

PATENTOVÝ SPIS

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2012-136**
(22) Přihlášeno: **28.02.2012**
(40) Zveřejněno: **05.06.2013**
(**Věstník č. 23/2013**)
(47) Uděleno: **25.04.2013**
(24) Oznámení o udělení ve Věstníku: **05.06.2013**
(**Věstník č. 23/2013**)

(11) Číslo dokumentu:

303 879

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:
C08B 37/08 (2006.01)
A61K 31/728 (2006.01)

(56) Relevantní dokumenty:

WO 2011028031 A2; CZ 302503 B6; CZ 302504 B6; WO 2011059326 A2; WO 2011059325 A2; US 20070149441 A1.
Jason A. Burdick and Glenn D. Prestwich : Hyaluronic Acid Hydrogels for Biomedical Applications, Advanced Materials 2011, 23, H41-H56.

(73) Majitel patentu:

Contipro Biotech s.r.o., Dolní Dobrouč, CZ

(72) Původce:

Wolfová Lucie, Opava, CZ
Pravda Martin, Kočí, okr. Chrudim, CZ
Foglarová Marcela, Machov, CZ
Němcová Miroslava, Choceň, CZ
Niedoba Krzysztof, P1 616 Goleśzów, PL
Velebný Vladimír, Žamberk, CZ

(74) Zástupce:

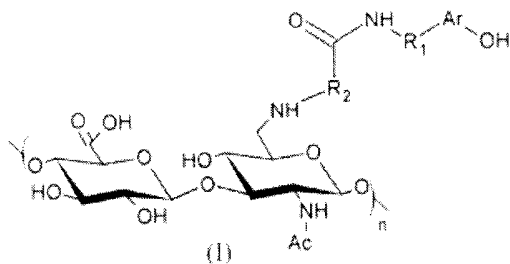
Ing. Lucie Lunzarová, Mendlovo nám. 1a, Brno, 60300

(54) Název vynálezu:

Deriváty na bázi kyseliny hyaluronové schopné tvořit hydrogely, způsob jejich přípravy, hydrogely na bázi těchto derivátů, způsob jejich přípravy a použití

(57) Anotace:

Řešení se týká derivátu hyaluronanu podle obecného vzorce (I), kde Ar je fenyl a R₁ je ethylen, nebo Ar je indol a R₁ je ethylen, nebo Ar je indol a R₁ je karboxyethylen, a kde R₂ je alkyl o počtu uhlíků 3 až 7, a kde n je v rozmezí od 1 do 7500. Dále je popsán způsob jeho přípravy, hydrogel na bázi tohoto derivátu, způsob přípravy hydrogelu a použití hydrogelu ve tkáňovém inženýrství, kosmetice, medicíně nebo regenerativní medicíně, zejména ve formě scaffoldů pro léčbu defektů kloubní chrupavky nebo kostních tkání.



CZ 303879 B6

Deriváty na bázi kyseliny hyaluronové schopné tvořit hydrogely, způsob jejich přípravy, hydrogely na bázi těchto derivátů, způsob jejich přípravy a použití

5 Oblast techniky

Vynález se týká nového derivátu hyaluronanu vhodného pro přípravu hydrogelů a způsobu jeho přípravy. Dále hydrogelů na bázi tohoto derivátu, jejich vlastností, využití a způsobu přípravy.

10

Dosavadní stav techniky

Hyaluronan je polysacharid, který se skládá z disacharidických jednotek složených z D–glukuronové kyseliny a D–N–acetylglukosaminu vázaných alternujícími β –1,4 a β –1,3 glykosidickými vazbami. Hmotnostní průměr molekulové hmotnosti (pokud bude v dalším textu zmiňována molekulová hmotnost, bude se vždy jednat o hmotnostní průměr molekulové hmotnosti) *in vivo* bývá v rozsahu 3 kDa až 20 MDa. Jedná se o polysacharid, který je snadno rozpustný ve vodném prostředí, kde v závislosti na molekulové hmotnosti a koncentraci vytváří velmi viskózní roztoky.

Hydrogely jsou materiály, které jsou tvořeny ve vodě nerozpustnou sítí alespoň částečně hydrofilních polymerů¹. Cest, kterými lze vytvořit nerozpustnou síť původně hydrofilního polymeru, je několik. Jedná se o hydrofobizaci polymeru² či využití ve vodě rozpustného derivátu polymeru nesoucího reaktivní funkční skupiny, které se mohou účastnit dalších chemických reakcí vedoucích ke vzniku trojrozměrné polymerní sítě^{3–5}.

25

Příprava rozpustných derivátů hyaluronanu a jejich následné zesítnění bylo popsáno řadou autorů^{3–6}. Rovněž bylo v minulosti popsáno využití fenolického derivátu hyaluronanu pro síťovací reakce a přípravu hydrogelů. Calabro *et al.*,^{4,7,8} popisují způsob přípravy fenolických derivátů hyaluronanu reakcí karboxylů, přítomných ve struktuře D–glukuronové kyseliny hyaluronanu, s aminoalkyl–deriváty fenolu. Produktem této reakce jsou amidy hyaluronanu. Pro popsáný průběh syntézy je klíčová aktivace karboxylu hyaluronanu, ke které je v tomto případě využita reakce s dehydratačními činidly typu karbodiimidů (např. EDC). Jako aminoalkylfenol je nejčastěji využíván tyramin⁶.

30

Obecně je zesítnění fenolických derivátů hyaluronanu iniciováno přidávkou peroxidázy (např. křenové peroxidázy – HRP) a zředěného roztoku peroxidu vodíku. Křenová peroxidáza (Horseradish peroxidase, HRP, E.E.1.11.1.7) je v současné době široce využívána jako katalyzátor organických a biotransformačních reakcí^{9–13}. Vyznačuje se velmi širokou substrátovou specifitou, a je proto schopna oxidovat řadu organických a anorganických sloučenin^{13–15}.

40

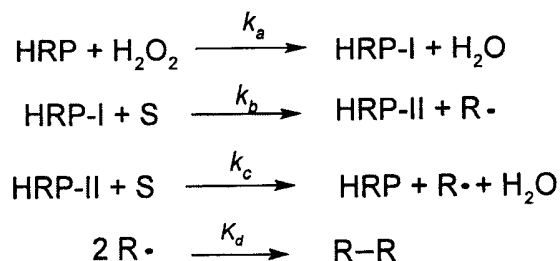
Jedná se o enzym obsahující jako prostetickou skupinu hem s obsahem železa. To se v neaktivovaném enzymu nachází v oxidačním stupni (III). Při reakci s peroxidy dochází ke vzniku intermediátu, který je označován jako HRP–I. Železo hemu $\text{Fe}^{(\text{III})}$ je oxidováno oxyferrylovou skupinou ($\text{Fe}^{(\text{IV})}=\text{O}$) a na porfyrinovém kruhu zároveň dochází ke vzniku kationického π –radikálu. Takto aktivovaný enzym je schopen vytvářet komplexy s molekulami substrátu, který během této interakce podléhá oxidaci^{14,16–18}.

45

Přeměna oxidované formy enzymu zpět do jeho výchozí podoby probíhá ve dvou stupních. V první fázi dochází k reakci mezi molekulou substrátu (S) a HRP–I za vzniku radikálu substrátu ($\text{R}\cdot$) a částečně redukované formy enzymu HRP–II. HRP–II si stále zachovává oxyferrylovou skupinu ($\text{Fe}^{(\text{IV})}=\text{O}$), ale již neobsahuje porfyrinový π –radikál. Během přechodu tronu a porfyrinový radikál je zároveň protein přebrán jeden H^+ . HRP–II opět podstupuje reakci se substrátem za vzniku $\text{R}\cdot$. Oxyferrylová skupina ($\text{Fe}^{(\text{IV})}=\text{O}$) je během této reakce redukována zpět na $\text{Fe}^{(\text{III})}$. Tento proces je spojen s transferem 2 H^+ na kyslík oxyferrylové skupiny. Jeden proton

50

pochází ze substrátu (nebo solventu), druhý z proteinu. Výsledkem je vznik molekuly vody (Rovnice I a Schéma I).



