že použití TCC nebo jeho analogů na selektivní přípravu N-chlorovaného amidu hyaluronanu ve vodě není očekávatelné z důvodů předpokládané reakce s hydroxy skupinami hyaluronanu.

#### *Oxidace polysacharidů chlornanem nebo kyselinou chlornou.*

Kyselina chlorná nebo její soli se často používají na oxidaci hydroxylových skupin polysacharidů zejména v kombinaci s radikály typu piperidinyloxy (TEMPO) (Bragd P. a kol. WO2002/48197, Buffa R. a kol., WO2011/069475A3). Obecně lze konstatovat, že v případě polysacharidů obsahujících amidickou skupinu nebyl vznik příslušných chloramidů v drtivé většině případů pozorován. Starší zdroje přítomnost chloramidu hyaluronanu vůbec nezmínují (Green S. P. a kol., *J. Rheumatology*, 17, 1670-5, 1990, Lindvall S. a kol., *Chem.-Biol. Interac.* 90, 1-12, 1994, Baker M. S. a kol., *Arthritis and Rheumatism*, 32, 4, 461-7, 1989). Jedná se o články, kde byly studovány degradace hyaluronanu s kyselinou chlornou nebo jejími solemi vznikajícími reakcí myeloperoxidázy (MPO) s peroxidem vodíku a s chloridy. Existují i práce, kde byly studovány degradace hlavně glykosaminoglykanů obsažených v extracelulární matrix za účelem simulace zánětlivých procesů. Hlavním výstupem měly být informace o samotném zánětlivém procesu a chemických strukturách, jejichž přítomnost se dá očekávat *in vivo*. V novějších zdrojích se už zmínky o chloramidech hyaluronanu vyskytují. Například v publikaci (Hawkins C. L. a kol., *Free Radical Biology & Medicine*, 24, 9, 1396-1410, 1998) byl studován mechanismus degradace kyseliny hyaluronové, chondroitin sulfátu a jiných i nízko-molekulových substrátů obsahujících amidickou skupinu. Jako oxidační činidlo byl použit HOCl/ClO<sup>-</sup>. Autoři předpokládají vznik chloramidu hyaluronanu jenom jako nestabilního intermediátu, který ale nebyl přímo detekován. Důvodem je jeho rychlé homolytické nebo redukční štěpení v obou případech za vzniku radikálů, které pak dále reagují cestou vedoucí k degradaci polymeru. V dalším článku (Parsons B. J. a kol., *Biochem. J.*, 381, 175-184, 2004) je popsán vznik chloramidů hyaluronanu, chondroitin sulfátu a jiných substrátů pomocí MPO (enzymu myeloperoxidázy), peroxidu vodíku a chloridů. Autoři

předpokládají, že příslušné chloramidy mají určitou životnost a detailně popisují jejich degradaci pomocí dalších činidel. Velmi zajímavý je článek (Rees M. D. a kol., J. Am. Chem. Soc., 125, 13719-13733, 2003), kde jsou popsány reakce mono, oligo i polysacharidů obsahujících amidickou skupinu s NaClO. Detailně je rozebrána stabilita chloramidů hyaluronanu a chondroitin sulfátu se stupněm modifikace 35% respektive 16% bez a s přítomností dalších činidel jako  $\text{Cu}^{2+}$  i v kombinaci s kyslíkem. Bylo zjištěno, že přítomnost některých kovů výrazně urychluje degradaci. I bez kovů byla pozorována rychlá degradace polymerních chloramidů hyaluronanu a chondroitin sulfátu při 50 °C. Při nižších teplotách byla degradace významně pomalejší. Bylo taky přímo pozorováno, že MPO v přítomnosti peroxidu vodíku a fyziologického množství chloridů, generuje s glykosaminoglykany malé množství jejich chloramidů, z čeho autoři usuzují, že tyto chloramidy jsou generovány i *in vivo*.

Z těchto výstupů lze předpokládat, že chloramid hyaluronanu o nízkém stupni modifikace je sice známý, ale neočekává se jeho dostatečná stabilita k tomu, aby měl tento materiál potenciál na přípravu nějakých kompozic pro použití v biomedicinských aplikacích.

#### *Kyselina hyaluronová a trijodid*

Formy jódu s vyšším oxidačním stupněm než -1 ( $\text{I}^-$ ) jsou dobře známy jako biokompatibilní, antiseptické a dezinfekční sloučeniny. Jednou z nejrozšířenějších forem je trijodid (oxidační stupeň -1/3), který podléhá vratnému rozpadu na molekulární jód ( $\text{I}_2$ ) a jodid ( $\text{I}^-$ ). Molekulární jód přechází do plynného skupenství, tudíž tuhé materiály s obsahem trijodidu postupně ztrácejí své oxidační schopnosti právě díky sublimaci  $\text{I}_2$ . Z tohoto důvodu se trijodid nejvíce používá ve formě roztoků. Příkladem je takzvaný Lugolův roztok – trijodid draselný ve vodě, který je díky své biokompatibilitě a účinnosti vhodný pro širokou škálu aplikací spojených s antiseptickým nebo dezinfekčním účinkem. Jeho mírnou nevýhodou je, že může způsobovat tvorbu jizev a taky dočasně změnit barvu kůže. Tyto nedostatky byly překonány přidávkou kyseliny hyaluronové, která výrazně potlačuje tvorbu jizev a obecně významně napomáhá procesu hojení. Spis CZ 12015 popisuje přípravek pro prevenci adheze bandáže, který obsahuje fyziologicky přijatelnou sůl kyseliny hyaluronové o molekulové hmotnosti 200 000 až 2 500 000  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ , jód a jodid draselný. Přípravek je ve formě sterilního vodného roztoku nebo gelu a je schopen urychlit hojení rány. Toto použití roztoku kyseliny hyaluronové a trijodidu draselného (pod komerčním názvem Hyiodine®) pro topické aplikace na hojení ran bylo publikováno i v několika pracích (Bezděková B. a kol. *Veterinářství* 54, 516-519, 2004; Franková J. a kol. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 17, 891-898, 2006; Slavkovský R. a kol. *Clinical and Experimental Dermatology* 35, 4, 373-379, 2010). Autoři získali výborné výsledky hojení chronické rány právě díky unikátní kombinaci biokompatibilního a antimikrobiálního trijodidu a podporou hojícího procesu způsobenou přítomností biokompatibilní kyseliny hyaluronové.

Z hlediska skladování, transportu a možných dalších aplikací *in situ* je ale významným omezením použití trijodidu s polysacharidem ve formě roztoku. Jednak objem materiálu (roztoku) je výrazně větší než objem analogické pevné formy a také některé možnosti použití *in situ* jsou díky tvarové nestálosti roztoku (jeho roztečení) značně limitované. Navíc je kapalná forma omezena použitým materiálem obalu, kde díky oxidační aktivitě trijodidu je velmi obtížné používat pro delší skladování jiné typy obalových materiálů než standardní, ale křehké silikátové sklo. Snaha připravit materiál s obsahem polysacharidu a trijodidu v pevné formě nebyla úspěšná z důvodu nestability samotného trijodidu v nepřítomnosti rozpouštědla. Přítomnost rozpouštědla brzdí proces sublimace molekulárního  $\text{I}_2$  a umožňuje jeho zpětné vázání s  $\text{I}^-$  na formu trijodidu  $\text{I}_3^-$ . Proto samotný Lugolův roztok při odpařování rozpouštědla rychle ztrácí aktivní složku ( $\text{I}_2$ ), která sublimuje z pevného materiálu, což z pohledu dlouhodobějšího skladování nějaké finální formy s obsahem trijodidu je problém zcela zásadní.

Spis CZ 22394 popisuje antimikrobiální směs pro podporu hojení ran a kryt pro podporu hojení ran s antimikrobiálním účinkem. Uvedená směs obsahuje fyziologicky aktivní sůl kyseliny hyaluronové, případně další polysacharidy a látky s antimikrobiální aktivitou, a dále elektrolyt,

např. jodid draselný. Kompozice může být ve formě chemické nebo fyzikální směsi, přičemž chemickou směsí je s výhodou vodný roztok a fyzikální směsí je s výhodou vrstva polysacharidových vláken, která ve své struktuře obsahuje antimikrobiální látku. Kryt je vhodný pro hojení povrchových ran. Nevýhodou tohoto řešení je zejména nezbytná přítomnost antimikrobiální látky jiné než trijodid, což s sebou obnáší riziko lokálního podráždění pokožky, nežádané toxicity nebo alergické reakce.

