

# PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(21) Číslo dokumentu:

**2021-563**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.:

(19)  
ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **14.12.2021**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **22.03.2023**

(Věstník č. 12/2023)

**C08B 37/08** (2006.01)  
**A61K 47/36** (2006.01)  
**A61K 9/08** (2006.01)  
**A61K 9/19** (2006.01)  
**A61K 9/14** (2006.01)  
**A61P 27/02** (2006.01)

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

(72) Původce:  
Radovan Buffa, Humenné, SK  
Vít Svozil, Ústí nad Orlicí, CZ  
Tomáš Klejch, Litomyšl, Litomyšl-Město, CZ  
Martina Hermannová, Žamberk, CZ  
Lenka Hejlová, Výprachtice, CZ  
Hana Vágnerová, Dolní Čermná, CZ  
Kristina Nešporová, Ústí nad Orlicí, CZ  
Lenka Nespěchalová, Vamberk, CZ  
Martina Brandejsová, Letohrad, CZ  
Eva Kriváková, Sokol, SK  
Vladimír Velebný, Žamberk, CZ

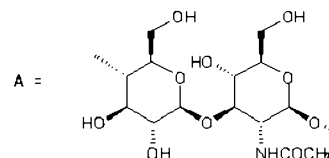
(74) Zástupce:  
Kania, Sedlák, Smola, s.r.o., Mendlovo náměstí  
907/1a, 603 00 Brno, Staré Brno

Vzorec pro anotaci (Z):

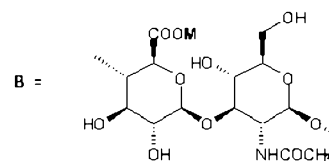
$Z = R^1 - (A)_X - (B)_Y - R^2$

kde

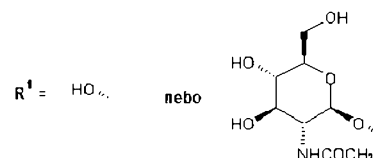
A je strukturální fragment lineárního řetězce:



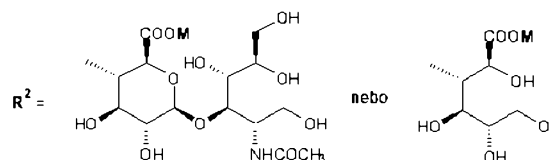
B je strukturální fragment lineárního řetězce:



R<sup>1</sup> je strukturální fragment konce lineárního řetězce:



R<sup>2</sup> je strukturální fragment konce lineárního řetězce:



M může být vodík nebo libovolný kation alkalického kovu,

X je index označující počet strukturálních fragmentů A v rámci řetězce,

Y je index označující počet strukturálních fragmentů B v rámci řetězce, přičemž současně platí, že:

- strukturální fragmenty A a B jsou v lineárního řetězce rozmístěny náhodně, a
- součet indexů X + Y je v rozsahu 500 až 2500, a
- poměr indexů X: Y je v rozmezí 3/1 až 1/4

(54) Název přihlášky vynálezu:  
**Derivát kyseliny hyaluronové se sníženou polaritou, způsob jeho přípravy, kompozice a použití**

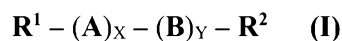
(57) Anotace:  
Řešení se týká přípravy derivátu kyseliny hyaluronové, který má některé karboxylové skupiny (-COOH) nahrazené primární hydroxylovou skupinou (-CH<sub>2</sub>-OH). Postup přípravy je založen na aktivaci karboxylové skupiny pomocí činidla 4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium chlorid a následné redukci s NaBH<sub>4</sub>. Deriváty kyseliny hyaluronové připravené dle vynálezu jsou biokompatibilní a biodegradovatelné, přičemž vykazují zvýšenou odolnost vůči tepelné a enzymatické degradaci.

**Derivát kyseliny hyaluronové se sníženou polaritou, způsob jeho přípravy, kompozice a použití**

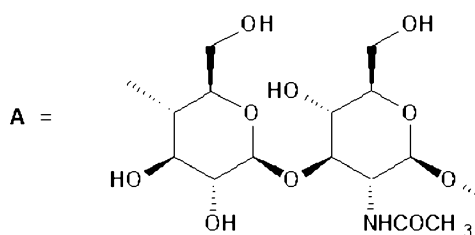
5 Oblast techniky

Vynález se týká redukovaného derivátu kyseliny hyaluronové nebo její soli ve formě lineárního řetězce se sníženou polaritou, která je způsobena modifikací karboxylové skupiny na primární alkohol podle strukturního vzorce **I**:

10

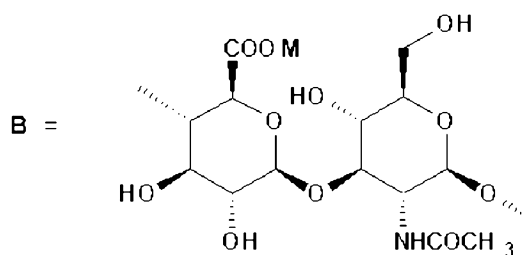


kde **A** je strukturní fragment lineárního řetězce:



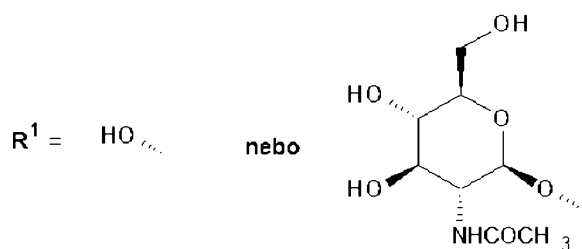
15

**B** je strukturní fragment lineárního řetězce:

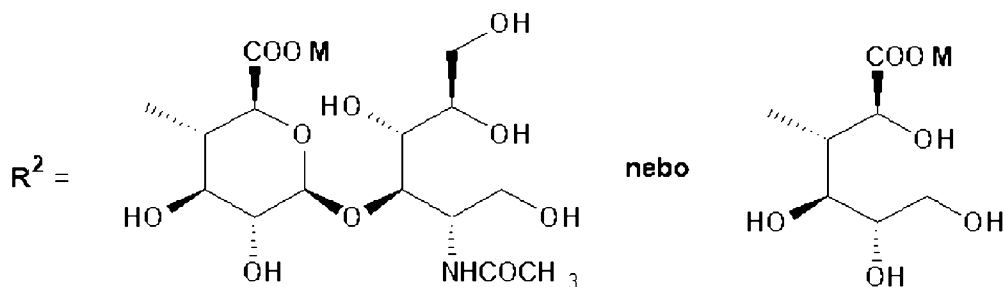


20

**R**<sup>1</sup> je strukturní fragment konce lineárního polymeru:



25 **R**<sup>2</sup> je strukturní fragment konce lineárního polymeru:



**M** může být vodík, libovolný kation kovu, například kation alkalického kovu,

5 **X** je index označující počet strukturních fragmentů **A** v rámci řetězce,

**Y** je index označující počet strukturních fragmentů **B** v rámci řetězce,

přičemž současně platí, že:

10

- strukturní fragmenty **A** a **B** jsou v lineárním řetězci rozmístěny náhodně, a
- součet indexů  $X + Y$  je v rozsahu 500 až 2500, a
- poměr indexů  $X/Y$  je v rozmezí 3/1 až 1/4.

15 Takto modifikovaný polysacharid vykazuje zvýšenou odolnost vůči tepelné a enzymatické degradaci při současném zachování bezpečnosti a biokompatibility typické pro nativní kyselinu hyaluronovou.

20 Dále se vynález týká způsobu přípravy polysacharidu podle strukturního vzorce **I**, kde je modifikace kyseliny hyaluronové uskutečněna pomocí 4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorfolinium chloridu (DMTMM) a tetrahydridoboritanu sodného ( $\text{NaBH}_4$ ) ve směsi voda/acetonitril.

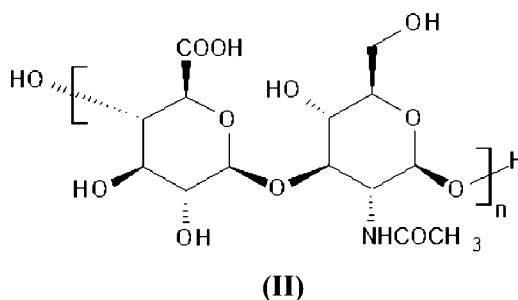
25 Dále se vynález týká použití polysacharidu podle strukturního vzorce **I** v oblastech, kde jsou vyžadovány tyto vlastnosti, nebo jejich kombinace:

- použití biokompatibilního a biodegradovatelného polysacharidu;
- zvýšená odolnost vůči tepelné degradaci oproti nativní kyselině hyaluronové;
- zvýšená odolnost vůči enzymatické degradaci oproti nativní kyselině hyaluronové;
- 30 – možnost regulace rychlosti degradace;
- zvýšená viskozita roztoků;
- snížená bobtnavost roztokových nebo tuhých forem.

35 Dosavadní stav techniky

Kyselina hyaluronová

40 Kyselina hyaluronová nebo její sodná sůl je nesulfatovaný glykosaminoglykan složený ze dvou opakujících se jednotek D-glukuronové kyseliny a N-acetyl-D-glukosaminu (vzorec II).



Molekulová hmotnost nativní kyseliny hyaluronové může dosáhnout v lidském organismu až 5000 kg.mol<sup>-1</sup>. Tento polysacharid tvoří významnou součást pojivových tkání, kůže a synoviální tekutiny kloubů a hraje významnou roli v řadě biologických procesů jako je hydratace, diferenciací buněk a organizace proteoglykanů. Kyselina hyaluronová se v biologických systémech přirozeně vyskytuje, tudíž je přirozeně bio-degradovatelná a bio-kompatibilní. Proto je vhodným substrátem pro širokou škálu biomedicinských aplikací.

V dalších kapitolách jsou popsány postupy, které modifikují karboxylové skupiny u různých typů substrátů (nízkomolekulární látky až polysacharidy) v protických, aprotických nebo solvent-free podmínkách, kdy v některých případech dochází k inverzi konfigurace na uhlíku vedle karboxylové skupiny.

Z pohledu možného použití reakčních podmínek pro redukci hyaluronové kyseliny na derivát obecného vzorce **I** je důležité vzít v potaz:

- vhodnost rozpouštědla pro rozpuštění kyseliny hyaluronové;
- možnost, že reakční podmínky způsobí kromě redukce karboxylu i významnou degradaci molekulové hmotnosti kyseliny hyaluronové;
- možnost, že reakční podmínky způsobí kromě redukce karboxylu i jiné modifikace kyseliny hyaluronové (inverze konfigurace, reakce na hydroxylových nebo amidických skupinách).

Redukce karboxylových kyselin s borany:

Efektivní redukci nízko-molekulárních alifatických i aromatických karboxylových kyselin na příslušné alkoholy lze uskutečnit s nadbytkem (3 až 4 ekvivalenty) pinakol boranu při 20 °C bez přítomnosti rozpouštědel a katalyzátoru (Harinath A. a kol.: Chem. Comm., 10, 55, 1386-9, 2019). Tento přístup ale nelze použít pro molekuly obsahující velké množství hydroxylových skupin, které by rychle reagovaly s boranem za vzniku vodíku.

Jednoduché alifatické alfa-hydroxy karboxylové kyseliny je možné redukovat v tetrahydrofuranu pomocí systému (NaBH<sub>4</sub> + I<sub>2</sub>), kde se předpokládá vznik diboranu B<sub>2</sub>H<sub>6</sub> nebo jeho analogů (Burgess K. a kol.: Tetrahedron Letters, 36, 16, 2725 až 2728, 1995).

V patentu (Getman D. P. a kol.: US 20026388132 byla popsána selektivní redukce alifatických karboxylových kyselin, které ve své struktuře obsahují karbamátovou skupinu. Redukce na alkohol probíhá s boranem v tetrahydrofuranu.

Selektivní redukce alifatických karboxylových kyselin, které ve své struktuře obsahují hydroxylové skupiny a ethery byla popsána v článku (Murray J. a kol.: Chem. Comm., 50, 88, 13608 až 13611, 2014). Reakce probíhá 12 hodin při 0 až 60 °C v inertní atmosféře a jako redukční činidlo byl použitý systém (NaBH<sub>4</sub> + I<sub>2</sub>) v tetrahydrofuranu.

Stejně činidlo (NaBH<sub>4</sub> + I<sub>2</sub>) bylo použito pro selektivní redukce alifatických karboxylových kyselin, které ve své struktuře obsahují hydroxylové skupiny a laktony (CN 110845454, 2020). Reakce probíhá 2 hodiny v tetrahydrofuranu při 25 °C.

Redukce alifatických karboxylových kyselin, které ve své struktuře obsahují éterické skupiny, byla popsána v článku (Kano S. a kol.: Synthesis, 9, 695 až 697, 1980). Jako činidlo byly použité borany generované systémem ( $\text{NaBH}_4 + \text{TiCl}_4$ ). Reakce probíhá 14 hodin v 1,2-dimethoxyethanu při 20 °C.

Použití boranů generovaných systémem ( $\text{NaBH}_4 + \text{H}_2\text{SO}_4$ ) na redukci alifatických karboxylových kyselin obsahujících éterické skupiny byla popsána v patentu (Haldar P. a kol.: US 2011250454), Reakce probíhala 45 minut v tetrahydroforanu a diethyletheru v teplotním rozmezí 0 až 35 °C.

Redukci alifatických karboxylových kyselin, které ve své struktuře obsahují acetylové a jiné esterové skupiny lze uskutečnit pomocí komplexu dimethylsulfid/boran v tetrahydrofuranu (Williams S. J. a kol.: Journal of the American Chemical Society, 122, 10, 2223 až 2235, 2000). Reakce probíhá při 20 °C s tím, že je potřebný delší reakční čas (až 72 hodin).