Rovnice I: Základní popis mechanismu katalýzy oxidace substrátu pomocí HRP

Vzniklé radikály substrátu jsou v řadě případů schopné vzájemně reagovat za vzniku dimerů R-R. Tento proces již není enzymaticky ovlivněn a souvisí se stabilitou a reaktivitou vzniklých radikálů.^{14, 16-26}

V případě enzymatické síťovací reakce fenolického derivátu polysacharidu je tedy substrát (fenol – reaktivní ligand vázaný na polymer) přeměňován enzymem na reaktivní radikál. Tento radikál následně může reagovat s dalším fenolickým radikálem za vzniku dityraminu. Předpokládáme-li volnou pohyblivost molekul substrátu (ligandu) enzymatické reakce a průběh reakce přesně kopírující rovnici I, měl by enzym (je-li použito dostatečné množství peroxidu) postupně přeměnit všechny molekuly substrátu na reaktivní radikály a ty by, při dostatečně dlouhém reakčním čase, postupně všechny podlely dimerizaci (např. oligomerizaci). V případě vazby substrátu (ligandu) na polymer, by stupeň zesítnění polymeru měl vždy dosáhnout stejné hodnoty, i když doba dosažení této hodnoty by se lišila podle množství použitého enzymu. V praxi tomu tak však není. V literatuře²⁷ jsou podrobněji popsány vztahy mezi očekávaným poměrem intramolekulárních a intermolekulárních zesítnění a molekulovou hmotností polymerních segmentů mezi místy zesítnění (hustot zesítnění, délkou mezi uzly sítě), přičemž intramolekulární interakce vedoucí k zesítnění jsou, na rozdíl od intermolekulárních zesítnění, uváděny jako elasticky neefektivní.

Dále je z literatury známo, že v případě využití fenolických derivátů HA množství enzymu ovlivňuje nejen rychlost síťovací reakce, ale výrazným způsobem ovlivňuje i výsledné mechanické vlastnosti hydrogelů^{4,6,7,28}. Literatura uvádí, že reologickými měřeními bylo zjištěno, že modul pružnosti ve smyku (G') je vyšší, pokud je použita vyšší koncentrace enzymu. Autoři tento jev zdůvodňují vyšší hustotou zesítnění hydrogelů. Pokud je nutno připravit maximálně tuhý hydrogel, musí síťovací reakce probíhat za relativně vysoké koncentrace peroxidázy a tedy i rychleji. Příliš rychlý průběh reakce pak ale může vést ke vzniku nehomogenně zesítněného hydrogelu. Ve vzorcích se tak mohou vyskytnout místa, která nejsou zesítněna vůbec. Příliš rychlý průběh reakce může také působit problémy při umísťování gelu do místa jeho finální aplikace apod.

Příčinou je malá vzdálenost reaktivního centra od základního řetězce polymeru. Malá pohyblivost ligandu snižuje pravděpodobnost efektivní srážky radikálů ligandů za vzniku dityraminu. Proto, je-li v systému malá koncentrace enzymu, vznikne za časovou jednotku malé množství reaktivních forem ligandu. Síťovací reakce tedy jednak probíhá pomalu a jednak je málo efektivní.

Park et. al.²⁹ se pokusil zvýšit reaktivitu ligandů vázaných na polymeru vložím vhodného spaceru mezi reaktivní ligand a řetězec polymeru. Spis popisuje vložení hydrofilního řetězce mezi řetězec polysacharidu a fenolické či anilinové jádro za účelem zvýšení reaktivity těchto substituentů. Hlavním důvodem pro zavedení hydrofilního řetězce do struktury polymeru bylo zlepšení jeho rozpustnosti a zlepšení přístupnosti reaktivních center (fenolické či anilinové jádro). Snadnější prostorová přístupnost reakčních center zvyšuje pravděpodobnost reakce mezi ligandy. Tento krok vede nejčastěji, při zachování stejné aktivity enzymu, k vyššímu stupni substituce, vyšší koncentraci a lepší homogenitě zesítnění hydrogelů. Díky zavedení tohoto hydrofilního

řetězce do struktury hydrogelu je navíc dle autora zvýšena jeho biostabilita a mechanické vlastnosti. Park et al. však jako „spacer“ používají hydrofilní polymer PEG o molekulové hmotnosti 3500 Da, a proto se ve výsledku spíše jedná o kopolymer. Takovým zásahem do struktury hydrogelu, i při malém stupni substituce, však dochází k zásadním změnám fyzikálních vlastností
 5 původního polymeru. Navíc v případě hyaluronanu vede sice vyšší koncentrace zesítnění ke zvýšení tvrdosti hydrogelu, ale současně i ke zvýšení jeho křehkosti, což je pro zamýšlené použití ve tkáňovém inženýrství nežádoucí. U materiálu určeného pro scaffoldy, například, ale nejen pro scaffoldy do kloubní chrupavky, se klade velký důraz na to, aby byl dostatečně pevný a odolný, přičemž materiál, který je křehký, se při větším zatížení ihned nevratně deformuje a v případě
 10 hydrogelů dochází i k jeho úplné destrukci.

Podstata vynálezu

15 Cílem vynálezu tedy je nalézt takový materiál, který by byl dostatečně pevný a současně i houževnatý a u něhož by nedošlo k nijak zásadním změnám biologických a fyzikálních vlastností oproti původnímu polymeru. Pevnost hydrogelu na bázi hyaluronanu lze obecně zvýšit zvýšením koncentrace zesítnění, a to například zvýšením koncentrace polymeru v roztoku, z něhož se hydrogel tvoří, nebo zvýšením stupně substituce polymeru. Oba tyto způsoby však v dosavadním stavu
 20 techniky vedly v případě hyaluronanu i ke zvýšení křehkosti výsledného hydrogelu, což výrazně omezuje možnost použití hydrogelu.

Problém, který řeší tento vynález, spočívá v nalezení takových derivátů, které by vedly ke zvýšení reaktivity ligandů a zvýšení tuhosti hydrogelů, při zachování fyzikálních a biologických
 25 vlastností původního polymeru. Překvapivě bylo zjištěno, že zavedením poměrně krátkého spaceru (o molekulové hmotnosti přibližně 130 Da) podle vynálezu mezi reaktivní ligand a HA má za následek již při velmi nízkém stupni substituce výrazné zvýšení houževnatosti výsledného hydrogelu.

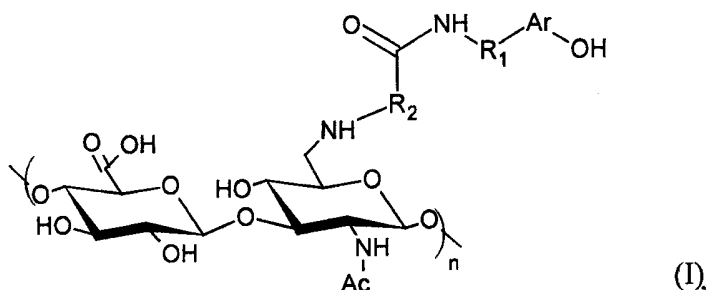
30 V jednom aspektu se tedy vynález týká derivátu HA nesoucího reaktivní ligandy vázané prostřednictvím hydrofobních spacerů, s cílem zvýšit pohyblivost ligandů a zvýšit tak pravděpodobnost jejich efektivní srážky a to i v případě, kdy je jich v systému malá koncentrace (nízký stupeň substituce a malá aktivita enzymu). Bylo zjištěno, že i přes velice nízké hmotnostní zastoupení spaceru v hydrogelu, tvoří např. pouhých 0,01 až 0,02 %, dochází k výraznému navýšení houževnatosti a pevnosti tohoto hydrogelu oproti hydrogelu z analogického HA derivátu bez vloženého
 35 spaceru (tzn. stejná koncentrace, molární hmotnost a stupeň substituce/zesítnění). Vynález se tedy týká tohoto nového derivátu hyaluronanu vhodného pro přípravu hydrogelů a způsobu jeho přípravy. Dále se týká hydrogelů na bázi toho derivátu, jejich využití a postupu přípravy.

40 Hydrogel je připraven způsobem využívajícím zesítnění řetězců modifikovaného hyaluronanu reakcí, která je katalyzována křenovou peroxidázou či jejími analogy. Vhodné deriváty hyaluronanu obsahují ve své struktuře fenolická či heteroarylfenolická jádra kovalentně vázaná k základnímu řetězci polysacharidu. Proces zesítnění lze popsat jako kaskádu na sebe navazujících chemických reakcí, která začíná vznikem reaktivních forem kyslíku (ROS) v systému. Ty jsou ke směsi
 45 přidány nebo je jejich vznik umožněn přítomností chemických sloučenin, které slouží jako jejich „generátor“. ROS aktivují enzym peroxidázu, či její analogy, která následně katalyzují dimerizaci (popř. oligomerizaci) aromatických či heteroaromatických jader přítomných ve struktuře derivátu hyaluronanu. Tím dochází ke vzniku trojrozměrné polymerní sítě.