Spis CZ 303548 popisuje elegantní možnost, jak se vyhnout problému stability antimikrobiálních kompozic obsahujících aktivní jod v oxidačním stupni vyšším než -1. Řešení spočívá v tom, že se aktivní jod generuje až *in situ* pomocí reakce jodidů s jodičnany. Problém je v tom, že použité oxidační činidlo (jodičnan alkalických kovů) má velmi silné oxidační účinky a pokud se v procesu tvorby aktivního jodu dostane do kontaktu s tkání dřív, než stihne reagovat s jodidy, způsobuje poškození tkáně. Jinak řečeno, část kompozice, která zabezpečuje oxidaci jodidů na jod s oxidačním stupněm vyšším než -1, není biokompatibilní.

Výše uvedené nedostatky odstraňuje řešení popsané v tomto vynálezu, které popisuje přípravu plně biokompatibilních forem obsahujících dvě části:

1. jodid
2. biokompatibilní oxidační činidlo

Složky 1 a 2 mohou být jako tuhé v jedné finální kompozici, nebo jako kapalné ve dvou oddělených kompozicích, přičemž ke vzniku a uvolňování jodu s oxidačním stupněm vyšším než -1 dochází, když se obě složky smíchají v přítomnosti rozpouštědla. Stabilita finální kompozice při skladování a transportu je zabezpečena tím, že aktivní (prchavý) jod s oxidačním stupněm vyšším než -1 vzniká až *in situ* v přítomnosti vodného prostředí. Biokompatibilní oxidační činidlo ve formě chloramidu kyseliny hyaluronové s vyšším stupněm modifikace (nad 50 %) slouží jako generátor aktivního jodu pomocí rychlé reakce s jodidy a současně je zdrojem aktivního chloru. Chloramid kyseliny hyaluronové s nižším stupněm modifikace (maximálně 35 %) už popsán byl, ale z důvodů souvisejících s očekávanou nevyhovující stabilitou, nebyla popsána žádná aplikace. Výsledná kompozice složek 1 a 2 je unikátní tím, že současně splňuje následující požadavky:

- plná biokompatibilita a biodegradovatelnost ve všech stadiích aplikace
- inhibice růstu široké škály mikroorganismů, hub nebo virů (obsahuje aktivní jod i chlor)
- pozitivní účinky na procesy spojené s hojením (přítomnost kyseliny hyaluronové)
- možnost přípravy široké škály forem s vyhovující stabilitou

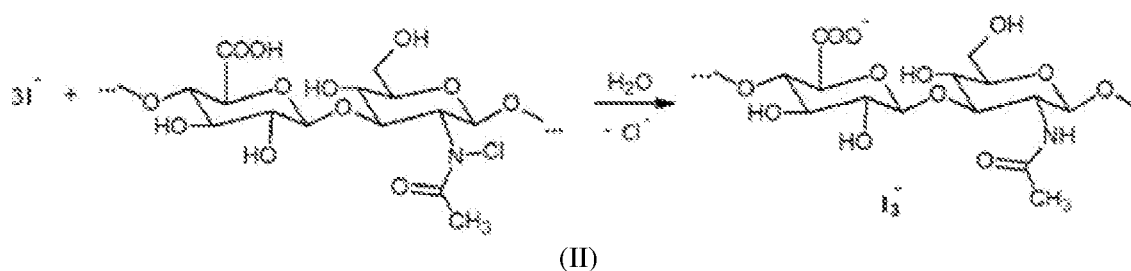
Tato kombinace je obecně žádoucí pro vnější i vnitřní aplikace vyžadující antimikrobiální a současně biokompatibilní kryty ran, výplně, antiadhezní přepážky, membrány, kapsy nebo obaly.

Tento vynález řeší přípravu a použití stabilních, biokompatibilních a biodegradovatelných kompozic obsahujících chloramid hyaluronanu a jodid, které po aplikaci díky přítomnosti chloru a jodu v oxidačních stupních vyšším než -1 vykazují širokospektrální antimikrobiální, antivirální a současně i hojivé účinky. Dále popisuje přípravu široké škály forem s velkou variabilitou velikosti povrchu a doby degradace.

### Podstata vynálezu

Předmětem vynálezu jsou kompozice obsahující jodid a derivát kyseliny hyaluronové, ve kterém je většina atomů vodíků amidické skupiny -NH-CO- nahrazena za atomy chloru -NCl-CO-, přičemž výrazem „většina“ se míní 50 až 100 %. Takto modifikovaný polymer - chloramid hyaluronanu - v roztoku rychle reaguje s jodidy (druhou částí kompozice) za vzniku sloučenin jodu s oxidačním stupněm vyšším než -1, jako například  $I_3^-$  nebo  $I_2$ , a nativní kyseliny

hyaluronové. Reakci popisuje následující schéma II.



5

Finální kompozice mohou zahrnovat i modifikovanou kyselinu hyaluronovou s chemickou modifikací na karboxylové a/nebo hydroxylové skupině.

Derivátem kyseliny hyaluronové může být i chloramid modifikované kyseliny hyaluronové, kde vodíky amidické skupiny -NH-CO- jsou substituovány atomy chloru podle strukturního vzorce -NCl-CO-, a současně má chloramid některé -OH skupiny nahrazeny skupinou -O-CO-R<sup>2</sup> a/nebo některé -CH<sub>2</sub>-OH skupiny nahrazeny za skupinu -CH=O a/nebo některé CO-OH skupiny nahrazeny skupinou -CO-OR<sup>2</sup>, kde R<sup>2</sup> je lineární nebo aromatický řetězec s obsahem uhlíků C<sub>1</sub> – C<sub>17</sub>. Příklady chloramidů modifikované kyseliny hyaluronové zahrnují ethylester, benzyl ester, lauroyl, formyl, palmitoyl, hexanoyl. Jodid je s výhodou vybrán ze skupiny zahrnující jodid sodný, jodid draselný, jodid vápenatý a jodid hořečnatý nebo jejich směs. Polysacharid, tj. chloramid, má s výhodou molekulovou hmotnost v rozmezí 5 až 500 kg.mol<sup>-1</sup>. Molární poměr chloramidu k jodidu v kompozici je s výhodou v rozmezí 1:1 až 1:5

Antimikrobiální kompozice může obsahovat i aditivum, a to v koncentraci maximálně 90 % hmotn., přičemž toto aditivum je vybráno ze skupiny zahrnující polyethylen oxid, vodu, chlorid sodný, chlorid vápenatý, glycerol, kyselinu hyaluronovou, chondroitin sulfát, kyselinu hyaluronovou modifikovanou ve formě esterů, kyselinu hyaluronovou modifikovanou ve formě aldehydů, alginát sodný, karboxymethyl celulózu, oxycelulózu, hydroxyethyl celulózu, estery mastných kyselin, chlorid sodný, chlorid draselný nebo chlorid vápenatý. Výše uvedená modifikovaná kyselina hyaluronová má některé OH skupiny nahrazeny skupinou -O-CO-R<sup>2</sup> a/nebo některé -CH<sub>2</sub>-OH skupiny nahrazeny za skupinu -CH=O a/nebo některé -CO-OH skupiny nahrazeny skupinou -CO-OR<sup>2</sup>, kde R<sup>2</sup> je lineární nebo aromatický řetězec s obsahem uhlíků C<sub>1</sub> – C<sub>17</sub>.