Obecně lze konstatovat, že při redukcích karboxylových kyselin buď přímo s borany, nebo s borany v komplexu s dimethylsulfidem, nebo s borany generovanými in situ, je použití protických rozpouštědel nevhodné s ohledem na rychlou reakci boranů s vodíkem rozpouštědla za vzniku molekulárního vodíku. Tyto reakce probíhají efektivně buď v aprotických systémech (étery), nebo bez přítomnosti rozpouštědla.

#### Redukce karboxylových kyselin s aluminium hydridy

Redukci alifatických karboxylových kyselin, které ve své struktuře obsahují esterové skupiny, lze uskutečnit pomocí dvou-krokové syntézy, kde se v prvním kroku aktivuje karboxylová skupina pomocí oxalyl dichloridu v N,N-dimethylformamidu, tetrahydrofuranu, dichlormethanu a acetonitrilu při -78 až + 20 °C, a v druhém kroku se aktivovaná karboxylová skupina redukuje s lithium tri-(terc-butoxy)aluminium hydridem v tetrahydrofuranu, dichlormethanu a acetonitrilu při 20 °C v čase 1,5 hodiny (Chany A. C. a kol.: Organic and Biomolecular Chemistry, 13, 35, 9190 až 9193, 2015).

Redukci hexasacharidu kyseliny hyaluronové modifikované na karboxylu jako methyl ester byla popsána v článku (Onoera K. a kol.: Agricultural and Biological Chem., 27, 2, 143 až 149, 1963). Jako činidlo bylo použito  $\text{LiAlH}_4$  v tetrahydrofuranu.

I při redukcích karboxylových kyselin s hydridy na bázi hliníku je použití protických rozpouštědel nevhodné s ohledem na rychlou reakci aluminium hydridů s vodíkem rozpouštědla za vzniku molekulárního vodíku. Redukce probíhají efektivně v aprotických rozpouštědlech typu tetrahydrofuran, dichlormethan anebo acetonitril.

#### Redukce karboxylových kyselin s boron hydridy

Redukci alifatických karboxylových kyselin, které ve své struktuře obsahují primární aminy a hydroxylové skupiny, lze uskutečnit pomocí aktivace karboxylu s chlortrimethylsilanem a následné redukci s lithium borohydridem v tetrahydrofuranu pod inertní atmosférou (Jing, Q. a kol.: Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, 23, 20, 5674 až 5679, 2013).

V článku (Montchamp J.-L. a kol.: Journal of the American Chemical Society, 114, 12, 4453, 1992) byla popsána redukce alifatických karboxylových kyselin, které ve své struktuře obsahují také hydroxylové skupiny a étery, pomocí aktivace karboxylu s triethyl orthoformiátem a 4-methylmorfolinem-N-oxidem. Následná redukce byla uskutečněna pomocí  $\text{NaBH}_4$  s oxidem osmičelým v ethanolu a vodě. Jako vedlejší produkt byla pozorována racemizace v poloze alfa karboxylu.

NaBH<sub>4</sub> byl použit na redukci široké škály karboxylových kyselin po in situ aktivaci s činidlem benzotriazol-1-yloxytris(dimethylamino)fosfoniumhexafluorofosfát. Reakce probíhá rychle v mírných podmínkách v tetrahydrofuranu s přidavkem N,N-diisopropylethylaminu za vzniku alkoholů s vysokým výtěžkem (McGeary R. P.: Tetrahedron Letters, 39, 3319 až 3322, 1998).

5

Karboxylové skupiny tetrasacharidu esterifikované na methyl estery, který obsahují i nechráněné hydroxylové skupiny, lze redukovat pomocí NaBH<sub>4</sub> v methanolu. Redukce na příslušný alkohol probíhá 1 hodinu při 20 °C (D'Acquarica I. a kol.: Tetrahedron, 58, 51, 10127 až 10136, 2002).

10

Alifatické karboxylové kyseliny s obsahem amidických a pyrazolových skupin lze redukovat po aktivaci s 1,1'-karbonyldiimidazolem pomocí NaBH<sub>4</sub> v systému tetrahydrofuran, voda. Redukce probíhá při 0 °C v čase 30 minut (EP 20122511265).

15

Podobný přístup byl popsán v článku (Stolz F. a kol.: European Journal of Organic Chemistry, 15, 3304 až 3312, 2004), kde byly alifatické karboxylové kyseliny obsahující také etherové skupiny redukovány pomocí NaBH<sub>4</sub> po aktivaci karboxylu s 1,1'-karbonyldiimidazolem. Reakce byla uskutečněna v systému ethanol, dichlormethan, N,N-dimethylformamid.

20

Redukce karboxylových kyselin, které obsahují také alky, ethery a N-heterocykly, byly popsány v patentu (CN 112778310, 2021). Karboxyl byl aktivován za vzniku methylesteru a následná redukce byla uskutečněna s NaBD<sub>4</sub> v tetrahydrofuranu po 2 hodinách při 20 °C.

25

Disacharid s volnými hydroxylovými skupinami a s cholesterolem vázaným na redukující konec O-glykosidickou vazbou byl redukován na karboxylu po jeho esterifikaci s diazomethanem v methanolu. Jako činidlo byl použit NaBH<sub>4</sub> a reakce probíhala 2 hodiny v methanolu při okolní teplotě (Yoshikawa K. a kol.: Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 46, 7, 1102 až 1107, 1998).

30

Ethylchlorformiát jako aktivační činidlo pro alifatické karboxylové kyseliny obsahující v molekule i epoxidy byl použit také v patentu WO 2005/056548. Samotná aktivace je uskutečněna v dichlormethanu a následná redukce s NaBH<sub>4</sub> je provedena při 0 až 20 °C s přidavkem ethanolu.

35

Podobný byl postup i v dalším patentu WO 2015/123133, kde se alifatické karboxylové kyseliny obsahující v molekule pyrazol aktivovaly pomocí ethylchlorformiátu v tetrahydrofuranu a následná redukce s NaBH<sub>4</sub> při 20 °C proběhla také s přidavkem ethanolu.

40

Kromě ethylchlorformiátu lze na aktivaci karboxylových kyselin použít i jeho analogy jako methylchlorformiát (CN 104672288, 2017), nebo isobutylchlorformiát (EP 20173239143). V obou případech je aktivace uskutečněna v tetrahydrofuranu a následná redukce s NaBH<sub>4</sub> probíhá v tetrahydrofuranu nebo v jeho směsi s vodou.

45

Aktivaci karboxylových kyselin, kde je v molekule přítomný oxazol lze uskutečnit pomocí SOCl<sub>2</sub> v dichlormethanu. Následná redukce s LiB(Et)<sub>3</sub>H, probíhá v tetrahydrofuranu při teplotě varu (Kanemasa S., Onimura K., Tetrahedron, 48, 40, 8645 až 8658, 1992).

50

Aktivaci karboxylových kyselin na monosacharidech, kde jsou všechny hydroxylové skupiny chráněné jako acetyly, lze uskutečnit pomocí PCl<sub>5</sub> v diethyletheru (Soroka N. V. a kol.: Carbohydrate Research, 340, 4, 539 až 546, 2005). Následná rychlá redukce s NaBH<sub>4</sub> probíhá ve směsi tetrahydrofuran/voda při 0 °C.

Pokud jsou přítomné nechráněné hydroxylové skupiny, lze redukci karboxylu uskutečnit po aktivaci s acetylchloridem. Následná redukce s NaBH<sub>4</sub> probíhá v ethanolu při nižší teplotě (Lundt I. A kol: Tetrahedron, 50, 46, 13285 až 13298, 1994), (Lundt I. a kol: Synthesis, 7, 714 až 720, 1993).

Obecně lze konstatovat, že při redukcích karboxylových kyselin s hydridy na bázi boru je nutná aktivace karboxylu na jeho reaktivnější (elektrofilnější) derivát. Aktivace probíhá zpravidla v aprotických podmínkách a následná redukce s  $\text{NaBH}_4$  probíhá většinou ve směsích s protickými rozpouštědly typu methanol, ethanol nebo voda. Jako redukované substráty byly použity i sloučeniny obsahující hydroxylové a amidické skupiny.

Redukce po aktivaci karboxylů s halogenovanými 1,3,5-triaziny:

Aktivaci alifatických karboxylových kyselin a N-chráněných aminokyselin lze uskutečnit spolu s redukcí pomocí  $\text{NaBH}_4$  v jednom stupni reakce a bez rozpouštědla. Jako aktivátor byla použita směs 2,4,6-trichlor-1,3,5-triazinu a trifenyfosfínu (Subin J. a kol.: RSC Adv., 4, 46947 až 46950, 2014).

Podobný přístup byl popsán v článku, kde byl na aktivaci karboxylové kyseliny s obsahem laktonu použit 2,4,6-trifluor-1,3,5-triazin v dichlormethanu při teplotách  $-20$  až  $-10$  °C a následná rychlá redukce pomocí  $\text{NaBH}_4$  při  $20$  °C (Kokotos G. a kol.: Journal of Organic Chemistry, 61, 20, 6994 až 6996, 1996).

Halogenované 1,3,5-triaziny jsou velmi reaktivní, a tudíž aktivace karboxylových sloučenin probíhá v aprotických systémech nebo bez rozpouštědla.

Enzymatické redukce

Alifatické karboxylové kyseliny s obsahem etherů a acetamidů lze redukovat ve vodě pomocí enzymu *Gloeosporium olivarum* při  $27$  °C. Reakční čas 768 hodin je ale extrémně dlouhý, přičemž byla pozorována i racemizace alfa pozice redukovaného karbonylu (Tsuda Y. a kol.: Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 33, 5, 1955 až 1960, 1985).

Další enzym schopný redukovat alifatické karboxylové kyseliny s obsahem éterických skupin je *Glomerella cingulata*. Tento enzym funguje při  $27$  °C ve vodě, reakční čas je až 624 hodin, přičemž byla pozorována i racemizace alfa pozice karbonylu (Tsuda Y. a kol.: Agricultural and Biological Chemistry, 48, 5, 1373 až 1374, 1984).

Při použití enzymu *Glomerella cingulata* s přísadkou  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$ , peptonu a sacharózy je reakční čas jenom 24 hodin ve vodě při  $27$  °C (Tsuda Y.: Chemical and pharmaceutical bulletin, 35, 6, 2554 až 2557, 1987).

Obecně lze konstatovat, že redukce lze provést i v mírných podmínkách ve vodě pomocí enzymu, avšak je nutné počítat s delším reakčním časem a taky s racemizací alfa pozice karbonylu.

Redukce polysacharidů po aktivaci s karbodiiminy

Aktivace karboxylové skupiny polysacharidů (heparin, chondroitin sulfát) s velkým nadbytkem 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimidu a následná redukce s velkým nadbytkem  $\text{NaBH}_4$  byla popsána v článku (Inoue Y. a kol.: Carbohydrate Research, 111, 113 až 125, 1982). Reakce probíhají ve vodě a mezi redukovanými substráty nebyla zmíněna kyselina hyaluronová.

Kyselina hyaluronová redukovaná na karboxylu se stupněm modifikace 20 % (poměr redukovaných a neredukovaných disacharidů je 1/4), byla popsána jako produkt při analytickém potvrzení přítomnosti O-acylisomočoviny jako vedlejšího produktu přípravy amidů na karboxylu kyseliny hyaluronové pomocí aktivace s 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) karbodiimidem (Ponedelkina I. Y. a kol.: Russian Journal of Bioorganic Chemistry, 31, 1, 82 až 86, 2005). Redukce O-acylisomočoviny byla provedena s extrémním nadbytkem  $\text{NaBH}_4$  (40násobek hmotnosti sacharidu). Reakce probíhá při teplotě místnosti 2,5 hodiny a pH se udržuje na hodnotách 7 až 8 přísadkou 4molárního roztoku HCl. Racemizace v poloze alfa karboxylu a ani vliv reakčních

podmínek na degradaci molekulové hmotnosti kyseliny hyaluronové nebyly sledovány (hodnoty molekulové hmotnosti nebyly uvedeny ani pro vstupní materiál).

V patentu (US 20050203056) je nárokována kyselina hyaluronovaná, kde jsou -OH skupiny sulfatované na skupinu -OSO<sub>3</sub>Na v různých polohách s vysokým stupněm modifikace a současně jsou redukovány všechny karboxyly na primární alkohol (stupeň modifikace 100 %). Struktura nárokováného materiálu zahrnuje i racemizaci v poloze 5 sacharidického cyklu (poloha alfa původní karboxylové kyseliny) a současně i přítomnost neredukovaného anomerního konce polysacharidu. V postupu přípravy byl použit velký nadbytek 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) karbodiimidu jako aktivátoru (5 až 20 eq) a taky velký nadbytek NaBH<sub>4</sub> (10 až 300eq), přičemž reakce probíhala 2 hodiny při teplotě 50 °C a pH v rozmezí 4 a 5.

Použití acetonitrilu na aktivaci karboxylů nebo redukcí s NaBH<sub>4</sub>.

V článku (Petukhov P. A. a kol.: Tetrahedron, 53, 7, 2535 až 2550, 1997) byla popsána redukce oximů s NaBH<sub>4</sub> v acetonitrilu, kde vznikající intermediát R=N-O-BH<sub>3</sub>Na reaguje s acetonitrilem tak, že dva nebo tři vodíky (vázané na atom boru) jsou nahrazeny skupinou -N=CH-CH<sub>3</sub>. Dochází tedy k adici některé z forem borohydridů na trojnou vazbu acetonitrilu. Autoři dokonce pozorovali a prokazovali pomocí NMR i vznik komplexu ethylamin-BH<sub>3</sub> při vyšší teplotě.