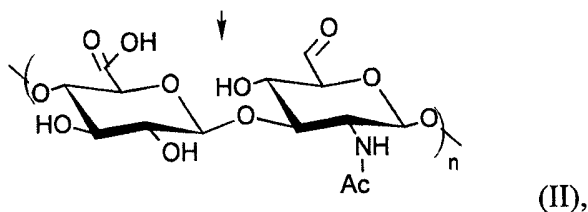
50 Dle tohoto vynálezu je k přípravě hydrogelu používán hyaluronan modifikovaný navázáním ligandu obsahujícího aminoalkylfenol či aminoalkylheteroarylfenol (např. tyramin, 5-hydroxytryptofan, serotonin). Deriváty hyaluronanu popisované v tomto vynálezu obsahují ligand, který je navázán na polysacharid prostřednictvím spaceru. Přítomnost tohoto spaceru ve struktuře derivátu HA vede díky jeho flexibilitě k navýšení elasticity a volnosti možností konformačních
 55 uspořádání zúčastněných segmentů polymeru a tím i možnosti disipace deformační energie.

Zavedení spaceru také zvětšuje vzdálenost reaktivního aromatického centra (fenolu, heteroaryl fenolu) od základního řetězce polymeru, zlepšuje jeho přístupnost pro interakci s enzymem a zásadním způsobem ovlivňuje průběh síťovací reakce a vlastnosti vzniklého hydrogelu.

- 5 Ve svém prvním aspektu se vynález týká derivátu na bázi kyseliny hyaluronové podle obecného vzorce (I)



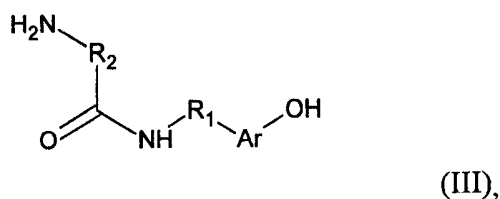
- 10 kde Ar je fenyl a R₁ je ethylen, nebo Ar je indol a R₁ je ethylen, nebo Ar je indol a R₁ je karboxy-ethylen, a kde R₂ je alkyl o počtu uhlíků 3 až 7, a kde n je v rozmezí od 1 do 7500. V dalším aspektu se vynález týká způsobu přípravy derivátu podle obecného vzorce (I), kde se nejprve připraví aldehydický derivát kyseliny hyaluronové podle vzorce (II),



15

kde aldehydický derivát se připraví s použitím oxidačního systému 4-acetamidová-TEMPO/NaClO v protickém prostředí a má stupeň substituce 5 až 15 % a molekulovou hmotnost v rozmezí 10 000 g/mol až 2 000 000 g/mol, dále se zvláště připraví sloučenina obecného vzorce (III)

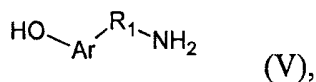
20



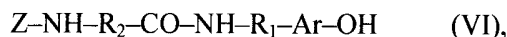
- 25 kde Ar je fenyl a R¹ je ethylen, nebo Ar je indol a R₁ je ethylen, nebo Ar je indol a R₁ je karboxy-ethylen, a kde R₂ je alkyl o počtu uhlíků 3 až 7, a kde n je v rozmezí od 1 do 7500, přičemž sloučenina obecného vzorce (III) se připraví reakcí prekursoru spaceru podle vzorce (IV)



- 30 kde Z je chránicí skupina běžně používaná k ochraně primární aminoskupiny, s ligandem podle vzorce (V)



v aprotickém prostředí při teplotě v rozmezí 40 °C až 150 °C po dobu 1 až 24 hodin v přítomnosti činidla aktivujícího karboxylové funkční skupiny, za vzniku sloučeniny obecného vzorce (VI)



5

ze které se sloučenina obecného vzorce (III) připraví odstraněním chránicí skupiny Z, a pak se aldehydický derivát kyseliny hyaluronové podle vzorce (II) nechá reagovat se sloučeninou obecného vzorce (III) při pH v rozmezí 3 až 8 při laboratorní teplotě po dobu 1 až 72 hodin v přítomnosti pikolin-boranového komplexu za vzniku derivátu podle vzorce (I).

10

Derivát podle vynálezu tedy obsahuje ligand, schopný postupovat oligomerizaci působením vhodného činidla, a flexibilní spacer, který je vložen mezi řetězec hyaluronanu a ligand. Ligand dle obecného vzorce (V) podle vynálezu je s výhodou vybrán ze skupiny zahrnující tyramin, serotonin a 5-hydroxytryptofan. Sloučenina obecného vzorce (IV), tj. prekurzor spaceru, je s výhodou vybrána ze skupiny aminokyselin zahrnující deriváty ω -[(*tert*-butoxykarbonyl)-amino]karboxylových kyselin, kde R_2 je alkyl o počtu uhlíků 3 až 7.

15

Podle ještě dalšího výhodného provedení způsobu podle vynálezu probíhá reakce prekurzoru spaceru s ligandem v prostředí THF nebo DMF při teplotě 50 °C po dobu 2 až 6 hodin v přítomnosti 1,1'-karbodiimidazolu.

20

Dále je výhodné, když se odstranění chránicí skupiny Z provede prostřednictvím trifluoroctové nebo chlorovodíkové kyseliny.

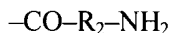
Pro potřeby vynálezu jsou jako meziprodukt spacer-ligand označovány sloučeniny obecného vzorce:

25



S výhodou je jako spacer použita sloučenina obecného vzorce:

30



– kde R_2 je alkyl o počtu uhlíků 3 až 7.

35

Způsob přípravy derivátu podle vynálezu může být charakterizován schématem 1:

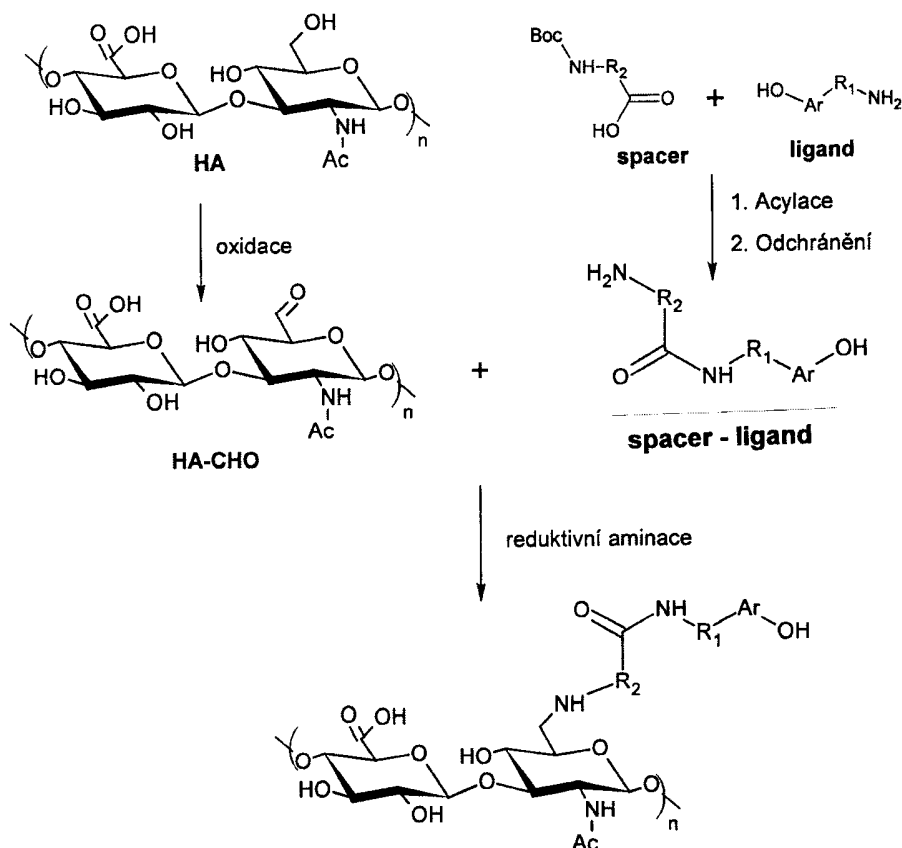


Schéma 1.: Příklad možného způsobu přípravy derivátu HA–spacer–ligand dle vynálezu

- 5 Dále se vynález týká hydrogelu vzniklého zesíťením derivátu podle obecného vzorce (I) a způsob jeho přípravy. Tento způsob přípravy hydrogelu spočívá v tom že se na derivát podle obecného vzorce (I) působí generátorem reaktivních fenoxylradikálů, s výhodou systémem křenová peroxidáza a zdroj hydroxylových radikálů, kterým může být roztok peroxidu vodíku ve vodě, nebo
- 10 systémem oxidáza–kyslík–substrát, např. galaktózooxidáza–galaktóza nebo glukózooxidáza–glukóza, při pH v rozmezí 4 až 10.