30

Chloramid hyaluronanu se připraví prostřednictvím činidel obsahujících chlor vázaný na dusík, s výhodou pomocí trichlorisokyanurové kyseliny nebo pomocí solí dichlorisokyanurové kyseliny. Příprava (modifikace) je uskutečněna ve vodě při pH 2,5-7,5, s výhodou při pH 4,0 až 6,0. Nižšího pH je dosaženo přidáním kyseliny octové v množství 0,2 až 7 ekv, s výhodou 2 - 4 ekv. Jako výchozí substrát lze použít kyselinu hyaluronovou, nebo její chemicky modifikovaný derivát o molekulové hmotnosti 40 až 2200 kg.mol<sup>-1</sup>. Příprava finálních kompozic pak dále zahrnuje tvorbu:

35

- pevných forem s obsahem jodidů a chloramidu hyaluronanu, které mohou být připraveny v podobě například samonosných filmů, lyofilizátů, vrstev ze staplových vláken (netkaná textilie), nekonečných vláken, tkanin, pletenin, splétaných textilií nebo vrstvy nanovláken, ve všech případech volitelně s obsahem dalších aditiv, přičemž zastoupení chloramidu ve finální kompozici v přepočtu na suchý materiál je v rozsahu 10 až 90 % a zastoupení jodidu v přepočtu na suchý materiál je v rozsahu 10 až 90 %, a přičemž pevná forma může být tvořena i dvěma nebo více různými vrstvami, které jsou k sobě slisovány;

45

- kapalných nebo gelových forem volitelně s obsahem dalších aditiv, kde je složka s obsahem jodidů oddělena od složky s obsahem chloramidu hyaluronanu a tyto složky se smíchají až těsně před finální aplikací, přičemž zastoupení chloramidu ve finální kompozici v přepočtu

na suchý materiál je v rozsahu 10 až 90 % a zastoupení jodidu ve finální kompozici v přepočtu na suchý materiál je v rozsahu 10 až 90 %.

5 Dále se vynález týká použití finální kompozice hlavně v oblastech, kde jsou vyžadovány následující vlastnosti, nebo jejich libovolné kombinace:

- oxidační nebo antimikrobiální nebo antifungální nebo antivirální aktivita
- biokompatibilita a biodegradovatelnost
- možnost přípravy různých forem s vyhovující stabilitou
- 10 - významná podpora procesu hojení
- kontrola řízení rychlosti biodegradace

Finální kompozice lze použít v biomedicínských aplikacích například jako kryty ran, implantabilní zdravotnické přípravky, přípravky proti akné, antibakteriální výplně, antiadhezní  
15 přepážky, membrány, kapsy, obaly, přípravky pro prevenci vzniku srůstů po provedení anastomóz, přípravky působící preventivně proti dehiscencím, nebo v kombinaci s jinými látkami prostředky pro plastiku defektů břišní stěny.

Kontrolu řízení rychlosti biodegradace finální kompozice lze docílit buď kombinací chloramidu  
20 hyaluronanu s aditivou s pomalejší degradabilitou, například s alginátem sodným nebo karboxymethyl celulózu, a/nebo síťováním samotného chloramidu hyaluronanu například pomocí vícevalentních kationtů typu  $\text{Ca}^{2+}$ .

Tento vynález tedy řeší přípravu a použití stabilních, biokompatibilních a biodegradovatelných  
25 kompozic obsahujících jodidy, jako je jodid draselný nebo sodný nebo vápenatý nebo hořečnatý nebo jejich směs, a chloramid hyaluronanu, které vykazují antimikrobiální a současně i hojivé účinky. Dále popisuje přípravu široké škály forem s velkou variabilitou velikosti povrchu, mechanických, případně reologických vlastností a doby degradace.

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

### Objasnění výkresů

35 Obr. 1A, Obr. 1B - Antimikrobiální aktivita kompozice ve formě lyofilizátu na bázi chloramidu hyaluronanu a jodidu draselného připraveného podle Příkladu 20.

Obrázky zobrazují inhibici růstu mikroorganismů *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*,  
40 *Pseudomona aeruginosa*, *Candida albicans* (vše Obr. 1A), *Staphylococcus epidermidis* (Obr. 1B) v přítomnosti kompozice obsahující kombinaci rozpustných lyofilizátů na bázi chloramidu hyaluronanu a rozpustných lyofilizátů obsahující směs hyaluronanu a jodidu draselného v poměru 5/1 připravených podle příkladu 20 (dvě opakování: vlevo a uprostřed) v porovnání s kontrolou (vpravo), kterou byl lyofilizát z nativní kyseliny hyaluronové s přídavkem jodidu draselného v poměru 5/1 připraveného podle příkladu 19. Na Obr. 1B je srovnání jednoho  
45 opakování (vlevo) a kontroly (vpravo).

Postup stanovení antimikrobiální aktivity je popsán v příkladu 43.

### Příklady uskutečnění vynálezu

DS = stupeň substituce =  $100 \% \cdot (\text{molární množství modifikovaných jednotek polymeru}) / (\text{molární množství všech jednotek polymeru})$

55

Zde používaný výraz ekvivalent (ekv) se vztahuje na opakující se jednotku příslušného polysacharidu, není-li uvedeno jinak, například na dimer kyseliny hyaluronové.

Procenta se uvádějí jako hmotnostní procenta, pokud není uvedeno jinak.

5

Molekulová hmotnost polymerů je hmotnostně střední stanovená pomocí metody SEC-MALLS.

#### Příklad 1

#### 10 Příprava ethylesteru hyaluronanu

Do roztoku hyaluronanu (1 g, 300 kg.mol<sup>-1</sup>) ve 40 ml vody se přidal NaOH až do pH = 9. Pak se přidalo 20 ml dimethylsulfoxidu a 0,08 ml ethyljodidu a směs se míchala 3 dny při 45 °C. Výsledná směs pak byla srážena 140 ml 100% isopropanolu, odfiltrovaná tuhá látka byla promyta isopropanolem a sušena ve vakuu. Produkt (897 mg) byl analyzován pomocí NMR. DS esteru 6 % (stanoveno NMR, lit. Kettou S. a kol. PV 2009-399).

15

#### Příklad 2

#### 20 Příprava benzylesteru hyaluronanu

Do roztoku hyaluronanu (1 g, 300 kg.mol<sup>-1</sup>) ve 40 ml vody se přidal NaOH až do pH = 9. Pak se přidalo 20 ml dimethylsulfoxidu a 0,08 ml benzylbromidu a směs se míchala 4 dny při 20 °C. Výsledná směs pak byla srážena 140 ml 100% isopropanolu, odfiltrovaná tuhá látka byla promyta isopropanolem a sušena ve vakuu. Finální produkt získaný v množství 920 mg byl analyzován pomocí NMR.

25

DS esteru 3 % (stanoveno NMR, lit. Kettou a kol. PV 2009-399).

#### 30 Příklad 3

#### Příprava lauroyl hyaluronanu

Do roztoku hyaluronanu (5 g, 250 kg.mol<sup>-1</sup>) ve 100 ml destilované vody bylo přidáno 70 ml tetrahydrofuranu, 4 ekvivalenty triethylaminu a 0,1 ekvivalentu 4-dimethylaminopyridinu. Paralelně byla rozpuštěna kyselina laurová (4 ekvivalenty) ve 30 ml tetrahydrofuranu a 7 ml triethylaminu a do tohoto roztoku bylo přidáno 4,8 ml ethyl-chloroformiátu při 0-5 °C po dobu 15 minut. Vzniklá suspenze byla přefiltrována do roztoku hyaluronanu a reakční směs byla míchána 5 hodin při 20 °C. Výsledný roztok byl pak srážen přídatkem 400 ml 100% isopropanolu, promyt 80% isopropanolem, pak 100% isopropanolem. Sraženina byla pak sušena při 40 °C 2 dny. Stupeň substituce byl stanoven z NMR na 37 %.