Použití acetonitrilu jako ko-solventu při syntéze benzylamidů kyseliny hyaluronové pomocí aktivace s činidlem na bázi 1,3,5-triazinu (4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorfoliniumchlorid) bylo podrobně studováno v diplomové práci (Rydergren S.: Chemical modification of Hyaluronan using DMTMM-activated amidation, 2013). Bylo pozorováno, že zvyšující se přítomnost acetonitrilu (0 až 30 % obj.) ve vodném fosfátovém pufru dramaticky snižuje stupeň modifikace na finální benzylamid (při 0 % obj. acetonitrilu bylo dosaženo 35% stupně modifikace a při 30 % obj. acetonitrilu bylo dosaženo jenom 5% stupně modifikace). Vznik amidů je podmíněn vznikem stejného reaktivního intermediátu (achéma 1, ester) jako vznik primárního alkoholu při postupu nárokováném v tomto vynálezu (achéma 1).

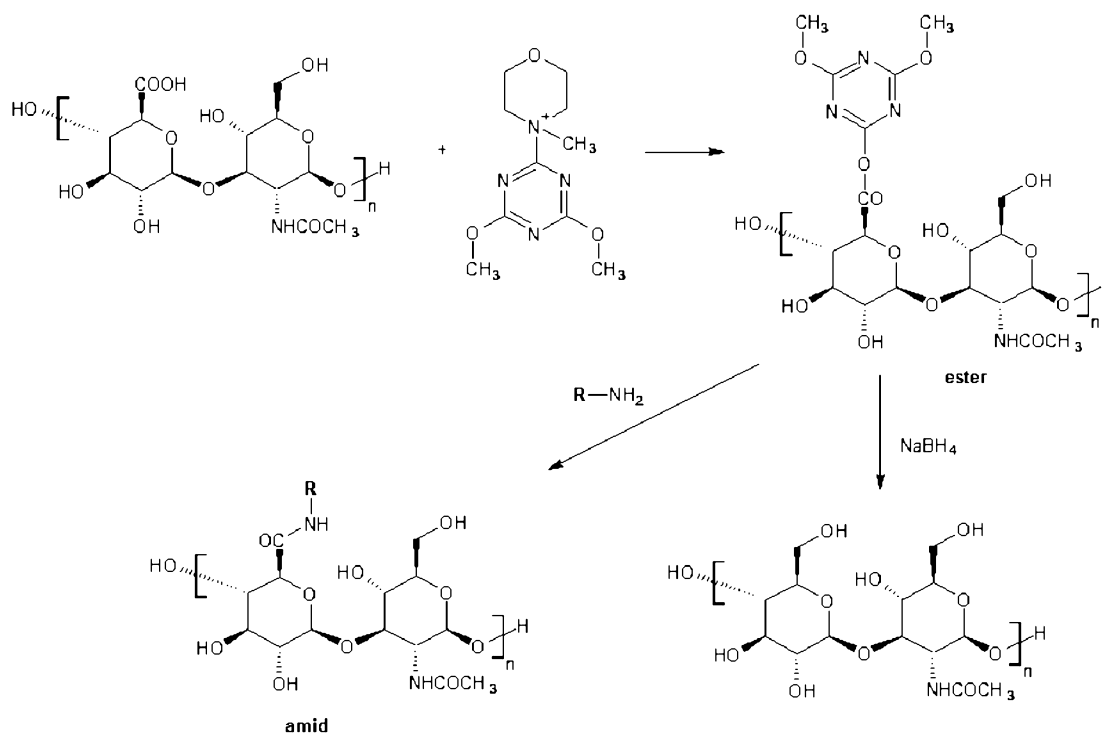


Schéma 1.

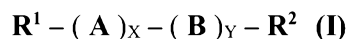


Obyčejně lze konstatovat, že polysacharidy na bázi kyseliny hyaluronové dle strukturního vzorce **I** nebyly dosud popsány. Zmíněny byly podobné polysacharidy s nižším stupněm modifikace anebo s výrazně nižší molekulovou hmotností způsobenou drsnějšími podmínkami použitými při modifikaci (příklady 1 až 4). Úspěšný způsob přípravy použitím aktivátoru (4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium chloridu v kombinaci s NaBH<sub>4</sub> ve vodě a acetonitrilu je překvapivý z důvodu možné reakce acetonitrilu s NaBH<sub>4</sub> (Petukhov P. A. a kol.: Tetrahedron, 53, 7, 2535 až 2550, 1997) a taky z důvodu potlačení tvorby reaktivního intermediátu - esteru (Rydergren S.: Chemical modification of Hyaluronan using DMTMM-activated amidation, 2013) nutného pro úspěšnou redukci. Překvapivost použití acetonitrilu ještě umocňují příklady uvedené v tomto vynálezu, které popisují, že přítomnost jiných ko-solventů buď významně snižují stupeň modifikace, například DMF (příklad 7), terc-butanol (příklad 8), glycerol (příklad 9), ethylenglykol (příklad 10) nebo žádný ko-solvent k vodě (příklad 6), anebo snižují molekulovou hmotnost finálního polymeru, například DMSO (příklad 15), formamid (příklad 11), methanol (příklad 12), dioxan (příklad 13).

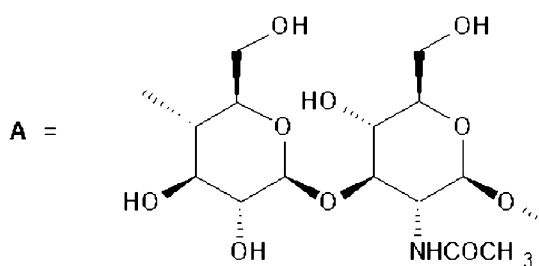
Tento vynález řeší přípravu a použití polysacharidu na bázi kyseliny hyaluronové se sníženou polaritou způsobenou výměnou polárnějších karboxylových skupin za méně polární primární alkoholy. Současně lze očekávat, že nahrazení glukuronové kyseliny za glukózu ve struktuře polymeru bez jiných vedlejších reakcí (inverze konfigurace, reakce na hydroxylových nebo amidických skupinách) umožňuje zachovat vysokou biokompatibilitu a biodegradabilitu. Možnost připravit materiály s molekulovou hmotností až 1000 kg.mol<sup>-1</sup> umožňuje aplikovat tento materiál do oblastí, kde je vyžadován delší biokompatibilní polymer se zvýšenou odolností vůči enzymatickému anebo termálnímu štěpení, případně s nižší bobtnavostí.

#### Podstata vynálezu

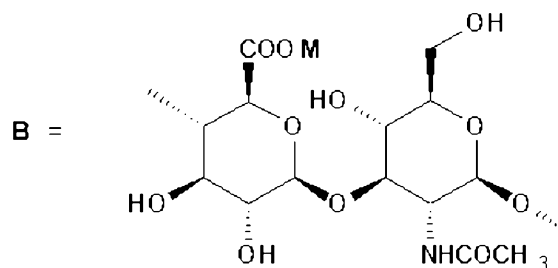
Předmětem vynálezu je derivát kyseliny hyaluronové nebo její soli, který má formu lineárního řetězce a ve kterém jsou některé karboxylové skupiny nahrazeny skupinou -CH<sub>2</sub>-OH podle strukturního vzorce **I**,



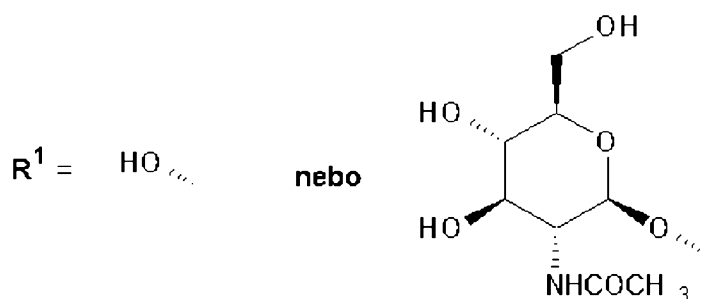
kde **A** je strukturní fragment lineárního řetězce:



**B** je strukturní fragment lineárního řetězce:

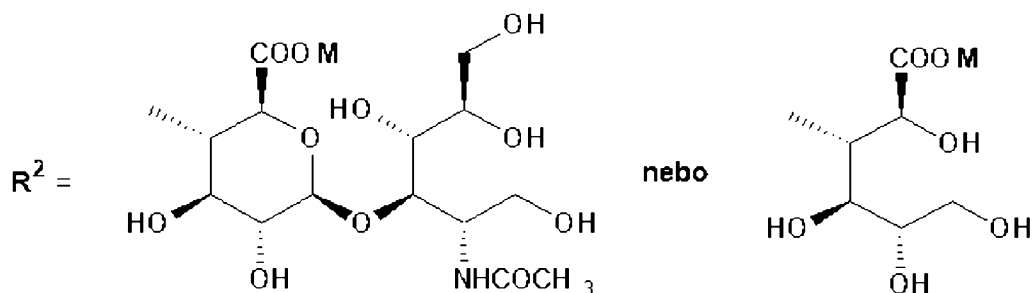


**R<sup>1</sup>** je strukturní fragment konce lineárního řetězce:



5

**R<sup>2</sup>** je strukturní fragment konce lineárního řetězce:



10

**M** může být vodík nebo libovolný kation alkalického kovu,

**X** je index označující počet strukturních fragmentů **A** v rámci řetězce,

15 **Y** je index označující počet strukturních fragmentů **B** v rámci řetězce,

přičemž současně platí, že:

- strukturní fragmenty **A** a **B** jsou v lineárním řetězci rozmístěny náhodně, a
- součet indexů **X** + **Y** je v rozsahu 500 až 2500, a
- poměr indexů **X** / **Y** je v rozmezí 3/1 až 1/4.

20

Derivát podle vynálezu lze použít pro viskosuplementace, dermální výplně proti vráskám, výplně fascií, oční kapky, nebo pro přípravu implantabilních zdravotnických prostředků.

25

Dále se vynález týká způsobu přípravy polysacharidu podle strukturního vzorce **I**, kde je modifikace kyseliny hyaluronové uskutečněna pomocí aktivátoru 4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-

2-yl)-4-methylmorfoliniumchloridu (DMTMM) a tetrahydridoboritanu sodného ( $\text{NaBH}_4$ ) ve směsi voda a acetonitril, přičemž přítomnost acetonitrilu hraje významnou roli pro možnost dosažení vyšší molekulové hmotnosti a současně významnějšího stupně modifikace. Konkrétně způsob přípravy spočívá v tom, že se připraví vodný roztok kyseliny hyaluronové o molekulové hmotnosti  
 5 v rozmezí 400 až 2200  $\text{kg}\cdot\text{mol}^{-1}$ , s výhodou 800 až 1400  $\text{kg}\cdot\text{mol}^{-1}$ , jehož koncentrace je v rozmezí 0,3 až 2 % hmotn., s výhodou 0,7 až 1,3 % hmotn., přidá se acetonitril v množství 50 až 100 %, s výhodou 75 až 90 % objemu vodního roztoku, pak se přidá 4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorfoliniumchlorid v množství 0,7 až 2,3, s výhodou 0,9 až 1,2 hmotnostního ekvivalentu vzhledem ke kyselině hyaluronové a směs se nechá reagovat 15 až 30 hodin, s výhodou 20 až  
 10 25 hodin, při teplotě 15 až 25 °C. Pak se přidá 0,5 až 2,3, s výhodou 0,7 až 1,1 hmotnostního ekvivalentu  $\text{NaBH}_4$  a roztok se míchá 2 až 30 hodin, s výhodou 4 až 8 hodin při teplotě 15 až 25 °C. Následně se do roztoku postupně přidává kyselina octová až do dosažení hodnoty pH v rozmezí 4,5 až 5,5 a směs se míchá 1,5 až 3 hodiny při teplotě 15 až 25 °C. Finální reakční směs se pak izoluje, například srážením, například isopropanolem, ethanolem, acetonem nebo acetonitrilem,  
 15 s výhodou isopropanolem, nebo chromatograficky, za vzniku žádaného redukováného produktu ve formě prášku.

Postup popsany v tomto vynálezu je oproti analogickým postupům redukcí karboxylové skupiny polymerů technologicky mnohem výhodnější hlavně z pohledu použití výrazně menšího  
 20 množství aktivátoru a redukčního činidla (řádově jeden ekvivalent oproti řádově desítkám až stovkám ekvivalentů). Na příkladech uvedených v tomto vynálezu (příklady 18 až 24) bylo taky prokázáno, že kombinace aktivačního činidla DMTMM a acetonitrilu jako ko-solventu překvapivě jako jediná dosáhla významnějších stupňů modifikace (poměr indexů X/Y je víc než 1/4, DS víc než 20 %, s výhodou X/Y je alespoň 1/3, tj. DS alespoň 25 %) a současně výrazně vyšších hodnot  
 25 molekulové hmotnosti (500 až 1000  $\text{kg}\cdot\text{mol}^{-1}$ ). Aplikace aktivačního činidla DMTMM s jinými ko-solventy anebo aplikace standardního aktivačního činidla EDC s různými ko-solventy (včetně acetonitrilu) nebo bez ko-solventů, vede k materiálům s molekulovou hmotností 20 až 200  $\text{kg}\cdot\text{mol}^{-1}$  (příklady 7 až 17). Molekulová hmotnost výsledného produktu podle vynálezu je vyšší než 200  $\text{kg}/\text{mol}$  a může dosáhnout až 1000  $\text{kg}/\text{mol}$ , s výhodou je v rozmezí 300 až 1000  $\text{kg}/\text{mol}$ ,  
 30 nejvýhodněji 500 až 1000  $\text{kg}/\text{mol}$ .

Výše popsany postup lze na finálním produktu opakovat pro získání vyššího stupně modifikace a současně zachování vysoké molekulové hmotnosti, a to 2 až 5krát.