K oligomerizaci reaktivních ligandů je tedy využíváno činidel, které jsou schopná vyvolat vznik fenoxylradikálů z aromatických jader ligandů. Dle tohoto vynálezu je s výhodou využíváno systému peroxid/křenová peroxidáza. Peroxid může být do systému přidáván ve formě ředěného

15 roztoku, nebo je generován chemickou reakcí *in situ*. Peroxid vodíku je možné ve směsi generovat pomocí různých druhů enzymů (oxidáz) z kyslíku, jako akceptoru elektronů a příslušného donoru elektronů v oxidačně – redukční reakci. S výhodou lze použít kombinaci galaktóza oxidáza nebo glukóza oxidáza a jejich substráty: galaktóza a glukóza. Jinými činidly, která jsou schopná vyvolat vznik fenoxylradikálů v přítomnosti molekulárního kyslíku, jsou enzymy tyrozináza,

20 laktáza atd.

Vlastnosti těchto hydrogelů jsou, jak je obecně známo, ovlivňovány jak chemickou strukturou polymeru a jeho koncentrací, tak zvanými typy síťovacích činidel a jejich použitých množství. Fyzikálně–chemické vlastností polymeru (derivátu HA) jsou především ovlivňovány strukturou

25 monomeru, konformací segmentů polymerního řetězce, stupněm zesíťení a molární hmotností. Tímto jsou také ovlivněny mechanické vlastnosti polymeru. Při mechanickém namáhání polymeru dochází k jeho deformaci, kdy se část absorbované deformační energie disipuje – spotřebuje na změnu konformací uzlů sítě a segmentů polymerního řetězce a část energie se nevratně přemění na teplo. Velikost disipované energie a tím i možnost zaujetí různých konformačních uspořádání v rámci struktury polymeru souvisí s tuhostí makromolekulárních řetězců a odráží míru

30

elektrického odporu materiálu proti deformaci. Polymerní materiály složené z tuhých neohebných řetězců a jejich segmentů pak mohou vykazovat malou míru elastického odporu proti deformaci a křehkost.

- 5 Navýšení elasticity těchto polymerů se provede způsobem podle vynálezu, kde se zavedou flexibilní segmenty do struktury polymeru. Ty se vyznačují vyšší volností pohybu jednotlivých molekul kolem svých vazeb, a tím dosahují navýšení možností jejich konformačních uspořádání při působení deformační energie a možnosti její disipace. Zavedení vhodného flexibilního spaceru mezi ligand a základní řetězec hyaluronanu tak vede k dosažení vyšší elasticity, houževnatosti a pevnosti výsledného materiálu, což je velice přínosné např. u hydrogelů cílených pro scaffoldy v rámci léčby defektů některých tkání vystavených vyšším zátěžím, jako je např. kloubní chrupavka nebo kosti. Jak bylo popsáno výše, zavedení flexibilního spaceru mezi ligand a základní řetězec hyaluronanu může být s výhodou také použito v případě, kdy jsou mechanické vlastnosti hydrogelů závislé na koncentraci enzymu použitého jako katalyzátoru síťovací reakce. Zavedením flexibilního spaceru mezi ligand a základní řetězec hyaluronanu je u reaktivních skupin derivátu polymeru zajištěna, a to i po částečném zesílení polymeru, dostatečná sterická přístupnost reaktivních skupin pro vzájemnou dimerizaci.

- 20 Toto řešení má za následek zefektivnění síťovací reakce, což se projevuje dosažením vyšší homogenity připravených hydrogelů a vede tak k překonání technologických problémů spojených se zasíťčením hyaluronanu modifikovaného hydroxyfenylem či heteroarylfenolem (tyraminem, serotoninem aj.) v případě, že síťovacími činidly jsou křenová peroxidáza a peroxid vodíku (či jiný typ generátoru fenoxylradikálů).

- 25 Překvapivě jsme ale navíc zjistili, že zavedení námi zvolených spacerů mezi ligand a základní řetězec hyaluronanu vede i při velice nízkém stupni substituce k výraznému navýšení hodnot elasticity, houževnatosti a pevnosti výsledného hydrogelu na bázi tohoto derivátu HA.

- 30 Dále se vynález týká využití hydrogelů na bázi derivátů podle vynálezu, a to především v oblasti tkáňového inženýrství, kosmetice, medicíně a regenerativní medicíně. Využití hydrogelů popisovaných v tomto vynálezu je cíleno zejména na základní materiál pro tvorbu scaffoldů ve tkáňovém inženýrství, především do oblasti léčby kloubních a kostních defektů, jako krytí pro hojení ran, jako biodegradabilní bariéra bránící vzniku pooperačních srůstů, k augmentaci měkkých tkání a výplně tkáňových defektů apod. Při použití hydrogelu jakožto materiálu pro scaffoldy se může jednat o scaffoldy oseté nebo neoseté. U osetých scaffoldů se typ buněk, které se zabudují do scaffoldu, volí dle cíleného místa aplikace.

40 Přehled obrázků na výkresech

Obr. 1 Znázorňuje deformaci vlastnosti („stress–strain“ křivky) získané v rámci měření deformace hydrogelů na bázi derivátů připravených dle příkladu VII, IX, XI a XII v kompresi.

45 Příklady provedení vynálezu

1. Příklad syntézy derivátů

- 50 Syntéza derivátů hyaluronanu probíhala v několika krocích (viz schéma 1). Prvním z nich je příprava aldehydického derivátu hyaluronanu (příklad 1.7). Dalším krokem je syntéza různých meziproduktů spacer–ligand (příklady 1.1 až 1.6), které byly následně navázány na hyaluronan procesem reduktivní aminace (příklady 1.9 až 1.14).

Součástí příkladů je i syntéza derivátů hyaluronanu, ve kterých je ligand (tyramin, hydroxytryptofan) vázán přímo na polysacharid bez využití spaceru (příklady VIII). Tento derivát a z něj připraveného hydrogelu sloužily k porovnání vlastností s deriváty popisovanými v tomto vynálezu (deriváty HA-spacer-ligand- deriváty IX až XIV).

5

Příklad 1.1: Syntéza 6-amino-*N*-[2-(4-hydroxyfenyl)ethyl]hexanamidu (meziprodukt spacer-ligand (I))

- 10 6-[(*tert*-butoxykarbonyl)amino]hexanová kyselina (1,00 g, 4,3 mmol) byla rozpuštěna v 50 ml tetrahydrofuranu (THF). K roztoku kyseliny byl přidán 1,1'-karbodiimidazol (0,70 g, 4,3 mmol). Směs byla zahřívána na 50 °C po dobu šedesáti minut. Poté byla reakční nádoba promyta inertním plynem. K reakční směsi byl přidán tyramin (0,59 g, 4,3 mmol). Směs byla dále zahřívána další 2 hodiny. Poté byl destilací za sníženého tlaku odstraněn THF. Odparek byl rozpuštěn v 50 ml ethylacetátu. Roztok byl promyt 150 ml čištěné vody (rozděleno do tří dílů). Organická vrstva byla vysušena nad molekulovým sítem. Ethylacetát byl odstraněn destilací za sníženého tlaku. Odparek byl rozpuštěn v 50 ml MeOH a k roztoku byly přidány 2 ml trifluoroctové kyseliny (TFA). Roztok byl zahříván 6 hodin pod zpětným chladičem. Rozpouštědlo bylo odstraněno destilací za sníženého tlaku. Odparek byl rozpouštěn v 50 ml ethylacetátu. Roztok byl promyt 150 ml čištěné vody (rozděleno do tří dílů). Organická vrstva byla vysušena nad molekulovým sítem. Ethylacetát byl odstraněn destilací za sníženého tlaku.