40

#### Příklad 4

#### 45 Příprava formyl hyaluronanu

Do jednoroztokového vodného roztoku HA (1 g, 200 kg.mol<sup>-1</sup>), s obsahem NaCl 1%, KBr 1%, N-acetylamo-TEMPO (0,01 ekv) a NaHCO<sub>3</sub> (20 ekv.), se postupně přidával vodný roztok NaClO (0,5 ekv) pod dusíkem. Směs se míchala 12 h při teplotě 10 °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% NHCO<sub>3</sub>) 3-krát 5 litrů (1 x denně) a pak oproti destilované vodě 7-krát 5 litrů (2 x denně). Výsledný roztok byl nakonec odpařen a analyzován. DS 9% (stanoveno z NMR)

50

## Příklad 5

## Příprava chloramidu hyaluronanu

5

5 g hyaluronanu ( $M_w$  2200 kg.mol<sup>-1</sup>) bylo rozpuštěno ve 250 ml destilované vody. Pak byly přidány 2 ml kyseliny octové a po 15 minutách míchání při 20 °C bylo přidáno 3,2 g (1 ekv.) sodné soli dichlorisokyanurové kyseliny. Směs byla pak 24 hodin míchána při 20 °C, pak srážena 2,5 litrem isopropanolu a filtrována. Tuhý podíl byl promyt 2 litry isopropanolu a sušen ve vakuu 20 hodin. DS 82% (stanoveno z NMR).

10

## Příklad 6

## Příprava chloramidu hyaluronanu

15

5 g hyaluronanu ( $M_w$  40 kg.mol<sup>-1</sup>) bylo rozpuštěno ve 100 ml destilované vody. Pak byly přidány 2 ml kyseliny octové a po 15 minutách míchání při 20 °C bylo přidáno 3,2 g (1 ekv.) sodné soli dichlorisokyanurové kyseliny. Směs byla pak 24 hodin míchána při 20 °C, pak srážena 2,5 litrem isopropanolu a filtrována. Tuhý podíl byl promyt 2 litry isopropanolu a sušen ve vakuu 20 hodin. DS 83% (stanoveno z NMR).

20

## Příklad 7

## Příprava chloramidu hyaluronanu

25

5 g hyaluronanu ( $M_w$  2200 kg.mol<sup>-1</sup>) bylo rozpuštěno v 1000 ml destilované vody. Pak byly přidány 2 ml kyseliny octové a po 15 minutách míchání při 20 °C bylo přidáno 3,2 g (1 ekv.) sodné soli dichlorisokyanurové kyseliny. Směs byla pak 24 hodin míchána při 20 °C, pak srážena 2,5 litrem isopropanolu a filtrována. Tuhý podíl byl promytý 2 litry isopropanolu a sušen ve vakuu 20 hodin. DS 72% (stanoveno z NMR).

30

## Příklad 8

## Příprava chloramidu hyaluronanu

35

5 g hyaluronanu ( $M_w$  2200 kg.mol<sup>-1</sup>) bylo rozpuštěno ve 250 ml destilované vody. Pak bylo přidáno 0,14 ml kyseliny octové (0,2 ekv) a po 15 minutách míchání při 20 °C bylo přidáno 3,2 g (1 ekv.) sodné soli dichlorisokyanurové kyseliny. Směs byla pak 24 hodin míchána při 20 °C, pak srážena 2,5 litrem isopropanolu a filtrována. Tuhý podíl byl promyt 2 litry isopropanolu a sušen ve vakuu 20 hodin. DS 53% (stanoveno z NMR).

40

## Příklad 9

## Příprava chloramidu hyaluronanu

45

5 g hyaluronanu ( $M_w$  180 kg.mol<sup>-1</sup>) bylo rozpuštěno ve 250 ml destilované vody. Pak byly přidány 3 ml kyseliny octové a po 15 minutách míchání při 20 °C bylo přidáno 3,2 g (1 ekv.) sodné soli dichlorisokyanurové kyseliny. Směs byla pak 24 hodin míchána při 20 °C, pak srážena 2,5 litrem isopropanolu a filtrována. Tuhý podíl byl promyt 2 litry isopropanolu a sušen ve vakuu 20 hodin. DS 83% (stanoveno z NMR).

50

## Příklad 10

## Příprava chloramidu hyaluronanu

55

5 g hyaluronanu ( $M_w$  2200 kg.mol<sup>-1</sup>) bylo rozpuštěno ve 250 ml destilované vody. Pak bylo přidáno 5 ml kyseliny octové (7 ekv) a po 15 minutách míchání při 20 °C bylo přidáno 3,2 g (1 ekv.) sodné soli dichlorisokyanurové kyseliny. Směs byla pak 24 hodin míchána při 20 °C, pak srážena 2,5 litrem isopropanolu a filtrována. Tuhý podíl byl promyt 2 litry isopropanolu a sušen ve vakuu 20 hodin. DS 95% (stanoveno z NMR).

#### Příklad 11

##### Příprava chloramidu hyaluronanu

5 g hyaluronanu ( $M_w$  2200 kg.mol<sup>-1</sup>) bylo rozpuštěno ve 250 ml destilované vody. Pak byly přidány 2 ml kyseliny octové a po 15 minutách míchání při 20 °C bylo přidáno 1,07 g (0,33 ekv.) sodné soli dichlorisokyanurové kyseliny. Směs byla pak 24 hodin míchána při 20 °C, pak srážena 2,5 litrem isopropanolu a filtrována. Tuhý podíl byl promyt 2 litry isopropanolu a sušen ve vakuu 20 hodin. DS 51% (stanoveno z NMR).

#### Příklad 12

##### Příprava chloramidu hyaluronanu

5 g hyaluronanu ( $M_w$  2200 kg.mol<sup>-1</sup>) bylo rozpuštěno ve 250 ml destilované vody. Pak byly přidány 2 ml kyseliny octové a po 15 minutách míchání při 20 °C bylo přidáno 4,8 g (1,5 ekv.) sodné soli dichlorisokyanurové kyseliny. Směs byla pak 24 hodin míchána při 20 °C, pak srážena 2,5 litrem isopropanolu a filtrována. Tuhý podíl byl promyt 2 litry isopropanolu a sušen ve vakuu 20 hodin. DS 96% (stanoveno z NMR).

#### Příklad 13

##### Příprava chloramidu hyaluronanu

5 g hyaluronanu ( $M_w$  2200 kg.mol<sup>-1</sup>) bylo rozpuštěno ve 250 ml destilované vody. Pak byly přidány 2 ml kyseliny octové a po 15 minutách míchání při 20 °C bylo přidáno 2,91 g (1 ekv.) trichlorisokyanurové kyseliny. Směs byla pak 24 hodin míchána při 20 °C, pak srážena 2,5 litrem isopropanolu a filtrována. Tuhý podíl byl promyt 2 litry isopropanolu a sušen ve vakuu 20 hodin. DS 97% (stanoveno z NMR).

#### Příklad 14

##### Příprava chloramidu hyaluronanu

5 g hyaluronanu ( $M_w$  2200 kg.mol<sup>-1</sup>) bylo rozpuštěno ve 250 ml destilované vody. Pak byly přidány 2 ml kyseliny octové a po 15 minutách míchání při 20 °C bylo přidáno 0,87 g (0,3 ekv.) trichlorisokyanurové kyseliny. Směs byla pak 24 hodin míchána při 20 °C, pak srážena 2,5 litrem isopropanolu a filtrována. Tuhý podíl byl promyt 2 litry isopropanolu a sušen ve vakuu 20 hodin. DS 71% (stanoveno z NMR).

#### Příklad 15

##### Příprava chloramidu hyaluronanu

5 g hyaluronanu ( $M_w$  2200 kg.mol<sup>-1</sup>) bylo rozpuštěno ve 250 ml destilované vody. Pak byly přidány 2 ml kyseliny octové a po 15 minutách míchání při 20 °C bylo přidáno 3,2 g (1 ekv.) sodné soli dichlorisokyanurové kyseliny. Směs byla pak 5 hodin míchána při 20 °C, pak srážena 2,5 litrem isopropanolu a filtrována. Tuhý podíl byl promyt 2 litry isopropanolu a sušen ve vakuu 20 hodin. DS 52% (stanoveno z NMR).