Předmětem vynálezu jsou i kompozice obsahující polysacharid podle strukturního vzorce **I**, které se vyznačují zvýšenou odolností vůči poklesu molekulové hmotnosti při působení tepla anebo enzymů štěpících kyselinu hyaluronovou. Rozdílly v odolnosti oproti nativní kyselině hyaluronové jsou popsány v příkladech 45 a 46 (tepelná odolnost) a v příkladu 47 (enzymatická odolnost). Kompozice podle vynálezu obsahuje derivát kyseliny hyaluronové podle strukturního vzorce **I** v  
 40 koncentraci 0,01 až 99 % a aditivum vybrané ze skupiny zahrnující vodu, chlorid sodný, chlorid vápenatý, glycerol, kyselinu hyaluronovou, chondroitin sulfát. V jednom provedení má kompozice s výhodou formu roztoku nebo gelu ve vodném rozpouštědle. Vodným rozpouštědlem je míněna například čistá voda, nebo voda obsahující jakékoliv chemicky nereaktivní přísady typu léčiva, vitaminy, růstové faktory, etanol, glycerol apod. V dalším provedení má kompozice formu  
 45 pevného substrátu, například lyofilizátu nebo prášku.

Dále se vynález týká použití polysacharidu strukturního vzorce **I** v oblastech, kde jsou vyžadovány tyto vlastnosti, nebo jejich kombinace:

- 50 – použití biokompatibilního a biodegradovatelného polymeru;
- zvýšená odolnost vůči tepelné degradaci oproti nativní kyselině hyaluronové;
- zvýšená odolnost vůči enzymatické degradaci oproti nativní kyselině hyaluronové;
- možnost regulace rychlosti degradace;
- zvýšená viskozita roztoků;
- 55 – snížená bobtnavost roztokových nebo tuhých forem.

Díky zvýšené odolnosti je možné finální kompozice s výhodou použít hlavně v aplikacích jako viskosuplementace, dermální výplně proti vráskám, roztoky pro výplně fascií, oční kapky, roztoky pro uchovávání kontaktních čoček, nebo pro přípravu implantabilních zdravotnických prostředků.

#### Objasnění výkresů

Obr. 1 – Vliv materiálů připravených podle příkladů 20 a 23 na viabilitu fibroblastů 3T3.

Obr. 2 – Vliv materiálů připravených podle příkladů 23 a 28 na viabilitu keratinocytů HaCaT.

Obr. 3 – Vliv materiálů připravených podle příkladů 21 a 28 na viabilitu keratinocytů HaCaT po vysušení.

Obr. 4 – Porovnání rychlosti degradace 0,5 % roztoků materiálů připravených podle příkladů 20, 22 a 28 (plná čára) s nativní kyselinou hyaluronovou (přerušovaná čára) po zahřívání na 80 °C ve fosfátovém pufru (pH 7,4).

Obr. 5 – Porovnání rychlosti degradace materiálu připraveného podle příkladu 39 (plná čára) s nativní kyselinou hyaluronovou (přerušovaná čára) po zahřívání na 120 °C ve formě prášku.

Obr. 6 – Porovnání rychlost enzymatické degradace roztoků materiálů připravených podle příkladů 22 a 28 (plné čáry) s nativní kyselinou hyaluronovou (přerušované čáry) po aplikaci enzymu bovinní testikulární hyaluronidázy (BTH).

Obr. 7 – In vivo biokompatibilita a bezpečnost v subkutánní aplikaci materiálů připravených podle příkladů 21 a 37.

#### Příklady uskutečnění vynálezu

DS = stupeň substituce =  $100 \% \cdot (\text{molární množství modifikované jednotky polysacharidu}) / (\text{molární množství všech jednotek polysacharidu})$ ;

ekv. = molární ekvivalent vztahený na molární množství disacharidu;

DMTMM = 4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorfolinium chlorid;

EDC = 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) karbodiimid;

HA = kyselina hyaluronová;

Mw = molekulová hmotnost;

NMR analýza (500 MHz, D<sub>2</sub>O/NaOD, δ ppm): 3,16 (1H; cyklus glukózy, poloha 2);

BTH bovinní testikulární hyaluronidáza.

Zde používaný výraz ekvivalent (ekv.) se vztahuje, není-li uvedeno jinak, na opakující se jednotku příslušného polysacharidu, například na disacharid kyseliny hyaluronové. Procenta se uvádějí jako hmotnostní procenta, pokud není uvedeno jinak. Molekulová hmotnost výchozích polysacharidů je hmotnostně střední stanovená pomocí metody SEC-MALLS.

Solí kyseliny hyaluronové je míněna sůl, která vzniká z kyseliny hyaluronové po nahrazení protonů karboxylové skupiny jinými kationty, například kationty alkalického kovu.

#### Příklad 1 (srovnávací příklad)

Redukce kyseliny hyaluronové pomocí EDC a NaBH<sub>4</sub> ve vodě

Do roztoku HA (100 mg, 1350 kg.mol<sup>-1</sup>) v 15 ml vody se přidávala HCl do pH 4,7. Potom se přidal EDC (448 mg), přičemž se hodnota pH držela na 4,7 postupným přidavkem HCl. Směs se pak míchala 24 hodin při 20 °C. Pak se přidal desetkrát roztok NaBH<sub>4</sub> (0,179 g v 2,5 ml vody, celkem 25 ml roztoku) a suspenze se míchala další 2 hodiny při 50 °C. Následně se k roztoku přidala HCl do pH 7,0 a směs se míchá 2 hodiny při 20 °C. Výsledný roztok se pak dialyzoval a následně odpařil za sníženého tlaku, tuhý podíl se odfiltroval a sušil za sníženého tlaku. Produkt byl analyzován pomocí NMR, DS 85 % a SECMAALLS, Mw 32 kg.mol<sup>-1</sup>.

#### Příklad 2 (srovnávací příklad)

Redukce kyseliny hyaluronové pomocí EDC a NaBH<sub>4</sub> ve vodě

Do roztoku HA (100 mg, 1800 kg.mol<sup>-1</sup>) v 10 ml vody se přidal EDC (100 mg), přičemž se hodnota pH držela na 4,5 postupným přidavkem HCl. Směs se pak míchala 2 hodiny při 20 °C. Pak se přidal NaBH<sub>4</sub> (300 mg) a suspenze se míchala další 2 hodiny při 20 °C. Výsledný roztok se pak dialyzoval a následně odpařil za sníženého tlaku, tuhý podíl se odfiltroval a sušil za sníženého tlaku. Produkt byl analyzován pomocí NMR, DS 77 % a SECMAALLS, Mw 137 kg.mol<sup>-1</sup>.

#### Příklad 3 (srovnávací příklad)

Redukce kyseliny hyaluronové pomocí EDC a NaBH<sub>4</sub> ve vodě

Do roztoku HA (100 mg, 1800 kg.mol<sup>-1</sup>) v 10 ml vody se přidal EDC (300 mg), přičemž se hodnota pH držela na 4,5 postupným přidavkem HCl. Směs se pak míchala 2 hodiny při 20 °C. Pak se přidal NaBH<sub>4</sub> (300 mg) a suspenze se míchala další 2 hodiny při 20 °C. Výsledný roztok se pak dialyzoval a následně odpařil za sníženého tlaku, tuhý podíl se odfiltroval a sušil za sníženého tlaku. Produkt byl analyzován pomocí NMR, DS 77 % a SECMAALLS, Mw 63 kg.mol<sup>-1</sup>.

#### Příklad 4 (srovnávací příklad)

Redukce kyseliny hyaluronové pomocí EDC a NaBH<sub>4</sub> ve vodě a acetonitrilu

Do roztoku HA (100 mg, 1800 kg.mol<sup>-1</sup>) v 10 ml vody a 8,6 ml acetonitrilu se přidal EDC (300 mg), přičemž se hodnota pH držela na 4,5 postupným přidavkem HCl. Směs se pak míchala 2 hodiny při 20 °C. Pak se přidal NaBH<sub>4</sub> (100 mg) a suspenze se míchala další 2 hodiny při 20 °C. Výsledný roztok se pak dialyzoval a následně odpařil za sníženého tlaku, tuhý podíl se odfiltroval a sušil za sníženého tlaku. Produkt byl analyzován pomocí NMR, DS 77 % a SECMAALLS, Mw 44 kg.mol<sup>-1</sup>.

#### Příklad 5 (srovnávací příklad)

Redukce kyseliny hyaluronové pomocí DMTMM a NaBH<sub>4</sub> ve vodě

Do roztoku HA (10 mg, 180 kg.mol<sup>-1</sup>) v 0,7 ml vody se přidal DMTMM (10 mg) a směs se míchala 24 hodin při 20 °C. Pak se přidá NaBH<sub>4</sub> (10 mg) a roztok se míchá dalších 20 hodin při 20 °C. Následně se k roztoku přidává CH<sub>3</sub>COOH do pH 4,9 a směs se míchá 2 hodiny při 20 °C. Výsledný roztok se pak sráží 3 ml isopropanolu, tuhý podíl se filtruje a suší za sníženého tlaku. Produkt byl analyzován pomocí NMR, DS 20 %.

#### Příklad 6 (srovnávací příklad)

Redukce kyseliny hyaluronové pomocí DMTMM a NaBH<sub>4</sub> ve vodě

Do roztoku HA (10 mg, 1350 kg.mol<sup>-1</sup>) v 0,7 ml vody se přidal DMTMM (10 mg) a směs se míchala 24 hodin při 20 °C. Pak se přidal NaBH<sub>4</sub> (10 mg) a roztok se míchal dalších 20 hodin při 20 °C. Následně se k roztoku přidala CH<sub>3</sub>COOH do pH 5,0 a směs se míchala 2 hodiny při 20 °C.

Výsledný roztok se pak vysrážel 3 ml isopropanolu, tuhý podíl se odfiltroval a sušil za sníženého tlaku. Produkt byl analyzován pomocí NMR, DS 9 %.

#### Příklad 7 (srovnávací příklad)

5

Redukce kyseliny hyaluronové pomocí DMTMM a NaBH<sub>4</sub> ve vodě a DMF

Do roztoku HA (10 mg, 1350 kg.mol<sup>-1</sup>) v 1 ml vody a 0,86 ml DMF se přidal DMTMM (10 mg) a směs se míchala 24 hodin při 20 °C. Pak se přidal NaBH<sub>4</sub> (10 mg) a roztok se míchal dalších 20 hodin při 20 °C. Následně se k roztoku přidala CH<sub>3</sub>COOH do pH 5,0 a směs se míchala 2 hodiny při 20 °C. Výsledný roztok se pak vysrážel 3 ml isopropanolu, tuhý podíl se odfiltroval a sušil za sníženého tlaku. Produkt byl analyzován pomocí NMR, DS 22 %.

10

#### Příklad 8 (srovnávací příklad)

15

Redukce kyseliny hyaluronové pomocí DMTMM a NaBH<sub>4</sub> ve vodě a terc-butanolu

Do roztoku HA (10 mg, 1350 kg.mol<sup>-1</sup>) v 1 ml vody a 0,86 ml terc-butanolu se přidal DMTMM (10 mg) a směs se míchala 24 hodin při 20 °C. Pak se přidal NaBH<sub>4</sub> (10 mg) a roztok se míchal dalších 20 hodin při 20 °C. Následně se k roztoku přidala CH<sub>3</sub>COOH do pH 5,1 a směs se míchala 2 hodiny při 20 °C. Výsledný roztok se pak vysrážel 3 ml isopropanolu, tuhý podíl se odfiltroval a sušil za sníženého tlaku. Produkt byl analyzován pomocí NMR, DS 15 %.

20

#### Příklad 9 (srovnávací příklad)

25

Redukce kyseliny hyaluronové pomocí DMTMM a NaBH<sub>4</sub> ve vodě a glycerolu

Do roztoku HA (10 mg, 1350 kg.mol<sup>-1</sup>) v 1 ml vody a 0,86 ml glycerolu se přidal DMTMM (10 mg) a směs se míchala 24 hodin při 20 °C. Pak se přidal NaBH<sub>4</sub> (10 mg) a roztok se míchal dalších 20 hodin při 20 °C. Následně se k roztoku přidala CH<sub>3</sub>COOH do pH 4,5 a směs se míchala 2 hodiny při 20 °C. Výsledný roztok se pak vysrážel 3 ml isopropanolu, tuhý podíl se odfiltroval a sušil za sníženého tlaku. Produkt byl analyzován pomocí NMR, DS 7 %.

30

#### Příklad 10 (srovnávací příklad)

35

Redukce kyseliny hyaluronové pomocí DMTMM a NaBH<sub>4</sub> ve vodě a ethylenglykolu

Do roztoku HA (10 mg, 1350 kg.mol<sup>-1</sup>) v 1 ml vody a 0,86 ml ethylenglykolu se přidal DMTMM (10 mg) a směs se míchala 24 hodin při 20 °C. Pak se přidal NaBH<sub>4</sub> (10 mg) a roztok se míchal dalších 20 hodin při 20 °C. Následně se k roztoku přidala CH<sub>3</sub>COOH do pH 4,7 a směs se míchala 2 hodiny při 20 °C. Výsledný roztok se pak vysrážel 3 ml isopropanolu, tuhý podíl se odfiltroval a sušil za sníženého tlaku. Produkt byl analyzován pomocí NMR, DS 14 %.

40

#### Příklad 11 (srovnávací příklad)

45

Redukce kyseliny hyaluronové pomocí DMTMM a NaBH<sub>4</sub> ve formamidu

Do roztoku HA (10 mg, 1350 kg.mol<sup>-1</sup>) v 1 ml formamidu se přidal DMTMM (10 mg) a směs se míchala 24 hodin při 20 °C. Pak se přidal NaBH<sub>4</sub> (10 mg) a roztok se míchal dalších 20 hodin při 20 °C. Následně se k roztoku přidalo 0,02 ml CH<sub>3</sub>COOH a směs se míchala 2 hodiny při 20 °C. Výsledný roztok se pak vysrážel 3 ml isopropanolu, tuhý podíl se odfiltroval a sušil za sníženého tlaku. Produkt byl analyzován pomocí NMR, DS 43 % a Mw 142 kg.mol<sup>-1</sup>.