$m = 0,75 \text{ g (70 \% teorie)}$.

- 25 $^1\text{H NMR (D}_2\text{O, pm)}$ δ : 1,17 (m, 2H, $\gamma\text{-CH}_2\text{-hexanové kyseliny}$); 1,48 (m, 2 H, $\beta\text{-CH}_2\text{-hexanové kyseliny}$); 1,58 (m, 2 H, $\delta\text{-CH}_2\text{-hexanové kyseliny}$); 2,17 (t, 2 H, $\text{-CH}_2\text{-CO-}$); 2,73 (m, 2 H, $\text{-CH}_2\text{-Ph}$); ,91 (m, 2 H, $\text{-CH}_2\text{-NH}_2$); 3,42 (m, 2 H, $\text{-CH}_2\text{-NH-CO-}$); 6,83 (d, 2 H, arom.); 7,13 (d, 2 H, arom.).
- 30 $^{13}\text{C NMR (D}_2\text{O, ppm)}$ δ : 24 ($\gamma\text{-C-hexanové kyseliny}$); 26 ($\delta\text{-C-hexanové kyseliny}$); 33 ($\beta\text{-C-hexanové kyseliny}$); 35 (-C-CO-); 39 (C-NH_2); 40 (C-Ph); 63 (-C-NH-CO-); 115 (C3 arom.); 126 (C1 AROM); 130 (C2 arom.); 153 (C4 arom.); 176 (-CO-).

- 35 Příklad 1.2: Syntéza 4-amino-*N*-[2-(4-hydroxyfenyl)ethyl]butanamidu (meziprodukt spacer-ligand (II))

- 40 4-[(*tert*-butoxykarbonyl)amino]butonová kyselina (0,50 g, 2,5 mmol) byla rozpuštěna v 25 ml tetrahydrofuranu (THF). K roztoku kyseliny byl přidán 1,1'-karbodiimidazol (0,40 g, 2,5 mmol). Směs byla zahřívána na 50 °C po dobu šedesáti minut. Poté byla reakční nádoba promyta inertním plynem. K reakční směsi byl přidán tyramin (0,34 g, 2,5 mmol). Směs byla dále zahřívána další 2 hodiny. Poté byl destilací za sníženého tlaku odstraněn THF. Odparek byl rozpuštěn v 50 ml ethylacetátu. Roztok byl promyt 150 ml čištěné vody (rozděleno do tří dílů). Organická vrstva byla vysušena nad molekulovým sítem. Ethylacetát byl odstraněn destilací za sníženého tlaku. Odparek byl rozpuštěn v 50 ml MeOH a k roztoku byly přidány 2 ml trifluoroctové kyseliny (TFA). Roztok byl zahříván 6 hodin pod zpětným chladičem. Rozpouštědlo bylo odstraněno destilací za sníženého tlaku. Odparek byl rozpouštěn v 50 ml ethylacetátu. Roztok byl promyt 150 ml čištěné vody (rozděleno do tří dílů). Organická vrstva byla vysušena nad molekulovým sítem. Ethylacetát byl odstraněn destilací za sníženého tlaku.

50

$m = 0,44 \text{ g (80 \% teorie)}$

^1H NMR (D_2O , ppm) δ : 1,75 (m, 2 H, $\beta\text{-CH}_2\text{-butanové kyseliny}$); 2,16 (t, 2 H, $-\text{CH}_2\text{-CO-}$); 2,59 (m, 2H, $-\text{CH}_2\text{-In}$); 2,78 (m, 2 H, $-\text{CH}_2\text{-NH}_2$); 3,20 (m, 2 H, $-\text{CH}_2\text{-NH-CO-}$); 6,69 (d, 2 H, arom.); 6,99 (d, 2 H, arom.).

5 ^{13}C NMR (D_2O , ppm) δ : 23 ($\beta\text{-C-butanové kyseliny}$); 25 (t, 2 H, $-\text{C-CO-}$); 32 ($-\text{C-NH}_2$); 45 ($\text{CH}_2\text{-Ar}$); 60 ($-\text{C-NH-CO-}$); 115 (C3 arom.); 117 (C1 arom.); 129 (C2 arom.); 155 (C4 arom.); 171 ($-\text{CO-}$).

10 **Příklad 1.3: Syntéza 8-amino-*N*-[2-(4-hydroxyfenyl)ethyl]oktanamidu (meziprodukt spacer-ligand (III))**

8-[(*tert*-butoxykarbonyl)amino]oktanová kyselina (0,50 g, 1,9 mmol) byla rozpouštěna v 25 ml tetrahydrofuranu (THF). K roztoku kyseliny byl přidán 1,1'-karbodiimidazol (0,31 g, 1,9 mmol).
15 Směs byla zahřívána na 50 °C po dobu šedesáti minut. Poté byla reakční nádoba promyta inertním plynem. K reakční směsi byl přidán tyramin (0,26 g, 1,9 mmol). Směs byla dále zahřívána dalších 6 hodin. Poté byl destilací za sníženého tlaku odstraněn THF. Odparek byl rozpuštěn v 50 ml ethylacetátu. Roztok byl promyt 150 ml čištěné vody (rozděleno do tří dílů). Organická vrstva byla vysušena nad molekulovým sítem. Ethylacetát byl odstraněn destilací za sníženého tlaku.
20 Odparek byl rozpuštěn v 50 ml MeOH a k roztoku byly přidány 2 ml trifluoroctové kyseliny (TFA). Roztok byl zahříván 6 hodin pod zpětným chladičem. Rozpouštědlo bylo odstraněno destilací za sníženého tlaku. Odparek byl rozpuštěn v 50 ml ethylacetátu. Roztok byl promyt 150 ml čištěné vody (rozděleno do tří dílů). Organická vrstva byla vysušena nad molekulovým sítem. Ethylacetát byl odstraněn destilací za sníženého tlaku.

25 $m = 0,40$ g (75 % teorie)

^1H NMR (CDCl_3 , ppm) δ : 1,16–1,34 (m, 6 H, C4 až C6 $-\text{CH}_2\text{-oktanové kyseliny}$); 1,56–1,44 (m, 4 H, 3C a C7 oktanové kyseliny); 2,58 (m, 2 H, $-\text{CH}_2\text{-Ar}$); 2,78 (m, 2 H, $-\text{CH}_2\text{-NH}_2$); 3,19 (m,
30 2 H, $-\text{CH}_2\text{-NH-CO-}$); 6,68 (d, 2 H, arom.); 6,98 (d, 2 H, arom.).

^{13}C NMR (CDCl_3 , ppm) δ : 21 (C7 oktanové kyseliny); 24 (C4 oktanové kyseliny); 26 (C6-oktanové kyseliny); 28 (C5-oktanové kyseliny); 33 (C3-oktanové kyseliny); 35 ($-\text{C-CO-}$); 39 ($-\text{C-NH}_2$); 40 (C-Ph); 63 ($-\text{C-NH-CO-}$); 115 (C3 arom.); 126 (C1 arom.); 130 (C2 arom.); 153 (C4 arom.); 176 ($-\text{CO-}$).
35

Příklad 1.4: Syntéza 4-amino-*N*-[2-(5-hydroxy-1H-indol-3-yl)ethyl]butanamidu (meziprodukt spacer-ligand (IV))

40 4-[(*tert*-butoxykarbonyl)amino]butanová kyselina (0,50 g, 2,5 mmol) byla rozpouštěna ve 25 ml *N,N*-dimethylformamidu (DMF). K roztoku kyseliny byl přidán 1,1'-karbodiimidazol (0,40 g, 2,5 mmol). Směs byla zahřívána na 50 °C po dobu šedesáti minut. Poté byla reakční nádoba promyta inertním plynem. K reakční směsi byl přidán roztok 5-hydroxytryptamin hydrochloridu
45 (0,52 g, 2,5 mmol) a triethylaminu (0,68 ml; 4,9 mmol) ve 25 ml DMF. Směs byla dále zahřívána další 2 hodiny. Směs zředěna přídavkem ethylacetátu (100 ml). Vzniklý roztok byl promyt 300 ml čištěné vody (rozděleno do tří dílů). Organická vrstva byla vysušena nad molekulovým sítem. Ethylacetát byl odstraněn destilací za sníženého tlaku. Odparek byl rozpuštěn v 50 ml MeOH a k roztoku byly přidány 2 ml trifluoroctové kyseliny (TFA). Roztok byl zahříván 6 hodin pod zpětným chladičem. Rozpouštědlo bylo odstraněno destilací za sníženého tlaku. Odparek byl rozpouštěn v 50 ml ethylacetátu. Roztok byl promyt 150 ml čištěné vody (rozděleno do tří dílů). Organická vrstva byla vysušena nad molekulovým sítem. Ethylacetát byl odstraněn destilací za sníženého tlaku.
50

m = 0,43 g (65 % teorie)

¹H NMR: (DMSO, ppm) δ: 1,77 (m, 2 H, β-CH₂-butanové kyseliny); 2,20 (t, 2 H, -CH₂-CO-); 2,73 (m, 2 H, -CH₂-In); 2,81 (m, 2 H, -CH₂-NH₂); 3,30 (m, 2 H, -CH₂-NH-CO-); 6,60 (d, 1 H, C6-arom); 6,82 (s, 1 H, C4-arom); 7,03 (s, 1 H, C2-arom); 7,13 (d, 1 H, C7-arom).