## Příklad 16

## Příprava chloramidu hyaluronanu

5

5 g hyaluronanu ( $M_w 2200 \text{ kg.mol}^{-1}$ ) bylo rozpuštěno ve 250 ml destilované vody. Pak byly přidány 2 ml kyseliny octové a po 15 minutách míchání při 20 °C bylo přidáno 3,2 g (1 ekv.) sodné soli dichlorisokyanurové kyseliny. Směs byla pak 48 hodin míchána při 20 °C, pak srážena 2,5 litrem isopropanolu a filtrována. Tuhý podíl byl promyt 2 litry isopropanolu a sušen ve vakuu 20 hodin. DS 85% (stanoveno z NMR). NMR roztok (7mg produktu v 0,7ml  $D_2O$ ) byl měřen po dalších 5 dnech stání při 20 °C. DS bylo stanoveno na 84%. Tuhý podíl ve formě prášku stál při 20 °C 100 dnů, pak byl vzorek rozpuštěn v  $D_2O$ . DS bylo stanoveno na 84%.

10

## Příklad 17

15

## Příprava chloramidu hyaluronanu

5 g hyaluronanu ( $M_w 2200 \text{ kg.mol}^{-1}$ ) bylo rozpuštěno ve 250 ml destilované vody. Pak byly přidány 2 ml kyseliny octové a po 15 minutách míchání při 20 °C bylo přidáno 3,2 g (1 ekv.) sodné soli dichlorisokyanurové kyseliny. Směs byla pak 72 hodin míchána při 5 °C, pak srážena litrem isopropanolu a filtrována. Tuhý podíl byl promyt 2 litry isopropanolu a sušen ve vakuu 20 hodin. DS 64% (stanoveno z NMR).

20

## Příklad 18

25

## Příprava chloramidu hyaluronanu

5 g hyaluronanu ( $M_w 2200 \text{ kg.mol}^{-1}$ ) bylo rozpuštěno ve 250 ml destilované vody. Pak byly přidány 2 ml kyseliny octové a po 15 minutách míchání při 20 °C bylo přidáno 3,2 g (1 ekv.) sodné soli dichlorisokyanurové kyseliny. Směs byla pak 5 hodin míchána při 40 °C, pak srážena litrem isopropanolu a filtrována. Tuhý podíl byl promyt 2 litry isopropanolu a sušen ve vakuu 20 hodin. DS 75% (stanoveno z NMR).

30

## Příklad 19

35

## Příprava lyofilizátu hyaluronanu s jodidem draselným

Roztok 1 g hyaluronanu ( $M_w 2200 \text{ kg.mol}^{-1}$ ) v 50 ml destilované vody byl smíchán s roztokem 0,2 g jodidu draselného v 5 ml destilované vody a směs se míchala 10 minut. Pak byl výsledný roztok zamražen při -50 °C a lyofilizován.

40

## Příklad 20

## Příprava lyofilizátu (chloramid hyaluronanu + hyaluronan + jodid draselný) - generátor jodu

45

15 mg lyofilizátu připraveného podle příkladu 19 a 15 mg lyofilizátu připraveného podle příkladu 25 bylo přeloženo na sebe (spodní vrstva - lyofilizát podle příkladu 19) a mechanicky slisováno pomocí hladkého skleněného válce, který byl aplikován po dobu 1 minuty při 20 °C. Výsledný materiál byl skladován v suchých podmínkách.

50

## Příklad 20a

## Příprava lyofilizátu (chloramid hyaluronanu + hyaluronan + jodid draselný) - generátor jodu

30 mg lyofilizátu připraveného podle příkladu 19 a 3 mg lyofilizátu připraveného podle příkladu

55

25 bylo přeloženo na sebe (spodní vrstva - lyofilizát podle příkladu 19) a mechanicky slisováno pomocí hladkého skleněného válce, který byl aplikován po dobu 1 minuty při 20 °C. Výsledný materiál byl skladován v suchých podmínkách.

#### 5 Příklad 20b

Příprava lyofilizátu (chloramid hyaluronanu + hyaluronan + jodid draselný) - generátor jodu

10 3 mg lyofilizátu připraveného podle příkladu 19 a 30 mg lyofilizátu připraveného podle příkladu 25 bylo přeloženo na sebe (spodní vrstva - lyofilizát podle příkladu 19) a mechanicky slisováno pomocí hladkého skleněného válce, který byl aplikován po dobu 1 minuty při 20 °C. Výsledný materiál byl skladován v suchých podmínkách.

#### Příklad 21

15

Příprava samonosného filmu (chloramid hyaluronanu + lauroyl hyaluronát + jodid draselný) - generátor jodu

20 Samonosné filmy připravené podle příkladů 31 a 32 byly přeloženy na sebe (spodní vrstva - lauroyl hyaluronát + jodid draselný) a mechanicky slisovány pomocí hladkého skleněného válce, který byl aplikován po dobu 1 minuty při 20 °C. Výsledný materiál byl skladován v suchých podmínkách.

#### Příklad 22

25

Příprava chloramidu ethyl esteru hyaluronanu

30 0,5 g ethylesteru hyaluronanu připraveného podle příkladu 1 bylo rozpuštěno ve 25 ml destilované vody. Pak byly přidány 0,2 ml kyseliny octové a po 15 minutách míchání při 20 °C bylo přidáno 0,32 g (1 ekv.) sodné soli dichlorisokyanurové kyseliny. Směs byla pak 24 hodin míchána při 20 °C, pak srážena 250 ml isopropanolu a filtrována. Tuhý podíl byl promyt 0,2 litry isopropanolu a sušen ve vakuu 20 hodin. DS 80% (stanoveno z NMR).

#### Příklad 23

35

Příprava chloramidu benzyl esteru hyaluronanu

40 0,5 g benzylesteru hyaluronanu připraveného podle příkladu 2 bylo rozpuštěno ve 25 ml destilované vody. Pak byly přidány 0,2 ml kyseliny octové a po 15 minutách míchání při 20 °C bylo přidáno 0,32 g (1 ekv.) sodné soli dichlorisokyanurové kyseliny. Směs byla pak 24 hodin míchána při 20 °C, pak srážena 0,25 litru isopropanolu a filtrována. Tuhý podíl byl promyt 0,2 litry isopropanolu a sušen ve vakuu 20 hodin. DS 78% (stanoveno z NMR).

#### Příklad 24

45

Příprava chloramidu formyl hyaluronanu

50 0,5 g formylu hyaluronanu připraveného podle příkladu 4 bylo rozpuštěno ve 25 ml destilované vody. Pak byly přidány 0,2 ml kyseliny octové a po 15 minutách míchání při 20 °C bylo přidáno 0,32 g (1 ekv.) sodné soli dichlorisokyanurové kyseliny. Směs byla pak 24 hodin míchána při 20 °C, pak srážena 0,25 litru isopropanolu a filtrována. Tuhý podíl byl promyt 0,2 litry isopropanolu a sušen ve vakuu 20 hodin. DS 75% (stanoveno z NMR).

## Příklad 25

## Příprava lyofilizátu chloramidu hyaluronanu

5

Roztok 1 g chloramidu hyaluronanu připraveného podle příkladu 16 v 50 ml destilované vody byl po homogenizaci hned zamražen při  $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$  a lyofilizován. DS bylo stanoveno pomocí NMR na 83 %.

10

## Příklad 26

## Příprava lyofilizátu chloramidu ethyl esteru hyaluronanu

15

Roztok 0,2 g chloramidu ethyl esteru hyaluronanu připraveného podle příkladu 22 v 10 ml destilované vody byl po homogenizaci hned zamražen při  $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$  a lyofilizován. DS bylo stanoveno pomocí NMR na 68 %.

## Příklad 27

20

## Příprava lyofilizátu chloramidu benzyl esteru hyaluronanu

Roztok 0,2 g chloramidu benzyl esteru hyaluronanu připraveného podle příkladu 23 v 10 ml destilované vody byl po homogenizaci hned zamražen při  $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$  a lyofilizován. DS bylo stanoveno pomocí NMR na 67 %.