50

#### Příklad 12 (srovnávací příklad)

55

Redukce kyseliny hyaluronové pomocí DMTMM a NaBH<sub>4</sub> ve vodě a methanolu

Do roztoku HA (10 mg, 1350 kg.mol<sup>-1</sup>) v 1 ml vody a 0,86 ml methanolu se přidal DMTMM (10 mg) a směs se míchala 24 hodin při 20 °C. Pak se přidal NaBH<sub>4</sub> (10 mg) a roztok se míchal dalších 20 hodin při 20 °C. Následně se k roztoku přidala CH<sub>3</sub>COOH do pH 5,0 a směs se míchala 2 hodiny při 20 °C. Výsledný roztok se pak vysrážel 3 ml isopropanolu, tuhý podíl se odfiltroval a sušil za sníženého tlaku. Produkt byl analyzován pomocí NMR, DS 39 % a Mw 126 kg.mol<sup>-1</sup>.

Příklad 13 (srovnávací příklad)

Redukce kyseliny hyaluronové pomocí DMTMM a NaBH<sub>4</sub> ve vodě a dioxanu

Do roztoku HA (10 mg, 1350 kg.mol<sup>-1</sup>) v 1 ml vody a 0,86 ml dioxanu se přidal DMTMM (10 mg) a směs se míchala 24 hodin při 20 °C. Pak se přidal NaBH<sub>4</sub> (10 mg) a roztok se míchal dalších 20 hodin při 20 °C. Následně se k roztoku přidala CH<sub>3</sub>COOH do pH 5,3 a směs se míchala 2 hodiny při 20 °C. Výsledný roztok se pak vysrážel 3 ml isopropanolu, tuhý podíl se odfiltroval a sušil za sníženého tlaku. Produkt byl analyzován pomocí NMR, DS 33 % a Mw 196 kg.mol<sup>-1</sup>.

Příklad 14 (srovnávací příklad)

Redukce kyseliny hyaluronové pomocí DMTMM a NaBH<sub>4</sub> ve vodě a tetrahydrofuranu

Do roztoku HA (10 mg, 1350 kg.mol<sup>-1</sup>) v 1 ml vody a 0,86 ml tetrahydrofuranu se přidal DMTMM (10 mg) a směs se míchala 24 hodin při 20 °C. Pak se přidal NaBH<sub>4</sub> (10 mg) a roztok se míchal dalších 20 hodin při 20 °C. Následně se k roztoku přidala CH<sub>3</sub>COOH do pH 5,1 a směs se míchala 2 hodiny při 20 °C. Výsledný roztok se pak vysrážel 3 ml isopropanolu, tuhý podíl se odfiltroval a sušil za sníženého tlaku. Produkt byl analyzován pomocí NMR, DS 24 %.

Příklad 15 (srovnávací příklad)

Redukce kyseliny hyaluronové pomocí DMTMM a NaBH<sub>4</sub> ve vodě a DMSO

Do roztoku HA (1 g, 1350 kg.mol<sup>-1</sup>) v 140 ml vody a 100 ml DMSO se přidal DMTMM (2 g) a směs se míchala 24 hodin při 20 °C. Pak se přidal NaBH<sub>4</sub> (2 g) a roztok se míchal dalších 20 hodin při 20 °C. Následně se k roztoku přidala CH<sub>3</sub>COOH do pH 5,4 a směs se míchala 2 hodiny při 20 °C. Výsledný roztok se pak vysrážel 350 ml isopropanolu, tuhý podíl se odfiltroval a sušil za sníženého tlaku. Produkt byl analyzován pomocí NMR, DS 43 % a SEC MALLS, Mw 186 kg.mol<sup>-1</sup>.

Příklad 16 (srovnávací příklad)

Redukce kyseliny hyaluronové pomocí DMTMM a NaBH<sub>4</sub> ve vodě a DMSO

Do roztoku redukované HA připravené podle předcházejícího příkladu (500 mg, 186 kg.mol<sup>-1</sup>) v 70 ml vody a 50 ml DMSO se přidal DMTMM (1 g) a směs se míchala 24 hodin při 20 °C. Pak se přidal NaBH<sub>4</sub> (1 g) a roztok se míchal dalších 20 hodin při 20 °C. Následně se k roztoku přidala CH<sub>3</sub>COOH do pH 5,4 a směs se míchala 2 hodiny při 20 °C. Výsledný roztok se pak vysrážel 250 ml isopropanolu, tuhý podíl se odfiltroval a sušil za sníženého tlaku. Produkt byl analyzován pomocí NMR, DS 61 % a SEC MALLS, Mw 128 kg.mol<sup>-1</sup>.

Příklad 17 (srovnávací příklad)

Redukce kyseliny hyaluronové pomocí DMTMM a NaBH<sub>4</sub> ve vodě a DMSO

Do roztoku HA (500 mg, 1350 kg.mol<sup>-1</sup>) v 70 ml vody a 50 ml DMSO se přidal DMTMM (1 g) a směs se míchala 24 hodin při 20 °C. Pak se přidal NaBH<sub>4</sub> (1 g) a roztok se míchal dalších 20 hodin při 20 °C. Následně se k roztoku přidala CH<sub>3</sub>COOH do pH 5,2 a směs se míchala 2 hodiny při 20 °C. Výsledný roztok se pak vysrážel 250 ml isopropanolu, tuhý podíl se odfiltroval a sušil za sníženého tlaku. Produkt byl analyzován pomocí NMR, DS 42 % a SECMAALLS, Mw 198 kg.mol<sup>-1</sup>.

#### Příklad 18

Redukce kyseliny hyaluronové pomocí DMTMM a NaBH<sub>4</sub> ve vodě a acetonitrilu

Do roztoku HA (100 mg, 1350 kg.mol<sup>-1</sup>) v 14 ml vody a 8 ml acetonitrilu se přidal DMTMM (100 mg) a směs se míchala 24 hodin při 20 °C. Pak se přidal NaBH<sub>4</sub> (100 mg) a roztok se míchal dalších 20 hodin při 20 °C. Následně se k roztoku přidala CH<sub>3</sub>COOH do pH 5,1 a směs se míchala 2 hodiny při 20 °C. Výsledný roztok se pak vysrážel 35 ml isopropanolu, tuhý podíl se odfiltroval a sušil za sníženého tlaku. Produkt byl analyzován pomocí NMR, DS 25 % a SECMAALLS, Mw 922 kg.mol<sup>-1</sup>.

#### Příklad 19

Redukce kyseliny hyaluronové pomocí DMTMM a NaBH<sub>4</sub> ve vodě a acetonitrilu

Do roztoku HA (1 g, 1350 kg.mol<sup>-1</sup>) v 100 ml vody a 86 ml acetonitrilu se přidal DMTMM (1 g) a směs se míchala 24 hodin při 20 °C. Pak se přidal NaBH<sub>4</sub> (1 g) a roztok se míchal dalších 20 hodin při 20 °C. Následně se k roztoku přidala CH<sub>3</sub>COOH do pH 5,5 a směs se míchala 2 hodiny při 20 °C. Výsledný roztok se pak vysrážel 350 ml isopropanolu, tuhý podíl se odfiltroval a sušil za sníženého tlaku. Produkt byl analyzován pomocí NMR, DS 30 % a SECMAALLS, Mw 872 kg.mol<sup>-1</sup>.

#### Příklad 20

Redukce redukované kyseliny hyaluronové pomocí DMTMM a NaBH<sub>4</sub> ve vodě a acetonitrilu

Do roztoku redukované HA připravené podle předcházejícího příkladu (500 mg, 872 kg.mol<sup>-1</sup>) v 50 ml vody a 43 ml acetonitrilu se přidal DMTMM (500 mg) a směs se míchala 24 hodin při 20 °C. Pak se přidal NaBH<sub>4</sub> (500 mg) a roztok se míchal dalších 20 hodin při 20 °C. Následně se k roztoku přidala CH<sub>3</sub>COOH do pH 5,5 a směs se míchala 2 hodiny při 20 °C. Výsledný roztok se pak vysrážel 35 ml isopropanolu, tuhý podíl se odfiltroval a sušil za sníženého tlaku. Produkt byl analyzován pomocí NMR, DS 50 % a SECMAALLS, Mw 690 kg.mol<sup>-1</sup>.

#### Příklad 21

Redukce kyseliny hyaluronové pomocí DMTMM a NaBH<sub>4</sub> ve vodě a acetonitrilu

Do roztoku HA (1 g, 1350 kg.mol<sup>-1</sup>) v 100 ml vody a 86 ml acetonitrilu se přidal DMTMM (1 g) a směs se míchala 15 hodin při 25 °C. Pak se přidal NaBH<sub>4</sub> (1 g) a roztok se míchal dalších 15 hodin při 25 °C. Následně se k roztoku přidala CH<sub>3</sub>COOH do pH 4,5 a směs se míchala 2 hodiny při 20 °C. Výsledný roztok se pak vysrážel 350 ml isopropanolu, tuhý podíl se odfiltroval a sušil za sníženého tlaku. Produkt byl analyzován pomocí NMR, DS 29 % a SECMAALLS, Mw 823 kg.mol<sup>-1</sup>.

#### Příklad 22

Redukce kyseliny hyaluronové pomocí DMTMM a NaBH<sub>4</sub> ve vodě a acetonitrilu

Do roztoku HA (500 mg, 1350 kg.mol<sup>-1</sup>) v 50 ml vody a 43 ml acetonitrilu se přidal DMTMM (500 mg) a směs se míchala 24 hodin při 20 °C. Pak se přidal NaBH<sub>4</sub> (500 mg) a roztok se míchal dalších 30 hodin při 15 °C. Následně se k roztoku přidala CH<sub>3</sub>COOH do pH 4,8 a směs se míchala



3 hodiny při 15 °C. Výsledný roztok se pak vysrážel 250 ml isopropanolu, tuhý podíl se odfiltraval a sušil za sníženého tlaku. Produkt byl analyzován pomocí NMR, DS 31 % a SECMAALLS, Mw 886 kg.mol<sup>-1</sup>.

#### 5 Příklad 23

Redukce kyseliny hyaluronové pomocí DMTMM a NaBH<sub>4</sub> ve vodě a acetonitrilu

10 Do roztoku HA (10 g, 1350 kg.mol<sup>-1</sup>) v 1000 ml vody a 860 ml acetonitrilu se přidal DMTMM (10 g) a směs se míchala 24 hodin při 20 °C. Pak se přidal NaBH<sub>4</sub> (10 g) a roztok se míchal dalších 20 hodin při 20 °C. Následně se k roztoku přidala CH<sub>3</sub>COOH do pH 4,9 a směs se míchala 1,5 hodiny při 25 °C. Výsledný roztok se pak vysrážel 3000 ml isopropanolu, tuhý podíl se odfiltraval a sušil za sníženého tlaku. Produkt byl analyzován pomocí NMR, DS 29 % a SECMAALLS, Mw 850 kg.mol<sup>-1</sup>.

15

#### Příklad 24

Redukce kyseliny hyaluronové pomocí DMTMM a NaBH<sub>4</sub> ve vodě a acetonitrilu

20 Do roztoku HA (10 g, 1350 kg.mol<sup>-1</sup>) v 1000 ml vody a 860 ml acetonitrilu se přidal DMTMM (10 g) a směs se míchala 30 hodin při 15 °C. Pak se přidal NaBH<sub>4</sub> (10 g) a roztok se míchal dalších 30 hodin při 15 °C. Následně se k roztoku přidala CH<sub>3</sub>COOH do pH 4,9 a směs se míchala 2 hodiny při 20 °C. Výsledný roztok se pak vysrážel 250 ml isopropanolu, tuhý podíl se odfiltraval a sušil za sníženého tlaku. Produkt byl analyzován pomocí NMR, DS 30 % a Mw 888 kg.mol<sup>-1</sup>.

25

#### Příklad 25

Redukce kyseliny hyaluronové pomocí DMTMM a NaBH<sub>4</sub> ve vodě a acetonitrilu

30 Do roztoku HA (10 g, 1800 kg.mol<sup>-1</sup>) v 1000 ml vody a 860 ml acetonitrilu se přidal DMTMM (10 g) a směs se míchala 24 hodin při 20 °C. Pak se přidal NaBH<sub>4</sub> (10 g) a roztok se míchal dalších 20 hodin při 20 °C. Následně se k roztoku přidala CH<sub>3</sub>COOH do pH 5,1 a směs se míchala 2 hodiny při 20 °C. Výsledný roztok se pak vysrážel 3000 ml isopropanolu, tuhý podíl se odfiltraval a sušil za sníženého tlaku. Produkt byl analyzován pomocí NMR, DS 26 % a Mw 877 kg.mol<sup>-1</sup>.

35

#### Příklad 26

Redukce redukované kyseliny hyaluronové pomocí DMTMM a NaBH<sub>4</sub> ve vodě a acetonitrilu

40 Do roztoku redukované HA připravené podle příkladu 25 (9,6 g) v 1000 ml vody a 860 ml acetonitrilu se přidal DMTMM (10 g) a směs se míchala 24 hodin při 20 °C. Pak se přidal NaBH<sub>4</sub> (10 g) a roztok se míchal dalších 20 hodin při 20 °C. Následně se k roztoku přidala CH<sub>3</sub>COOH do pH 4,9 a směs se míchala 2 hodiny při 20 °C. Výsledný roztok se pak vysrážel 3000 ml isopropanolu, tuhý podíl se odfiltraval a sušil za sníženého tlaku. Produkt byl analyzován pomocí  
45 NMR, DS 43 % a Mw 729 kg.mol<sup>-1</sup>.