¹³C NMR (DMSO, ppm) δ: 23 (β-C-butanové kyseliny); 25 (t, 2 H, -C-CO-); 32 (-C-NH₂); 39 (CH₂-In); 60 (-C-NH-CO-); 102 (C4 arom.); 110 (C6 arom.); 111 (C7 arom.); 111 (C3 arom.); 123 (C2 arom.); 127 (C7- C-NH-arom); 113 (C4-C-C3- arom.); 150 (C5 arom.); 171 (-CO-).

Příklad 1.5: Syntéza 6-amino-N-[2-(5-hydroxy-1H-indol-3-yl)ethyl]hexanamidu (meziprodukt spacer-ligand (V))

6-[(*tert*-butoxykarbonyl)amino]hexanová kyselina (1,00 g, 4,3 mmol) byla rozpuštěna v 50 ml *N,N*-dimethylformamidu (DMF). K roztoku kyseliny byl přidán 1,1'-karbodiimidazol (0,70 g, 4,3 mmol). Směs byla zahřívána na 50 °C po dobu šedesáti minut. Poté byla reakční nádoba promyta inertním plynem. K reakční směsi byl přidán roztok 5-hydroxytryptamin hydrochloridu (0,91 g, 4,3 mmol) a triethylaminu (0,68 ml, 4,9 mmol) ve 25 ml DMF. Směs byla dále zahřívána dalších 6 hodin. Směs byla zředěna přidávkem ethylacetátu (100 ml). Vzniklý roztok byl promyt 300 ml čištěné vody (rozděleno do tří dílů). Organická vrstva byla vysušena nad molekulovým sítem. Ethylacetát byl odstraněn destilací za sníženého tlaku. Odparek byl rozpouštěn v 50 ml MeOH a k roztoku byly přidány 2 ml trifluoroctové kyseliny. (TFA). Roztok byl zahříván 6 hodin pod zpětným chladičem. Rozpouštědlo bylo odstraněno destilací za sníženého tlaku. Odparek byl rozpouštěn v 50 ml ethylacetátu. Roztok byl promyt 150 ml čištěné vody (rozděleno do tří dílů). Organická vrstva byla vysušena nad molekulovým sítem. Ethylacetát byl odstraněn destilací za sníženého tlaku.

m = 0,75 g (60 % teorie)

¹H NMR: (DMSO, ppm) δ 1,17 (m, 2 H, γ-CH₂-hexanové kyseliny); 1,48 (m, 2 H, β-CH₂-hexanové kyseliny); 1,58 (m, 2 H, δ-CH₂-hexanové kyseliny); 2,17 (t, 2 H, -CH₂-CO-); 2,73 (m, 2 H, -CH₂-In); 2,91 (m, 2 H, -CH₂-NH₂); 3,42 (m, 2 H, -CH₂-NH-CO-); 6,60 (d, 1 H, C6-arom); 6,82 (s, 1 H, C4-arom); 7,03 (s, 1 H, C2-arom); 7,13 (d, 1 H, C7-arom).

¹³C NMR (DMSO, ppm) δ: 24 (γ-C-hexanové kyseliny); 26 (δ-C-hexanové kyseliny); 33 (β-C-hexanové kyseliny); 35 (-C-CO-); 39 (-C-NH₂); 40 (C-In); 63 (-C-NH-CO-); 102 (C4 arom.); 110 (C6 arom.); 111 (C7 arom.); 111 (C3 arom.); AS3 (C2 arom.); 127 (C7- C-NH-arom); 131 (C4-C-C3-arom); 150 (C5 arom.); 171 (-CO-).

Příklad 1.6: Příprava 2-[(6-aminohexanoyl)amino]-3-(5-hydroxy-1H-indol-3-yl)-propanové kyseliny (meziprodukt spacer-ligand VI)

6-[(*tert*-butoxykarbonyl)amino]hexanová kyselina (0,50 g, 2,2 mmol) byla rozpuštěna v 50 ml tetrahydrofuranu (THF). K roztoku kyseliny byl přidán 1,1'-karbodiimidazol (0,35 g, 2,2 mmol). Směs byla zahřívána na 50 °C po dobu šedesáti minut. Poté byla reakční nádoba promyta inertním plynem. K reakční směsi byl přidán 5-hydroxytryptofan (0,48 g, 2,2 mmol). Směs byla dále zahřívána dalších 6 hodin. Směs byla zředěna přidávkem ethylacetátu (100 ml). Vzniklý roztok byl promyt 300 ml čištěné vody (rozděleno do tří dílů). Organická vrstva byla vysušena nad molekulovým sítem. Ethylacetát byl odstraněn destilací za sníženého tlaku.

Odparek byl rozpuštěn v 50 ml MeOH a k roztoku byly přidány 2 ml trifluoroctové kyseliny (TFA). Roztok byl zahříván 6 hodin pod zpětným chladičem. Rozpouštědlo bylo odstraněno destilací za sníženého tlaku. Odparek byl rozpuštěn v 50 ml ethylacetátu. Roztok byl promyt 150 ml čisté vody (rozděleno do tří dílů). Organická vrstva byla vysušena nad molekulovým sítem. Ethylacetát byl odstraněn destilací za sníženého tlaku.

$m = 0,62 \text{ g}$ (85 % teorie)

^1H NMR (DMSO, ppm) δ : 1,17 (m, 2 H, $\gamma\text{-CH}_2\text{-hexanové kyseliny}$); 1,48 (m, 2H, $\beta\text{-CH}_2\text{-hexanové kyseliny}$); 1,58 (m, 2 H, $\delta\text{-CH}_2\text{-hexanové kyseliny}$); 2,19 (t, 2 H, $-\text{CH}_2\text{-CO-}$); 2,51 (m, 2 H, $-\text{CH}_2\text{-In}$); 2,90 (m, 2 H, $-\text{CH}_2\text{-NH}_2$); 3,81 (m, 2 H, $-\text{CH}_2\text{-NH-CO-}$); (m, 2 H, $-\text{CH}_2\text{-NH-CO-}$); 6,61 (d, 1 H, C6-arom); 6,95 (s, 1 H, C4-arom); 7,02 (s, 1 H, C2-arom); 7,13 (d, 1 H, C7-arom).

^{13}C NMR (DMSO, ppm) δ : 24 ($\gamma\text{-C-hexanové kyseliny}$); 26($\delta\text{-C-hexanové kyseliny}$); 33 ($\beta\text{-C-hexanové kyseliny}$); 35 ($-\text{C-CO-}$); 39 ($-\text{C-NH}_2$); 40 (C-Ph); 55 ($-\text{C-NH-CO-}$); 102 (C4 arom.); 110 (C6 arom.); 111 (C7 arom.); 111 (C3 arom.); 123 (C2 arom.); 127 (C7 - C-NH-arom.); 131 (C4-C-C3-arom.); 150 (C5 arom.); 171 ($-\text{CO-}$).