25

## Příklad 28

## Příprava netkané textilie ze staplových vláken z chloramidu hyaluronanu

30

K přípravě 2 % roztoku byl použit chloramid hyaluronan (příklad 14) se stupněm substituce 71 % NMR. Tato složka byla navážena a v potřebném množství doplněna destilovanou vodou. Celá směs byla promíchávána na míchačce při pokojové teplotě při nastavených otáčkách 500 RPM po dobu míchání 24 hodin. Výsledný roztok byl čirý, mírně viskózní. Způsob přípravy staplových vláken je založen na srážení polymerního roztoku v proudu mobilní koagulační lázně obsahující 100 % isopropanol. Roztok byl dávkován při pokojové teplotě skrz extruzní trysky do proudu koagulační lázně skrz zvlákňovací trubice (1 trubice/průměr 8 mm), při nastavené průtočné rychlosti lázně 1,15 m/s. Srážením bylo docíleno tvorby staplových vláken. Vzniklá vlákna byla unášena v proudu lázně a zachytávána na separačních hřebíncích, přenesena do zrací lázně s obsahem 100 % isopropanolu. Surová vlákna ve zrací lázni byla hned pomleta v mixéru s rotujícími čepelemi při poměru 0,5 g vláken na 350 ml zrací lázně. Výsledná vláknenná disperze byla přefiltrována přes porézní substrát přes filtrační rám. V daném experimentu byl použit rám o velikosti  $64\text{ cm}^2$ . Přefiltrovaná vlákna byla pomocí PAD pleteniny přenesena na sušicí zařízení s fixací netkané textilie. Před vložením na sušicí zařízení byly pomocí válečku odstraněny zbytky srážedla. Netkaná textilie byla sušena při teplotě  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  po dobu 30 minut. Výsledná vrstva byla ze substrátu oddělena jako samostatná vrstva a zvážena na analytických vahách. Plošná hmotnost textilie činila  $50,2\text{ g/m}^2$ . Stupeň substituce byl u vzniklé netkané textilie stanoven pomocí NMR na 64 %.

45

## Příklad 29

50

## Příprava nanovláknenné vrstvy z chloramidu hyaluronanu

Pro přípravu nanovláknenné vrstvy s obsahem kyseliny hyaluronové byl připraven vodný roztok s následujícím složením. Koncentrace chloramidu hyaluronanu připraveného postupem 5 v sušině byla 37,5 %, koncentrace nativního hyaluronanu o molekulové hmotnosti  $80\text{ kg}\cdot\text{mol}^{-1}$  byla

55

37,5 %, polyethylenoxid o molekulové hmotnosti  $600 \text{ kg.mol}^{-1}$  tvořil 25 %. Celková koncentrace sušiny byla 5 %. Roztok byl naplněn do stříkačky a elektrostaticky zvlákněn na deskový kolektor za použití bezjehlové lineární trysky, napětí 50 kV a vzdálenosti 16 cm mezi emitorem a kolektorem. Vlákna mají rozměr  $110 \pm 27 \text{ nm}$ . DS bylo stanoveno pomocí NMR na 30 %.

5

#### Příklad 29a

Příprava nanovláknenné vrstvy z hyaluronanu s jodidem draselným

- 10 Pro přípravu nanovláknenné vrstvy s obsahem kyseliny hyaluronové byl připraven vodný roztok s následujícím složením. Koncentrace nativního hyaluronanu o molekulové hmotnosti  $80 \text{ kg.mol}^{-1}$  byla 62,5 %, polyethylenoxid o molekulové hmotnosti  $600 \text{ kg.mol}^{-1}$  tvořil 25 %, a KI tvořil 12,5 %. Celková koncentrace sušiny byla 5 %. Roztok byl naplněn do stříkačky a elektrostaticky zvlákněn na deskový kolektor za použití bezjehlové lineární trysky, napětí 56 kV a vzdálenosti
- 15 18 cm mezi emitorem a kolektorem. Vlákna mají rozměr  $140 \pm 35 \text{ nm}$ .

#### Příklad 30

Příprava samonosného filmu z chloramidu hyaluronanu

20

- Příprava filmu probíhala ve specializovaném sušicím zařízení, kde byl film sušen v uzavřeném prostoru. Zařízení je vybaveno spodní a horní deskou s regulovatelnou teplotou. Zařízení je blíže popsáno v (Foglarová a kol. PV201S-166; Foglarová M. a kol. *Carbohydrate Polymers* 2016, 144, 68-75). Navážka 200 mg chloramidu hyaluronanu popsaného v příkladu 5 byla rozpuštěna
- 25 ve 20 ml demi-vody a nechána míchat 2 hodiny. Poté byl roztok nadávkován do sušicího zařízení na podložku (hydrofobizované sklo) a usušen v uzavřeném prostoru při teplotě spodní desky  $50^\circ\text{C}$  a teplotě horní desky  $20^\circ\text{C}$ . Doba sušení byla 18 hodin. Po usušení byl film sejmут z podložky a uchován pro další použití. DS bylo stanoveno pomocí NMR na 60 %.

30

#### Příklad 31

Příprava samonosného filmu z hyaluronanu a jodidu draselného (10/1)

- Příprava filmu probíhala v zařízení popsaném v příkladu 30. Navážka 160 mg hyaluronanu
- 35 sodného a 16 mg jodidu draselného byla rozpuštěna v 16 ml vody a nechána míchat 15 minut. Poté byl výsledný směsný roztok nadávkován do sušicího zařízení na podložku (hydrofobizované sklo) a usušen v uzavřeném prostoru při teplotě spodní desky  $50^\circ\text{C}$  a teplotě horní desky  $20^\circ\text{C}$ . Doba sušení byla 7 hodin. Po usušení byl film sejmут z podložky a uchován pro další použití.

40

#### Příklad 32

Příprava samonosného filmu z lauroyl hyaluronanu a chloramidu hyaluronanu (3/1)

- Příprava filmu probíhala v zařízení popsaném v příkladu 30. Navážka 150 mg lauroyl derivátu
- 45 hyaluronanu sodného popsaného v příkladu 3 byla rozpuštěna v 15 ml vodného roztoku 2-propanolu (50 % w/w) a nechána míchat 18 hodin. Navážka 50 mg chloramidu hyaluronanu popsaného v příkladu 5 byla rozpuštěna v 5 ml demi-vody a nechána míchat 2 hodiny. Oba roztoky byly poté smíseny a nechány míchat 30 minut. Poté byl výsledný směsný roztok nadávkován do sušicího zařízení na podložku (hydrofobizované sklo) a usušen v uzavřeném
- 50 prostoru při teplotě spodní desky  $50^\circ\text{C}$  a teplotě horní desky  $20^\circ\text{C}$ . Doba sušení byla 7 hodin. Po usušení byl film sejmут z podložky a uchován pro další použití. DS chloramidu hyaluronanu ve výsledném materiálu bylo stanoveno pomocí NMR na 25 %.

## Příklad 33

Příprava nanovláknenné vrstvy (chloramid hyaluronanu + hyaluronan + jodid draselný) - generátor jodu

Nanovláknenné vrstvy připravené podle příkladů 29 a 29a byly přeloženy na sebe (spodní vrstva - hyaluronan + jodid draselný). Materiál byl skladován v suchých podmínkách.

## Příklad 34

Příprava dvousložkové směsi ve formě roztoku (chloramid hyaluronanu + jodid sodný 1/1) - generátor jodu

Roztok s obsahem 100 mg chloramidu hyaluronanu připraveného podle příkladu 5 ve 3 ml destilované vody byl smíchán těsně před aplikací pomocí statického mixéru s roztokem obsahujícím 29 mg jodidu sodného v 1 ml destilované vody. Ve výsledné směsi okamžitě vzniká oranžový trijodid a jod.

## Příklad 35

Příprava dvousložkové směsi ve formě gelu (chloramid hyaluronanu + jodid vápenatý 1/5) - generátor jodu

Roztok s obsahem 100 mg chloramidu hyaluronanu připraveného podle příkladu 5 v 6 ml destilované vody byl smíchán těsně před aplikací pomocí statického mixéru s roztokem obsahujícím 758 mg nativního hyaluronanu o molekulové hmotnosti  $1900 \text{ kg} \cdot \text{mol}^{-1}$  a 142 mg jodidu vápenatého v 35 ml destilované vody. Ve výsledné viskózní směsi okamžitě vzniká oranžový trijodid a jod.