#### Příklad 27

Redukce redukované kyseliny hyaluronové pomocí DMTMM a NaBH<sub>4</sub> ve vodě a acetonitrilu

50

Do roztoku redukované HA (9,2 g) připravené podle příkladu 26 v 1000 ml vody a 860 ml acetonitrilu se přidal DMTMM (10 g) a směs se míchala 24 hodin při 20 °C. Pak se přidal NaBH<sub>4</sub> (10 g) a roztok se míchal dalších 20 hodin při 20 °C. Následně se k roztoku přidává CH<sub>3</sub>COOH do pH 5,2 a směs se míchala 2 hodiny při 20 °C. Výsledný roztok se pak vysrážel 3000 ml

isopropanolu, tuhý podíl se odfiltraval a sušil za sníženého tlaku. Produkt byl analyzován pomocí NMR, DS 54 % a Mw 605 kg.mol<sup>-1</sup>.

#### Příklad 28

5

Redukce redukované kyseliny hyaluronové pomocí DMTMM a NaBH<sub>4</sub> ve vodě a acetonitrilu

Do roztoku redukované HA (9,0 g) připravené podle příkladu 27 v 1000 ml vody a 860 ml acetonitrilu se přidal DMTMM (10 g) a směs se míchala 24 hodin při 20 °C. Pak se přidal NaBH<sub>4</sub> (10 g) a roztok se míchal dalších 20 hodin při 20 °C. Následně se k roztoku přidala CH<sub>3</sub>COOH do pH 5,1 a směs se míchala 2 hodiny při 20 °C. Výsledný roztok se pak vysrážel 3000 ml isopropanolu, tuhý podíl se odfiltraval a sušil za sníženého tlaku. Produkt byl analyzován pomocí NMR, DS 62 % a SECMAALLS, Mw 510 kg.mol<sup>-1</sup>.

#### 15 Příklad 29

Redukce kyseliny hyaluronové pomocí DMTMM a NaBH<sub>4</sub> ve vodě a acetonitrilu

Do roztoku HA (10 mg, 1350 kg.mol<sup>-1</sup>) v 1 ml vody a 0,86 ml acetonitrilu se přidal DMTMM (15 mg) a směs se míchala 24 hodin při 20 °C. Pak se přidal NaBH<sub>4</sub> (10 mg) a roztok se míchal dalších 20 hodin při 20 °C. Následně se k roztoku přidala CH<sub>3</sub>COOH do pH 5,1 a směs se míchala 2 hodiny při 20 °C. Výsledný roztok se pak vysrážel 3 ml isopropanolu, tuhý podíl se odfiltraval a sušil za sníženého tlaku. Produkt byl analyzován pomocí NMR, DS 35 % a Mw 715 kg.mol<sup>-1</sup>.

#### 25 Příklad 30

Redukce kyseliny hyaluronové pomocí DMTMM a NaBH<sub>4</sub> ve vodě a acetonitrilu

Do roztoku HA (10 mg, 1350 kg.mol<sup>-1</sup>) v 1 ml vody a 0,86 ml acetonitrilu se přidal DMTMM (7 mg) a směs se míchala 24 hodin při 20 °C. Pak se přidal NaBH<sub>4</sub> (10 mg) a roztok se míchal dalších 20 hodin při 20 °C. Následně se k roztoku přidala CH<sub>3</sub>COOH do pH 5,1 a směs se míchala 2 hodiny při 20 °C. Výsledný roztok se pak vysrážel 3 ml isopropanolu, tuhý podíl se odfiltraval a sušil za sníženého tlaku. Produkt byl analyzován pomocí NMR, DS 21 % a Mw 898 kg.mol<sup>-1</sup>.

#### 35 Příklad 31

Redukce kyseliny hyaluronové pomocí DMTMM a NaBH<sub>4</sub> ve vodě a acetonitrilu

Do roztoku HA (10 mg, 1350 kg.mol<sup>-1</sup>) v 1 ml vody a 0,86 ml acetonitrilu se přidal DMTMM (10 mg) a směs se míchala 24 hodin při 20 °C. Pak se přidal NaBH<sub>4</sub> (15 mg) a roztok se míchal dalších 20 hodin při 20 °C. Následně se k roztoku přidala CH<sub>3</sub>COOH do pH 5,2 a směs se míchala 2 hodiny při 20 °C. Výsledný roztok se pak vysrážel 3 ml isopropanolu, tuhý podíl se odfiltraval a sušil za sníženého tlaku. Produkt byl analyzován pomocí NMR, DS 26 % a Mw 812 kg.mol<sup>-1</sup>.

#### 45 Příklad 32

Redukce kyseliny hyaluronové pomocí DMTMM a NaBH<sub>4</sub> ve vodě a acetonitrilu

Do roztoku HA (10 mg, 1350 kg.mol<sup>-1</sup>) v 1 ml vody a 0,86 ml acetonitrilu se přidal DMTMM (10 mg) a směs se míchala 24 hodin při 20 °C. Pak se přidal NaBH<sub>4</sub> (5 mg) a roztok se míchal dalších 20 hodin při 20 °C. Následně se k roztoku přidala CH<sub>3</sub>COOH do pH 5,2 a směs se míchala 2 hodiny při 20 °C. Výsledný roztok se pak vysrážel 3 ml isopropanolu, tuhý podíl se odfiltraval a sušil za sníženého tlaku. Produkt byl analyzován pomocí NMR, DS 25 % a Mw 902 kg.mol<sup>-1</sup>.

## Příklad 33

Redukce kyseliny hyaluronové pomocí DMTMM a NaBH<sub>4</sub> ve vodě a acetonitrilu

5

Do roztoku HA (10 mg, 1350 kg.mol<sup>-1</sup>) v 1 ml vody a 0,86 ml acetonitrilu se přidal DMTMM (10 mg) a směs se míchala 24 hodin při 20 °C. Pak se přidal NaBH<sub>4</sub> (10 mg) a roztok se míchal dalších 2 hodiny při 20 °C. Následně se k roztoku přidala CH<sub>3</sub>COOH do pH 5,5 a směs se míchala 2 hodiny při 20 °C. Výsledný roztok se pak vysrážel 3 ml isopropanolu, tuhý podíl se odfiltraval a sušil za sníženého tlaku. Produkt byl analyzován pomocí NMR, DS 30 % a Mw 912 kg.mol<sup>-1</sup>.

10

## Příklad 34

Redukce kyseliny hyaluronové pomocí DMTMM a NaBH<sub>4</sub> ve vodě a acetonitrilu

15

Do roztoku HA (10 mg, 1350 kg.mol<sup>-1</sup>) v 1 ml vody a 0,86 ml acetonitrilu se přidal DMTMM (10 mg) a směs se míchala 24 hodin při 20 °C. Pak se přidal NaBH<sub>4</sub> (10 mg) a roztok se míchal dalších 30 hodin při 20 °C. Následně se k roztoku přidala CH<sub>3</sub>COOH do pH 5,1 a směs se míchala 2 hodiny při 20 °C. Výsledný roztok se pak vysrážel 3 ml isopropanolu, tuhý podíl se odfiltraval a sušil za sníženého tlaku. Produkt byl analyzován pomocí NMR, DS 27 % a Mw 805 kg.mol<sup>-1</sup>.

20

## Příklad 35

Redukce kyseliny hyaluronové pomocí DMTMM a NaBH<sub>4</sub> ve vodě a acetonitrilu

25

Do roztoku HA (10 g, 1800 kg.mol<sup>-1</sup>) v 1000 ml vody a 860 ml acetonitrilu se přidal DMTMM (10 g) a směs se míchala 24 hodin při 20 °C. Pak se přidal NaBH<sub>4</sub> (10 g) a roztok se míchal dalších 20 hodin při 20 °C. Následně se k roztoku přidala CH<sub>3</sub>COOH do pH 5,1 a směs se míchala 2 hodiny při 20 °C. Výsledný roztok se pak vysrážel 3000 ml isopropanolu, tuhý podíl se odfiltraval a sušil za sníženého tlaku. Produkt byl analyzován pomocí NMR, DS 26 % a SECMAALLS, Mw 866 kg.mol<sup>-1</sup>.

30

## Příklad 36

Redukce redukované kyseliny hyaluronové pomocí DMTMM a NaBH<sub>4</sub> ve vodě a acetonitrilu

35

Do roztoku redukované HA (4,5 g) připravené podle příkladu 35 v 500 ml vody a 430 ml acetonitrilu se přidal DMTMM (5 g) a směs se míchala 24 hodin při 20 °C. Pak se přidal NaBH<sub>4</sub> (5 g) a roztok se míchal dalších 20 hodin při 20 °C. Následně se k roztoku přidala CH<sub>3</sub>COOH do pH 4,9 a směs se míchala 2 hodiny při 20 °C. Výsledný roztok se pak vysrážel 1500 ml isopropanolu, tuhý podíl se odfiltraval a sušil za sníženého tlaku. Produkt byl analyzován pomocí NMR, DS 54 % a Mw 622 kg.mol<sup>-1</sup>.

40

## Příklad 37

45

Redukce redukované kyseliny hyaluronové pomocí DMTMM a NaBH<sub>4</sub> ve vodě a acetonitrilu

Do roztoku redukované HA (3,6 g) připravené podle příkladu 36 v 500 ml vody a 430 ml acetonitrilu se přidal DMTMM (5 g) a směs se míchala 24 hodin při 20 °C. Pak se přidal NaBH<sub>4</sub> (5 g) a roztok se míchal dalších 20 hodin při 20 °C. Následně se k roztoku přidala CH<sub>3</sub>COOH do pH 5,2 a směs se míchala 2 hodiny při 20 °C. Výsledný roztok se pak vysrážel 3000 ml isopropanolu, tuhý podíl se odfiltraval a sušil za sníženého tlaku. Produkt byl analyzován pomocí NMR, DS 60 %, Mw 501 kg.mol<sup>-1</sup>

50

55

## Příklad 38

Redukce redukované kyseliny hyaluronové pomocí DMTMM a NaBH<sub>4</sub> ve vodě a acetonitrilu

- 5 Do roztoku redukované HA (2,9 g) připravené podle příkladu 37 v 500 ml vody a 430 ml acetonitrilu se přidal DMTMM (5 g) a směs se míchala 24 hodin při 20 °C. Pak se přidal NaBH<sub>4</sub> (5 g) a roztok se míchal dalších 20 hodin při 20 °C. Následně se k roztoku přidala CH<sub>3</sub>COOH do pH 5,1 a směs se míchala 2 hodiny při 20 °C. Výsledný roztok se pak vysrážel 3000 ml isopropanolu, tuhý podíl se odfiltroval a sušil za sníženého tlaku. Produkt byl analyzován pomocí  
10 NMR, DS 67 % a SECMAALLS, Mw 402 kg.mol<sup>-1</sup>.

## Příklad 39

Redukce redukované kyseliny hyaluronové pomocí DMTMM a NaBH<sub>4</sub> ve vodě a acetonitrilu

- 15 Do roztoku redukované HA (2,2 g) připravené podle příkladu 38 v 300 ml vody a 258 ml acetonitrilu se přidal DMTMM (5 g) a směs se míchala 24 hodin při 20 °C. Pak se přidal NaBH<sub>4</sub> (5 g) a roztok se míchal dalších 20 hodin při 20 °C. Následně se k roztoku přidala CH<sub>3</sub>COOH do pH 5,1 a směs se míchala 2 hodiny při 20 °C. Výsledný roztok se pak vysrážel 3000 ml isopropanolu, tuhý podíl se odfiltroval a sušil za sníženého tlaku. Produkt byl analyzován pomocí  
20 NMR, DS 75 % a SECMAALLS, Mw 390 kg.mol<sup>-1</sup>.

## Příklad 40

- 25 Redukce kyseliny hyaluronové pomocí DMTMM a NaBH<sub>4</sub> ve vodě a acetonitrilu

Do roztoku HA (10 g, 1800 kg.mol<sup>-1</sup>) v 1000 ml vody a 860 ml acetonitrilu se přidal DMTMM (10 g) a směs se míchala 24 hodin při 15 °C. Pak se přidal NaBH<sub>4</sub> (10 g) a roztok se míchal dalších 20 hodin při 15 °C. Následně se k roztoku přidala CH<sub>3</sub>COOH do pH 5,1 a směs se míchala 2 hodiny při 20 °C. Výsledný roztok se pak vysrážel 3000 ml isopropanolu, tuhý podíl se odfiltroval a sušil za sníženého tlaku. Produkt byl analyzován pomocí NMR, DS 25 % a SECMAALLS, Mw 997 kg.mol<sup>-1</sup>.

## Příklad 41

- 35 Redukce kyseliny hyaluronové pomocí DMTMM a NaBH<sub>4</sub> ve vodě a acetonitrilu

Do roztoku HA (0,1 g, 1350 kg.mol<sup>-1</sup>) v 12 ml vody a 10,3 ml acetonitrilu se přidal DMTMM (0,1 g) a směs se míchala 24 hodin při 20 °C. Pak se přidal NaBH<sub>4</sub> (0,1 g) a roztok se míchal dalších 20 hodin při 20 °C. Následně se k roztoku přidala CH<sub>3</sub>COOH do pH 5,1 a směs se míchala 2 hodiny při 20 °C. Výsledný roztok se pak vysrážel 30 ml isopropanolu, tuhý podíl se odfiltroval a sušil za sníženého tlaku. Produkt byl analyzován pomocí NMR, DS 28 % a SECMAALLS, Mw 971 kg.mol<sup>-1</sup>.