Příklad 1.7: Příprava aldehydického derivátu (HA-CHO) – obecný postup (VII)

Hylauronan (10,00 g, $M_w = 2 \text{ MDa}$) byl rozpuštěn v 750 ml 2,5% (w/w) roztoku $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{ H}_2\text{O}$. Roztok byl vychlazen na 5 °C. K vzniklému roztoku bylo přidáno 2,60 g NaBr a 0,05 g 4-acetamido-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxylu. Po důkladné homogenizaci roztoku byly k reakční směsi přidány 3 ml roztoku NaClO (10–15 % dostupného Cl_2). Reakce pokračovala za stálého míchání 15 minut. Reakce byla ukončena přidavkem 100 ml 40% roztoku propan-2-olu. Produkt byl přečištěn ultrafiltrací a izolován precipitací propan-2-olem.

IČ (KBr) : 3417, 2886, 2152, 1659, 1620, 1550, 1412, 1378, 1323, 1236, 1204, 1154, 1078, 1038, 945, 893 cm^{-1}

^1H NMR (D_2O) δ : 2,01 (s, 3 H, $\text{CH}_3\text{-}$); 3,37 – 3,92 (m, skelet hyaluronanu), 4,46 (s, 1H, anomer.), 4,54 (s, 1H anomer., $-\text{O-CH(OH)-}$), 5,27 (geminální glykol- CH(OH)_2).

Příklad 1.8: Syntéza tyraminového derivátu (VIII)

Aldehydický derivát HA (VII) (5,00 g) byl rozpuštěn v 500 ml demineralizované vody. Pomocí kyseliny octové bylo pH roztoku upraveno na 3. Následně byl k reakční směsi přidán tyramin (1,70 g) ve formě roztoku ve 100 ml 40% propan-2-olu. Směs byla dále míchána po dobu 1 hodiny při laboratorní teplotě. Dále byl ke směsi přidán roztok pikolin-boran komplexu (0,50 g) v 50 ml 40% propan-2-olu. Reakční směs byla dále míchána 12 hodin při laboratorní teplotě. Nízkomolekulární balastní látky byly z produktu odstraněny ultrafiltrací. Produkt byl získán precipitací propan-2-olem. Precipitát byl zbaven vlhkosti a zbytkového propan-2-olu sušením v horkovzdušné sušárně (40 °C, 3 dny).

IČ (KBr) : 3400, 2893, 2148, 1660, 1620, 1549, 1412, 1378, 1323, 1236, 1204, 1154, 1078, 1038, 945, 893 cm^{-1} .

^1H NMR (D_2O) δ : 2,01 (s, 3 H, $\text{CH}_3\text{-}$), 2,66–2,77 (m, 4 H, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-}$), 3,00 (s, 1H, H-CH-NH-), 3,37–3,93 (m, skelet hyaluronanu), 4,46 (s, 1H, anomer.), 4,54 (s, 1H anomer., $-\text{O-CH(OH)-}$), 6,59 (d, 2H, arom.), 7,04 (d, 2H, arom.).

Příklad 1.9: Příprava tyraminovaného derivátu HA s C₆ spacerem (IX)

Aldehydický derivát HA (VII) (5,00 g) byl rozpuštěn v 500 ml demineralizované vody. Pomocí kyseliny octové bylo pH roztoku upraveno na 3. K roztoku HA-CHO byl přidán
 5 6-amino-*N*-[2-(4-hydroxyfenyl)ethyl]hexanamid (meziprodukt (I)) (0,625 g, 2,5 mmol). Směs byla míchána 2 hodiny při laboratorní teplotě. Poté byl do reakční směsi přidán komplex pikolin-boran (0,270 g, 2,5 mmol). Směs byla míchána dalších 12 hodin při laboratorní teplotě. Produkt byl přečištěn ultrafiltrací a izolován z retentátu precipitací propan-2-olem. Precipitát byl zbaven vlhkosti a zbytkového propan-2-olu sušením v horkovzdušné sušárně (40 °C, 3 dny).

IČ (KBr): 3425, 2893, 2148, 1660, 1620, 1549, 1412, 1378, 1323, 1236, 1204, 1154, 1078, 1038, 945, 893 cm⁻¹.

¹H NMR (D₂O) δ 1,25 (t, 2 H, γ-CH₂-aminohexanové kyseliny), 1,48 (m, 2 H, δ-CH₂-aminohexanové kyseliny), 1,51 (m, 2 H, β-CH₂-aminohexanové kyseliny), 2,01 (s, 3 H CH₃-), 2,65 (m, 2H, Ph-CH₂-), 2,73 (m, 2H, ε-CH₂-aminohexanové kyseliny), 3,37-3,93 (m, skelet hyaluronanu), 4,46 (s, 1H, anomer.), 4,54 (s, 1H anomer., -O-CH(OH)-), 6,59 (d, 2H, arom.), 7,01 (d, 2H, arom.).

Příklad 1.10: Příprava derivátu HA s C₄ spacerem a 5-hydroxytryptaminem (X)

Aldehydický derivát HA (VII) (3,00 g) a Na₂HPO₄ · 12 H₂O (7,50 g) byl rozpouštěn v 300 ml demineralizované vody. K roztoku Ha-CHO byl přidán 4-amino-*N*-[2-(5-hydroxy-1*H*-indol-3-yl)ethyl]butanamid (0,40 g, 1,5 mmol) – (meziprodukt (IV)). Směs byla míchána 2 hodiny při laboratorní teplotě. Poté byl do reakční směsi přidán komplex pikolin-boran (0,16 g, 1,5 mmol). Směs byla míchána dalších 12 hodin při laboratorní teplotě. Produkt byl přečištěn ultrafiltrací a izolován z retentátu precipitací propan-2-olem. Precipitát byl zbaven vlhkosti a zbytkového propan-2-olu sušením v horkovzdušné sušárně (40 °C, 3 dny).

IČ (KBr): 3400, 2893, 2148, 1660, 1620, 1549, 1412, 1323, 1236, 1204, 1154, 1078, 1038, 945, 893 cm⁻¹.

¹H NMR (D₂O) δ: 1,73 (m, 2H, β-CH₂-aminobutanové kyseliny), 2,01 (s, 3 H, CH₃), 2,60 (m, 2H, γ-CH₂-aminobutanové kyseliny), 2,93 (m, 2H, Ind-CH₂-), 3,37-3,93 (m, skelet hyaluronanu), 4,46 (s, 1H, anomer.), 4,54 (s, 1H anomer., -O-CH(OH)-), 6,85 (d, 1H, arom.), 7,09 (s, 1H, arom.), 7,21 (s, 1H, arom.), 7,40 (s, 1H, arom.).

Příklad 1.11: Příprava tyraminového derivátu HA s C₄ spacerem (XI)

Aldehydický derivát HA (VII) (3,50 g) byl rozpuštěn v 350 ml demineralizované vody. Pomocí kyseliny octové bylo pH roztoku upraveno na 3. K roztoku HA-CHO byl přidán 4-amino-*N*-[2-(4-hydroxyfenyl)ethyl]butanamid (0,40 g, 1,8 mmol) – (meziprodukt (II)). Směs byla míchána 2 hodiny při laboratorní teplotě. Poté byl do reakční směsi přidán komplex pikolin-boran (0,19 g, 1,8 mmol). Směs byla míchána dalších 12 hodin při laboratorní teplotě. Produkt byl přečištěn ultrafiltrací a izolován z retentátu precipitací propan-2-olem. Precipitát byl zbaven vlhkosti a zbytkového propan-2-olu sušením v horkovzdušné sušárně (40 °C, 3 dny).

IČ (KBr): 3425, 2893, 2148, 1600, 1620, 1549, 1412, 1378, 1323, 1236, 1204, 1154, 1078, 1038, 945, 893 cm⁻¹.

¹H NMR (D₂O) δ: 1,25 (t, 2 H, γ-CH₂-aminohexanové kyseliny), 1,48, (m, 2H, δ-CH₂-aminohexanové kyseliny), 1,51 (m, 2 H, β-CH₂-aminohexanové kyseliny), 2,01 (s, 3H, CH₃-), 2,65 (m, 2H, pH-CH₂-), 2,73 (m, 2H, ε-CH₂-aminohexanové kyseliny), 3,37 –3,93 (m, skelet hyaluronanu), 4,46 (s, 1H, anomer.), 4,54 (s, 1H anomer., –O-CH(OH)-), 6,59 (d, 2H, arom.), 7,01 (d, 2H. arom.).