## Příklad 36

Příprava lyofilizátu oxycelulóza/chloramid hyaluronanu

Roztok oxycelulózy (0,3 g,  $M_w 50 \text{ kg} \cdot \text{mol}^{-1}$ ) a chloramidu hyaluronanu (0,1 g) připraveného podle postupu 5 ve 100 ml destilované vody byl po homogenizaci hned zamražen při  $-50^\circ\text{C}$  a lyofilizován. DS chloramidu hyaluronanu bylo stanoveno pomocí NMR na 24 %.

## Příklad 37

Příprava lyofilizátu alginát/ chloramid hyaluronanu

Roztok alginátu (0,3 g,  $M_w 40 \text{ kg} \cdot \text{mol}^{-1}$ ) a chloramidu hyaluronanu (0,1 g) připraveného podle postupu 5 ve 100 ml destilované vody byl po homogenizaci hned zamražen při  $-50^\circ\text{C}$  a lyofilizován. DS chloramidu hyaluronanu bylo stanoveno pomocí NMR na 26 %.

## Příklad 38

Příprava lyofilizátu karboxymethylcelulóza/ chloramid hyaluronanu

Roztok karboxymethyl celulózy (0,3 g,  $M_w 30 \text{ kg} \cdot \text{mol}^{-1}$ ) a chloramidu hyaluronanu (0,03 g) připraveného podle postupu 5 ve 100 ml destilované vody byl po homogenizaci hned zamražen při  $-50^\circ\text{C}$  a lyofilizován. DS chloramidu hyaluronanu bylo stanoveno pomocí NMR na 3 %.

## Příklad 39

## Příprava lyofilizátu chondroitin sulfát/ chloramid hyaluronanu

- 5 Roztok chondroitin sulfátu (0,3 g, Mw 45 kg.mol<sup>-1</sup>) a chloramidu hyaluronanu (0,1 g) připraveného podle postupu 5 ve 100 ml destilované vody byl po homogenizaci hned zamražen při -50 °C a lyofilizován. DS chloramidu hyaluronanu bylo stanoveno pomocí NMR na 25 %.

## Příklad 40

10

## Příprava lyofilizátu hydroxyethyl celulóza/ chloramid hyaluronanu

- 15 Roztok hydroxyethyl celulózy (0,3 g, Mw 35 kg.mol<sup>-1</sup>) a chloramidu hyaluronanu (0,1 g) připraveného podle postupu 5 ve 100 ml destilované vody byl po homogenizaci hned zamražen při -50 °C a lyofilizován. DS chloramidu hyaluronanu bylo stanoveno pomocí NMR na 25 %.

## Příklad 41

## Příprava lyofilizátu formyl hyaluronan / chloramid hyaluronanu

20

Roztok formyl hyaluronanu (0,3 g, Mw 50 kg.mol<sup>-1</sup>) připraveného podle příkladu 4, a chloramidu hyaluronanu (0,1 g) připraveného podle příkladu 5 ve 100 ml destilované vody byl po homogenizaci hned zamražen při -50 °C a lyofilizován. DS chloramidu hyaluronanu bylo stanoveno pomocí NMR na 25 %.

25

## Příklad 42

Příprava lyofilizátu chloramid hyaluronanu síťovaného s CaCl<sub>2</sub>

- 30 Do roztoku chloramidu hyaluronanu (0,1 g) připraveného podle postupu 5, ve 100 ml destilované vody bylo přidáno 0,01g CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O a směs se míchala 1 hodinu při 20°C. Po homogenizaci byl výsledný viskózní roztok zamražen při -50 °C a lyofilizován. DS chloramidu hyaluronanu bylo stanoveno pomocí NMR na 64 %.

## 35 Příklad 43

Testování antimikrobiální aktivity *in vitro* (obrázek 1A a 1B):

- 40 Suspenze jednotlivých testovaných mikroorganismů byly připraveny o přibližné koncentraci 10<sup>5</sup> CFU/ml. Na povrch tryptonsójeového agaru v Petriho miskách bylo vyočkováno 100 µl suspenze (přibližný počet mikroorganismů aplikovaných na misku byl 10<sup>4</sup> CFU). Suspenze byla rovnoměrně rozetřena po povrchu celé misky sterilní kličkou. Po vsáknutí suspenze do agaru byly na jeho povrch sterilně přeneseny testované vzorky ve formě čtverečků. Misky s testovacími kmeny bakterií byly uloženy ke kultivaci při 37 °C na dobu 24 hodin. Byly testovány lyofilizáty s
- 45 chloramidem hyaluronanu a jodidem draselným připravené podle příkladu 20 ve formě čtverečků o hmotnosti 25-35 mg a přibližných rozměrech 15 x 15 mm, přičemž jako kontroly byly použity analogické lyofilizáty bez obsahu chloramidu hyaluronanu připravené podle příkladu 19. Pro testování účinnosti byla zvolena difúzní plotnová metoda (2D uspořádání). Ke kultivaci byla použita neselektivní půda (trypton-sójový agar). Vzorky čtverečků byly testovány na
- 50 mikroorganismech *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida Albicans*, *Pseudomona aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*. Z Obrázku 1 je patrná výrazně vyšší účinnost kompozic podle vynálezu s obsahem chloramidu hyaluronanu s jodidem ve srovnání s kontrolou bez chloramidu hyaluronanu.