## Příklad 42

- 45 Redukce kyseliny hyaluronové pomocí DMTMM a NaBH<sub>4</sub> ve vodě a acetonitrilu

Do roztoku HA (0,1 g, 1350 kg.mol<sup>-1</sup>) v 14 ml vody a 12 ml acetonitrilu se přidal DMTMM (0,1 g) a směs se míchala 24 hodin při 20 °C. Pak se přidal NaBH<sub>4</sub> (0,1 g) a roztok se míchal dalších 20 hodin při 20 °C. Následně se k roztoku přidala CH<sub>3</sub>COOH do pH 5,1 a směs se míchala 2 hodiny při 20 °C. Výsledný roztok se pak vysrážel 30 ml isopropanolu, tuhý podíl se odfiltroval a sušil za sníženého tlaku. Produkt byl analyzován pomocí NMR, DS 27 % a SECMAALLS, Mw 959 kg.mol<sup>-1</sup>.

## Příklad 43

5 Testování vlivu redukované kyseliny hyaluronové připravené podle příkladů 20, 23 a 28 na viabilitu 3T3 fibroblastů a kožních keratinocytů HaCaT.

10 Myši fibroblasty Swiss 3T3 i lidské keratinocyty HaCaT byly kultivované v DMEM médiu s obsahem 10% FBS (5% CO<sub>2</sub>, 37 °C). Cytotoxita byla měřena prostřednictvím MTT testu. Po dosažení 80% konfluency byly buňky zpasážované a vyseté na 96-jamkovou desku v hustotě 3000 (3T3) nebo 5000 (HaCaT) buněk na jamku. Po inkubaci do druhého dne bylo kultivační médium vyměněno za testované vzorky (CTRL = kultivační médium). Po 24, 48 a 72 hodinách od treatmentu buněk bylo přidáno 20 µl MTT (5 mg/ml) a následovala 2,5 hodinová inkubace. Na závěr bylo kultivační médium se vzorky z destičky vyklepnuto a byl přidán lyzační roztok (IPA: DMSO (1:1), Triton X-100 (10%)). Po zlyzování buněk byla měřena absorbance na spektrometru

15 Ensight (Perkin Elmer) při vlnové délce 570 nm, (690 nm pozadí).

Na obr. 1 a 2 jsou znázorněny grafy viability 3T3, resp. HaCaT, zobrazující proliferaci buněk v čase. Graf vyjadřuje změnu viability buněk vztaženou ke kontrole v daném čase – tedy neovlivněná kontrola odpovídá hodnotě 0; pokud je hodnota kladná nebo záporná max. do -20 %, interpretuje se to tak, že látka nemá cytotoxický efekt.

20

## Příklad 44

25 Testování vlivu redukované HA připravené podle příkladů 21 a 28 na viabilitu HaCaT po vysušení.

Buňky HaCat (linie lidských epidermálních keratinocytů) byly vysety na 48-jamkovou desku. Po dosažení 100% konfluency bylo odebráno kultivační médium a na monovrstvu se nanoslo 150 µl testovaných vzorků. Buňky byly inkubovány 30 minut (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>). Následně byly vzorky odebrány a deska bez víčka byla vložena do klimatické komory (37 °C, 45 % vlhkost) na dalších

30 30 minut. Byly použity 2 kontroly – buňky „nasucho“ bez kultivačního média a kontrola standardních podmínek s kultivačním médiem.

Na závěr bylo provedeno měření buněčné viability pomocí metody MTT. Do každé jamky bylo přidáno 550 µl kultivačního média s MTT (1 mg/ml) a buňky byly inkubovány 2,5 hodiny. Po inkubaci byly buňky zlyzovány 550 µl isopropanol : DMSO (1 : 1), Triton X – 100 (10 %). Pomocí spektrometru (Ensight, Perkin Elmer) byla změřena absorbance při referenční vlnové délce 570 nm a 690 nm pozadí. Výsledky jsou znázorněny na obr. 3.

35

Hodnoty absorbancí jsou vztažené k neovlivněné kontrole standardních podmínek, která odpovídá 100 % viability.

40

## Příklad 45

45 Porovnání tepelné degradace redukované HA připravené podle příkladů 20, 22 a 28 s nativní HA v roztoku.

200 mg redukované HA bylo rozpuštěno ve 40 ml roztoku vodního fosfátového pufru o pH 7,4. Směs se míchala při 80 °C, přičemž se v určitých časových intervalech (0 až 70 hodin) odebíraly 4 ml roztoku, které byly následně analyzovány pomocí metody SEC-MALLS na stanovení molekulové hmotnosti. Výsledky jsou znázorněny na obr. 4.

50

## Příklad 46

55 Porovnání tepelné degradace redukované HA připravené podle příkladu 39 s nativní HA v tuhé fázi.

- 50 mg redukované HA bylo rozdrobeno na prášek, který se zahříval při 120 °C dvě hodiny pod atmosférou plynného dusíku. Stejným způsobem byla pak tepelně namáhaná nativní kyselina hyaluronová (DS = 0 %, Mw 517 kg.mol<sup>-1</sup> a 267 kg.mol<sup>-1</sup>). Pomocí metody SEC-MALLS byla následně stanovena a porovnána molekulová hmotnost derivátu a nemodifikované kyseliny hyaluronové. Výsledky jsou znázorněny na obr. 5.

#### Příklad 47

- 10 Porovnání enzymatické degradace redukované HA připravené podle příkladů 22 a 28 s nativní HA.

- 8 mg redukované HA bylo rozpuštěno v 0,8 ml roztoku obsahujícího 0,01 mol.l<sup>-1</sup> octanového pufru a 0,03 mol.l<sup>-1</sup> NaCl v D<sub>2</sub>O. Pak byla přidána kyselina octová na dosažení pH 5,3. Do této směsi bylo přidáno 100 jednotek enzymu BTH a směs se míchala 24 hodin při 37 °C. Finální roztok pak byl ochlazen na 20 °C a změřen na NMR. Hodnota průměrné molekulové hmotnosti polysacharidu byla vypočtena na základě poměru integrálu signálů vodíků anomerního konce při 5,16 ppm a integrálu vodíků -CH<sub>3</sub> skupiny při 2,0 ppm. Výsledky jsou znázorněny na obr. 6.

#### Příklad 48

- 20 Biokompatibilita a bezpečnost redukované HA připravené podle příkladu 21 a 37 v subkutánní aplikaci

- Vzorky redukované HA (DS 29 %, Mw 823 kg.mol<sup>-1</sup>, respektive DS 60%, Mw 550 kg.mol<sup>-1</sup>), byly rozpuštěny ve fyziologickém roztoku (0,9 % NaCl) na koncentraci 10 mg/ml a sterilně filtrovány (0,22 µm). Myším kmene C57Bl/6J v celkové narkóze byly tyto roztoky aplikovány subkutánně na 3 separátní místa na zádech (po 20 µl). Po 1, 2 a 7 dnech byly myši v celkové narkóze usmrceny a byly odebrány vzorky kůže a podkoží a fixovány ve 4% formaldehydu. Následně bylo provedeno histologické vyšetření stavby tkáně na vzorcích barvených hematoxylinem a eosinem. Reprezentativní histologické snímky jsou uvedeny na obrázku č. 7. Ve srovnání s kontrolou (fyziologický roztok) nebyly po 1, 2 ani 7 dnech po podání pozorovány žádné patologické změny naznačující toxicitu, dráždivost či jiné negativní vlivy redukované HA při subkutánním podání.

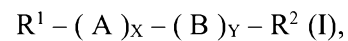
#### Příklad 49

- 35 Příprava kompozice na bázi redukované HA

- 50 mg redukované HA připravené podle příkladu 26 (DS 43 % a Mw 729 kg.mol<sup>-1</sup>) bylo rozpuštěno v 10 ml 0,9% roztoku NaCl ve vodě. Výsledný roztok byl pak ve sterilních podmínkách filtrován přes nitrocelulózový filtr 0,1 až 0,2 µm. Finální roztok je vhodný pro intraartikulární aplikaci do synoviální dutiny.

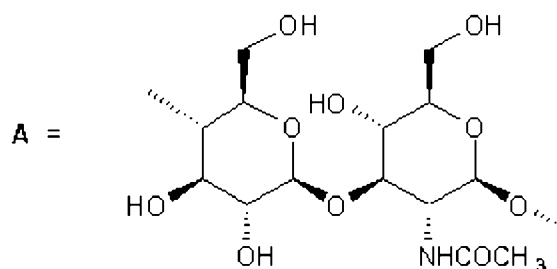
## PATENTOVÉ NÁROKY

1. Redukovaný derivát kyseliny hyaluronové ve formě lineárního řetězce, který má některé karboxylové skupiny -COOH nahrazené primární hydroxylovou skupinou -CH<sub>2</sub>-OH strukturního vzorce I,

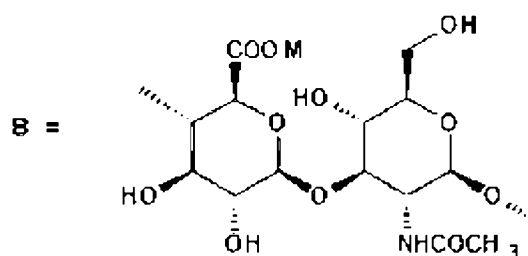


kde

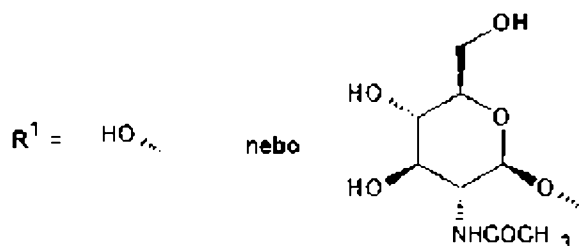
A je strukturní fragment lineárního řetězce:



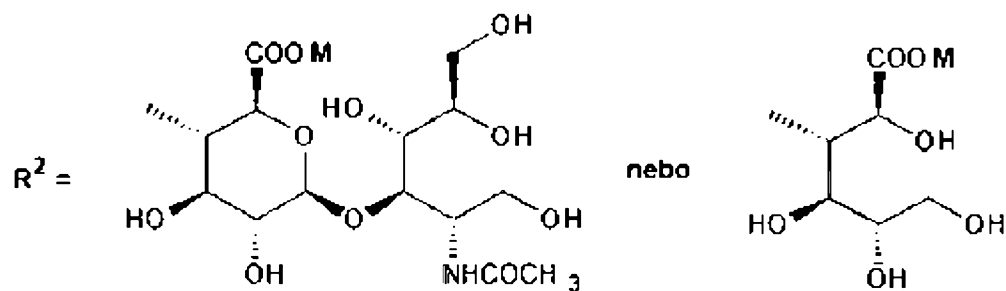
B je strukturní fragment lineárního řetězce:



R<sup>1</sup> je strukturní fragment konce lineárního řetězce:



R<sup>2</sup> je strukturní fragment konce lineárního řetězce:



M může být vodík nebo kation alkalického kovu,  
 X je index označující počet strukturních fragmentů A v rámci řetězce,  
 Y je index označující počet strukturních fragmentů B v rámci řetězce,  
 přičemž současně platí, že:

- strukturní fragmenty A a B jsou v lineárním řetězci rozmístěny náhodně, a
- součet indexů  $X + Y$  je v rozsahu 500 až 2500, a
- poměr indexů  $X/Y$  je v rozmezí 3/1 až 1/4.

2. Způsob přípravy redukovaného derivátu kyseliny hyaluronové definovaného v nároku 1, **vyznačující se tím**, že se připraví vodný roztok výchozí kyseliny hyaluronové o molekulové hmotnosti v rozmezí 400 až 2200 kg.mol<sup>-1</sup>, jehož koncentrace je v rozmezí 0,3 až 2 % hmotn., přidá se acetonitril v množství 50 až 100 % objemu vodného roztoku, pak se přidá 4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorfoliniumchlorid v množství 0,7 až 2,3 hmotnostního ekvivalentu vzhledem ke kyselině hyaluronové a směs se nechá reagovat 15 až 30 hodin při teplotě 15 až 25 °C, pak se přidá 0,5 až 2,3 hmotnostního ekvivalentu NaBH<sub>4</sub> vzhledem ke kyselině hyaluronové a roztok se míchá 2 až 30 hodin při teplotě 15 až 25 °C, načež se do roztoku postupně přidává kyselina octová až do dosažení hodnoty pH v rozmezí 4,5 až 5,5, směs se míchá 1,5 až 3 hodiny při teplotě 15 až 25 °C, a pak se finální produkt izoluje.

3. Způsob přípravy podle nároku 2, **vyznačující se tím**, že kyselina hyaluronová ve vodném roztoku má molekulovou hmotnost v rozmezí 800 až 1400 kg.mol<sup>-1</sup>.

4. Způsob přípravy podle nároku 2, **vyznačující se tím**, že acetonitril se přidá v množství 75 až 90 % objemu vodného roztoku a/nebo že 4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorfoliniumchlorid se přidá v množství 0,9 až 1,2 hmotnostního ekvivalentu vzhledem ke kyselině hyaluronové a/nebo že NaBH<sub>4</sub> se přidá v množství 0,7 až 1,1 hmotnostního ekvivalentu vzhledem ke kyselině hyaluronové.

5. Způsob přípravy podle nároku 2, **vyznačující se tím**, že se finální produkt následně opětovně podrobí dva až pět krát způsobu definovanému v nároku 2.

6. Kompozice pro kosmetické a/nebo zdravotnické účely **vyznačující se tím**, že obsahuje derivát kyseliny hyaluronové definovaný v nároku 1 v koncentraci 0,01 až 99 % hmotn. a aditivum vybrané ze skupiny zahrnující vodu, chlorid sodný, chlorid vápenatý, glycerol, kyselinu hyaluronovou, chondroitin sulfát.