55

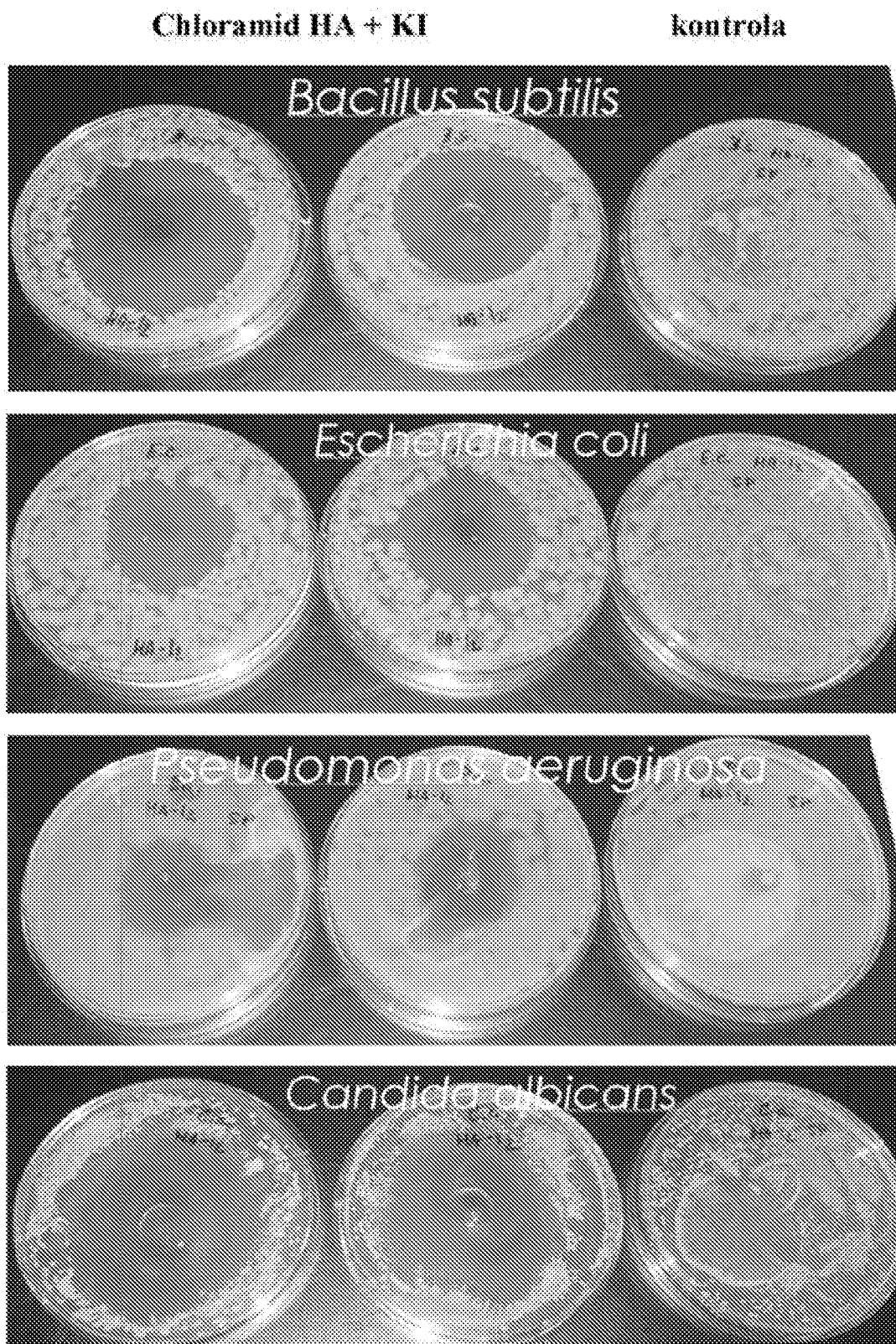
## PATENTOVÉ NÁROKY

- 5 1. Antimikrobiální kompozice obsahující chloramid kyseliny hyaluronové nebomodifikované kyseliny hyaluronové, kde chloramid má vodíky amidické skupiny -NH-CO- substituované atomy chloru podle strukturního vzorce -NCl-CO-, **vyznačující se tím**, že dále obsahuje jodid a že stupeň substituce kyseliny hyaluronové nebo modifikované kyseliny hyaluronové chlorem je 50 % až 100 %, přičemž modifikovaná kyselina hyaluronová je kyselina hyaluronová, která má
- 10 -OH skupiny z části nahrazeny skupinou -O-CO-R2 a/nebo -CH<sub>2</sub>-OH skupiny z části nahrazeny skupinou -CH=O a/nebo CO-OH skupiny z části nahrazeny skupinou -CO-OR<sub>2</sub>, kde R<sub>2</sub> je lineární řetězec s obsahem uhlíků C1 – C17 nebo aromatický řetězec s maximálním obsahem uhlíků C17.
- 15 2. Antimikrobiální kompozice podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že vodíky amidické skupiny -NH-CO- jsou substituovány atomy chloru podle strukturního vzorce -NCl-CO-, a současně má chloramid -OH skupiny z části nahrazeny skupinou -O-CO-R2 a/nebo -CH<sub>2</sub>-OH skupiny z části nahrazeny skupinou -CH=O a/nebo -CO-OH skupiny z části nahrazeny skupinou -CO-OR<sub>2</sub>, kde R<sub>2</sub> je lineární řetězec s obsahem uhlíků C1 – C17 nebo aromatický řetězec s maximálním
- 20 obsahem uhlíků C17.
3. Antimikrobiální kompozice podle nároku 1 nebo 2, **vyznačující se tím**, že modifikovaná kyselina hyaluronová je vybrána ze skupiny zahrnující ethylester, benzyl ester, lauroyl, formyl, palmitoyl, hexanoyl hyaluronan, a jodid je vybrán ze skupiny zahrnující jodid sodný, jodid draselný, jodid vápenatý, jodid hořečnatý a jejich směs.
- 25 4. Antimikrobiální kompozice podle kteréhokoli z nároků 1 až 3, **vyznačující se tím**, že chloramid má molekulovou hmotnost v rozmezí 5 až 500 kg.mol<sup>-1</sup>.
- 30 5. Antimikrobiální kompozice podle kteréhokoli z nároků 1 až 4, **vyznačující se tím**, že molární poměr chloramidu k jodidu v kompozici je v rozmezí 1:1 až 1:5.
6. Antimikrobiální kompozice podle kteréhokoli z předchozích nároků, **vyznačující se tím**, že dále obsahuje aditivum v koncentraci maximálně 90 %hm., kde aditivum je vybráno ze skupiny
- 35 zahrnující vodu, chlorid sodný, chlorid vápenatý, glycerol, kyselinu hyaluronovou, chondroitin sulfát, alginát sodný, oxycelulózu, karboxymethylcelulózu, hydroxyethylcelulózu nebo modifikovanou kyselinu hyaluronovou, která má -OH skupiny z části nahrazeny skupinou -O-CO-R2 a/nebo -CH<sub>2</sub>-OH skupiny z části nahrazeny skupinou -CH=O a/nebo -CO-OH skupiny zčásti nahrazeny skupinou -CO-OR<sub>2</sub>, kde R<sub>2</sub> je lineární řetězec s obsahem uhlíků C1 – C17 nebo
- 40 aromatický řetězec s maximálním obsahem uhlíků C17.
7. Antimikrobiální kompozice podle kteréhokoli z nároků 1 až 5, **vyznačující se tím**, že je ve formě pevného substrátu vybraného ze skupiny zahrnující samonosný film, lyofilizát, vrstvu ze staplových vláken – tzn. netkaná textilie, nekonečné vlákno, tkaninu, pleteninu, splétanou textilií
- 45 nebo vrstvu nanovláken, přičemž zastoupení chloramidu ve finální kompozici v přepočtu na suchý materiál je v rozsahu 10 až 90 % hmotn. a zastoupení jodidu v přepočtu na suchý materiál je v rozsahu 10 až 90 % hmotn.
8. Antimikrobiální kompozice podle nároku 7, **vyznačující se tím**, že je ve formě pevného substrátu tvořeného dvěma nebo více vrstvami vybranými ze skupiny zahrnující samonosný film, lyofilizát, vrstvu ze staplových vláken - tzn. netkaná textilie, nekonečné vlákno, tkaninu, pleteninu, splétanou textilií a vrstvu nanovláken.
- 50 9. Antimikrobiální kompozice podle kteréhokoli z nároků 1 až 5, **vyznačující se tím**, že je ve formě dvou oddělených roztoků nebo gelů určených ke smíchání bezprostředně před aplikací
- 55

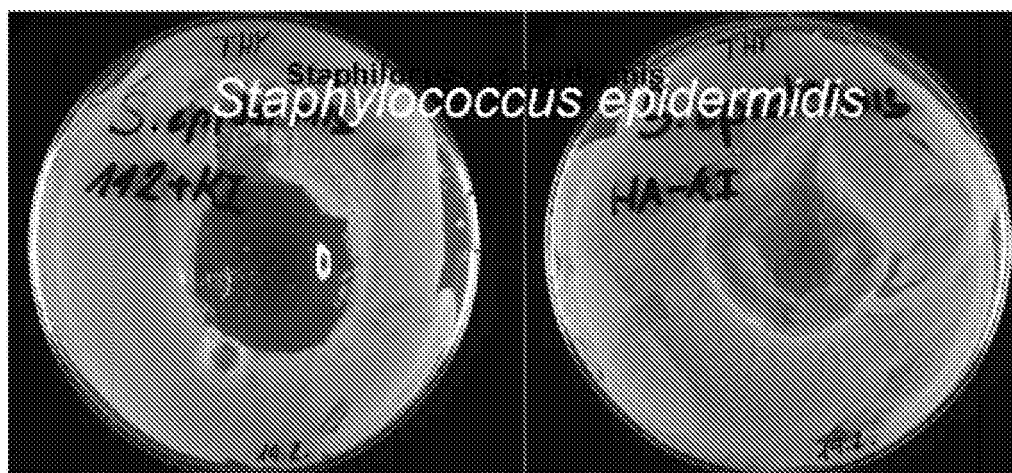
5 finální kompozice, kde chloramid kyseliny hyaluronové nebo chloramid modifikované kyseliny hyaluronové je obsažen v prvním roztoku nebo gelu a jodid je obsažen ve druhém roztoku nebo gelu, přičemž zastoupení chloramidu ve finální kompozici v přepočtu na suchý materiál je v rozsahu 10 až 90 % hmotn. a zastoupení jodidu ve finální kompozici v přepočtu na suchý materiál je v rozsahu 10 až 90 % hmotn.

10 10. Použití antimikrobiální kompozice definované v kterémkoli z nároků 1 až 9 pro přípravu krytů ran nebo pro přípravu implantabilních zdravotnických prostředků, přípravků proti atopické dermatitidě, antibakteriálních výplní, antiadhezních přepážek, membrán, kapes nebo obalů.

2 výkresy



Obr. 1A



Obr. 1B