7. Kompozice podle nároku 6, **vyznačující se tím**, že je ve formě roztoku nebo gelu ve vodném rozpouštědle.

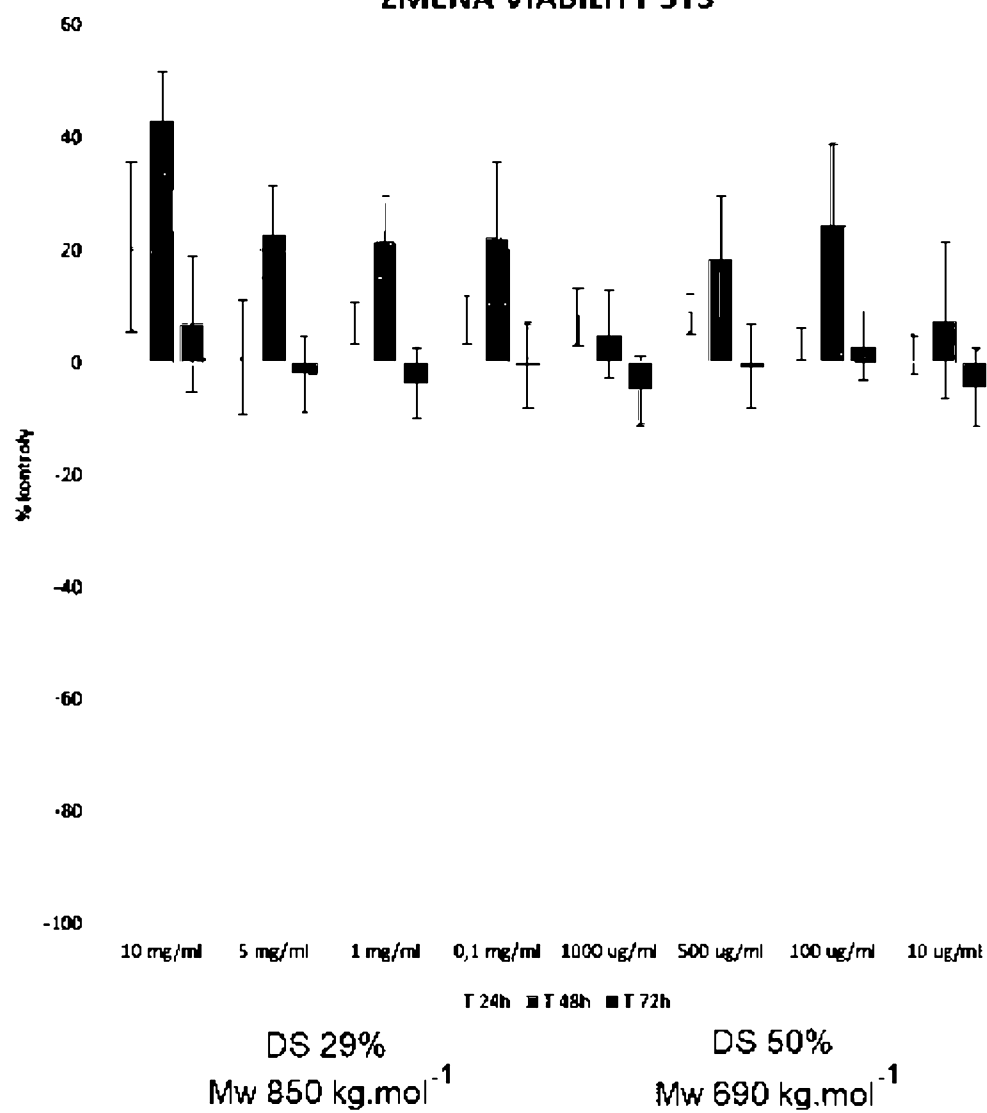
8. Kompozice podle nároku 6, **vyznačující se tím**, že je ve formě pevného substrátu vybraného ze skupiny zahrnující lyofilizát, nebo prášek.

9. Použití redukovaného derivátu definovaného v nároku 1 pro viskosuplementace, dermální výplně proti vráskám, výplně fascií, oční kapky, nebo pro přípravu implantabilních zdravotnických prostředků.

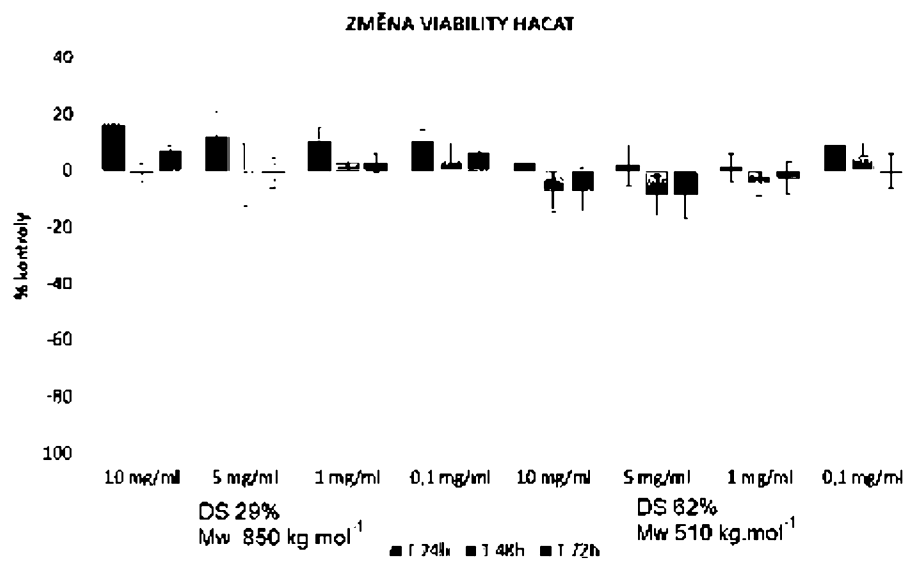
10. Použití kompozice definované v nárocích 6 až 8 pro viskosuplementace, dermální výplně proti vráskám, roztoky pro výplně fascií, oční kapky, roztoky pro uchovávání kontaktních čoček nebo pro přípravu implantabilních zdravotnických prostředků.



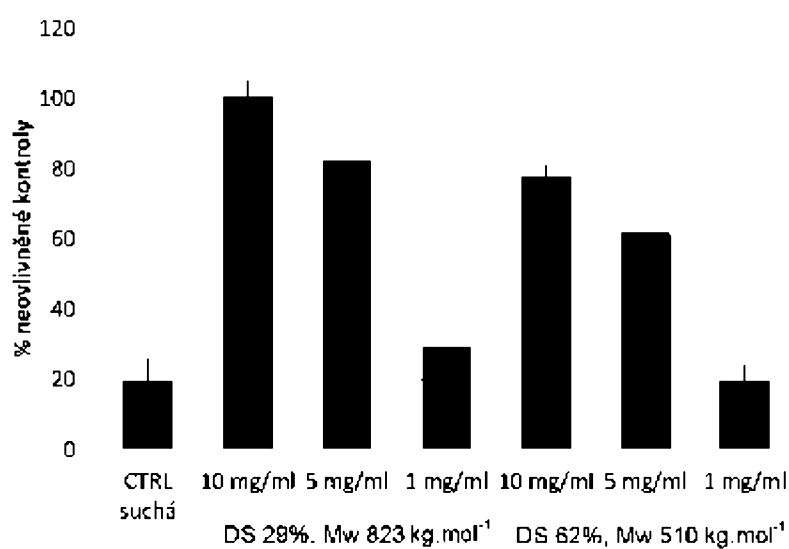
## ZMĚNA VIABILITY 3T3



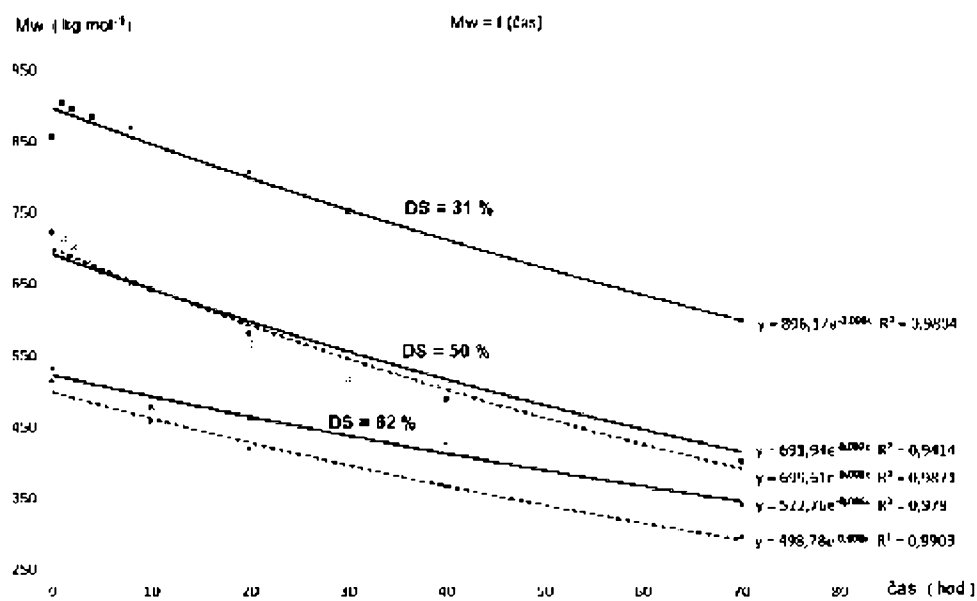
Obr. 1



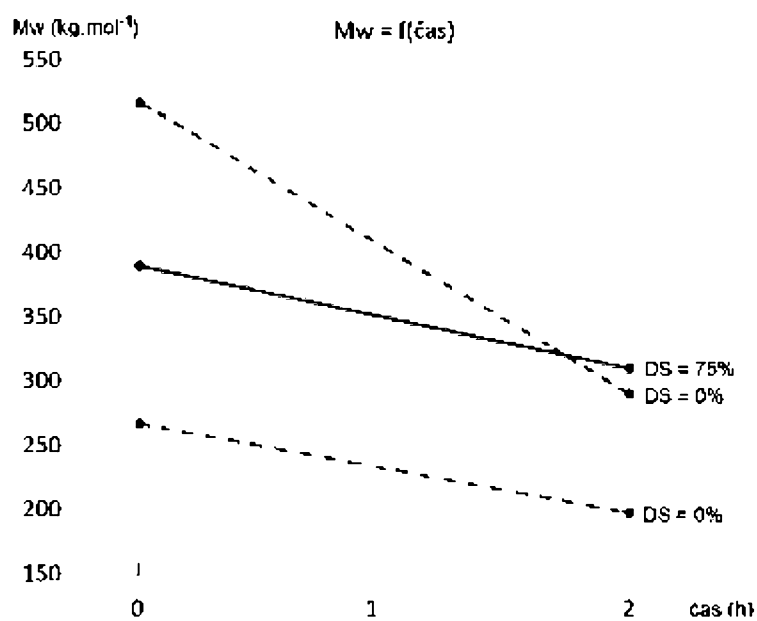
Obr. 2



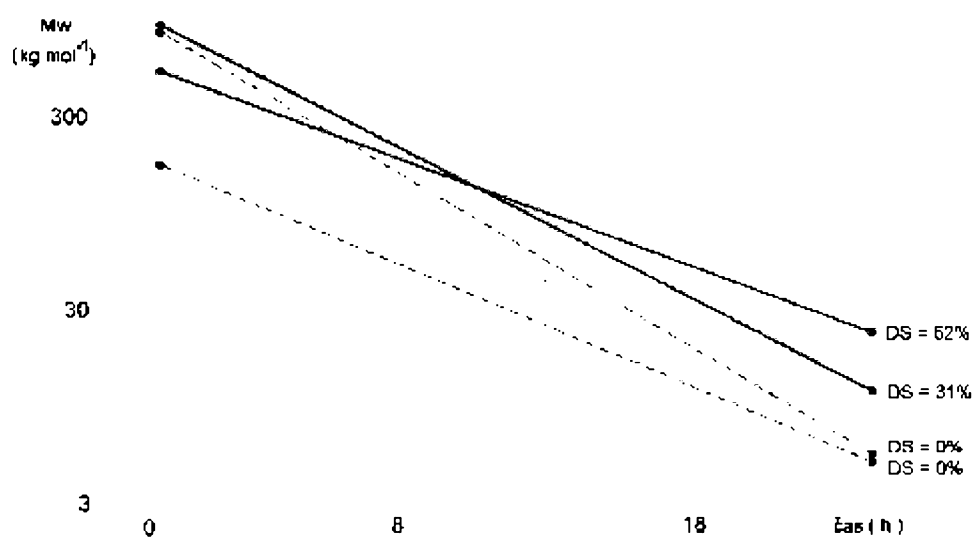
Obr. 3



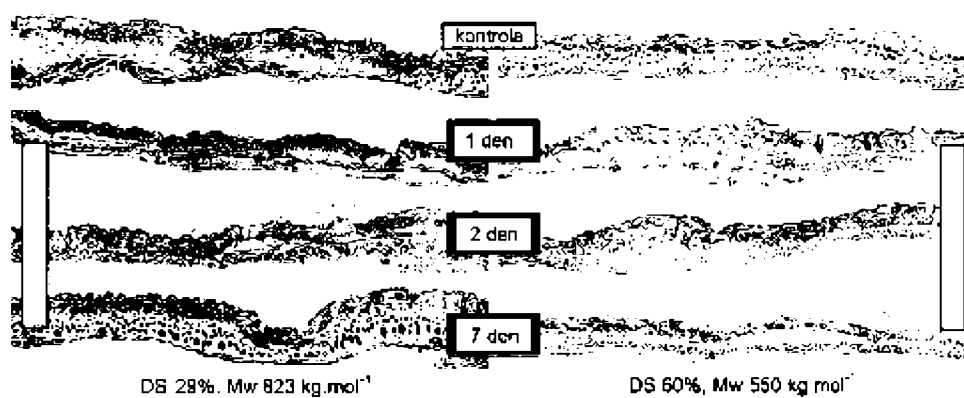
Obr. 4



Obr. 5



Obr. 6



Obr. 7