Příklad 1.12: Příprava tyraminovaného derivátu HA s C₈ spacerem (XII)

Aldehydický derivát HA (VII) (2,90 g) byl rozpuštěn ve 300 ml demineralizované vody. Pomocí kyseliny octové bylo pH roztoku upraveno na 3. K roztoku HA-CHO byl přidán 8-amino-*N*-[2-(4-hydroxyfenyl)ethyl]oktanamid (0,40 g, 1,4 mmol) – (meziprodukt (III)). Směs byla míchána 2 hodiny při laboratorní teplotě. Poté byl do reakční směsi přidán komplex pikolin-boran (0,15 g, 1,4 mmol). Směs byla míchána dalších 12 hodin při laboratorní teplotě. Produkt byl přečištěn ultrafiltrací a izolován z retentátu precipitací propan-2-olem. Precipitát byl zbaven vlhkosti a zbytkového propan-2-olu sušením v horkovzdušné sušárně (40 °C, 3 dny).

IČ (KBr).. 3425, 2893, 2148, 1660, 1626, 1549, 1412, 1378, 1323, 1236, 1204, 1154, 1078, 1038, 945, 893 cm⁻¹.

¹H NMR (D₂O) δ: 1,16–1,34 (m, 6 H, C4 až C6 –CH₂-oktanové kyseliny); 1,56–1,44 (m, 4H, C3 a C7 oktanové kyseliny); 2,01 (s, 3H, CH₃-), 2,58 (m, 2H, –CH₂-Ar); 2,78 (m, 2H –CH₂-NH-), 3,37 –3,93 (m, skelet hyaluronanu), 4,46 (s, 1H, anomer.), 4,54 (s, 1H, anomer., –O-CH(OH)-), 6,59 (d, 2H, arom.), 7,01 (d, 2H. arom.).

Příklad 1.13: Příprava derivátu HA s C₆ spacerem a 5-hydroxytryptaminem (XIII)

Aldehydický derivát HA (VII) (5,00 g) a Na₂HPO₄ · 12 H₂O (12,5 g) byl rozpuštěn v 500 ml demineralizované vody. K roztoku NA-CHO byl přidán 6-amino-*N*-[2-(5-hydroxy-1*H*-indol-3-yl)ethyl]hexanamid (0,73 g, 2,5 mmol) – (meziprodukt (V)). Směs byla míchána 2 hodiny při laboratorní teplotě. Poté byl do reakční směsi přidán komplex pikolin-boran (0,27 g, 2,5 mmol). Směs byla míchána dalších 12 hodin při laboratorní teplotě. Produkt byl přečištěn ultrafiltrací a izolován z retentátu precipitací propan-2-olem. Precipitát byl zbaven vlhkosti a zbytkového propan-2-olu sušením v horkovzdušné sušárně (40 °C, 3 dny).

IČ (KBr):: 3400, 2893, 2148, 1660, 1620, 1549, 1412, 1378, 1323, 1236, 1204, 1154, 1078, 1038, 945, 893 cm⁻¹.

¹H NMR (D₂O) δ: 1,25 (t, 2 H, γ-CH₂-aminohexanové kyseliny), 1,48 (m, 2 H, δ –CH₂-aminohexanové kyseliny) 1,51 (m, 2 H, β-CH₂-aminohexanové kyseliny), 2,01 (s, 3 H, CH₃-), 2,65 (m, 2H, Ph-CH₂-), 2,73 (m, 2H, ε-CH₂- aminohexanové kyseliny), 3,37–3,92 (m, skelet hyaluronanu), 4,46 (s, 1H, anomer.), 4,54 (s, 1H anomer., –O-CH(OH)-), 6,85 (d, 1H, arom.), 7,09 (s, 1H, arom.), 7,21 (s, 1H, arom.), 7,40 (s, 1H, arom.).

Příklad 1.14: Příprava derivátu HA s C₆ spacerem a 5-hydroxytryptofanem (XIV)

Aldehydický derivát HA (VII) (3,50 g) a Na₂HPO₄ · 12 H₂O (8,75 g) byl rozpouštěn v 350 ml demineralizované vody. K roztoku HA-CHO byl přidán 2-[(6-aminohexanoyl)amino]-3-(5-hydroxy-1*H*-indol-3-yl)propanové kyseliny (0,60 g, 1,8 mmol) – (meziprodukt (VI)). Směs byla míchána 2 hodiny při laboratorní teplotě. Poté byl po reakční směsi přidán komplex pikolin-boran (0,19 g, 1,8 mmol). Směs byla míchána dalších 12 hodin při laboratorní teplotě. Produkt

byl přečištěn ultrafiltrací a izolován z retentátu precipitací propan–2–olem. Precipitát byl zbaven vlhkosti a zbytkového propan–2–olu sušením v horkovzdušné sušárně (40 C, 3 dny).

IČ (KBr):: 3400, 2893, 2148, 1660, 1620, 1549, 1412, 1378, 1323, 1236, 1204, 1154, 1078, 1038, 945, 893 cm^{-1} .

^1H NMR (D_2O) δ : 1,25 (t, 2H, $\gamma\text{-CH}_2\text{-amino}$ hexanové kyseliny), 1,48 (m, 2H, $\delta\text{-CH}_2\text{-amino}$ hexanové kyseliny) 1,51 (m, 2 H, $\beta\text{-CH}_2\text{-amino}$ hexanové kyseliny), 2,01 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-}$), 2,65 (m, 2H, $\text{Ph-CH}_2\text{-}$), 2,73 (m, 2H, $\varepsilon\text{-CH}_2\text{-amino}$ hexanové kyseliny), 3,37–3,93 (m, skelet hyaluronanu), 4,46 (s, 1H, anomer.), 4,54 (s, 1H, anomer., -O-CH(OH)-), 6,85 (d, 1H, arom.), 7,09 (s, 1H, arom.), 7,21 (s, 1H, arom.), 7,40 (s, 1H, arom.)

Příklad 1.15: Obecný postup přípravy hydrogelu na bázi derivátu HA se spacerem a 5–hydroxytryptofanem a na bázi tyraminovaného derivátu

Vybraný derivát HA je rozpuštěn v 0,1M PBS pH 7,4. Množství derivátu je voleno dle požadované koncentrace. K roztoku derivátu je přidáno požadované množství enzymu. Po důkladné homogenizaci je přidán zředěný roztok peroxidu vodíku. Směs je opět homogenizována a dochází ke vzniku transparentního gelu.

Příklad 1.16: Příprava hydrogelu na bázi tyraminového derivátu

40 až 60 mg (dle požadované koncentrace roztoku polymeru) derivátu HA připraveného dle příkladu 1.8 (VIII) je rozpouštěno ve 2 ml 0,1M PBS o Ph 7,4. K roztoku derivátu je přidáno 20 μl roztoku enzymu HRP (24 mg enzymu HRP rozpuštěné v 1 ml 0,1M PBS o PH 7,4). Po důkladné homogenizaci je přidáno 100 μl roztok H_2O_2 (33 μl 30% H_2O_2 rozpuštěno v 10 ml 0,1M PBS o PH 7,4). Směs je zhomogenizována a dochází ke vzniku transparentního gelu

Příklad 1.17 Příprava hydrogelu na bázi tyraminového derivátu HA se spacerem

40 až 60 mg (dle požadované koncentrace roztoku polymeru) derivátu HA připraveného dle příkladu 1.9 (IX), 1.11 (XI) nebo 1.12 (XII) je rozpuštěn v 2 ml 0,1M PBS o PH 7,4. K roztoku derivátu je přidáno 10 μl roztoku enzymu HPR (2,4mg enzymu HRP rozpuštěné v 1ml 0,1M PBS o pH 7,4). Po důkladné homogenizaci je přidáno 100 μl roztoku H_2O_2 (33 μl 30% H_2O_2 rozpuštěno v 10 ml 0,1M PBS o pH 7,4). Směs je zhomogenizována a dochází ke vzniku transparentního gelu.

2. Rozdíly ve vlastnostech hydrogelů

Příklad 2.1: Rozdíl v mechanických vlastnostech hydrogelu v závislosti na typu použitého derivátu HA a množství přidaného enzymu

V závislosti na typu použitého derivátu byly dle příkladů 1.16 nebo 1.17 připraveny vzorky hydrogelů z derivátů VIII (tyraminový bez vložení spaceru), IX, XI a XII (s vloženým spacerem). Vzorky byly po důkladné homogenizaci ponechány po dobu 120 minut dozrát při laboratorní teplotě. Anology derivátů použité pro přípravu porovnávaných hydrogelů se vždy vyznačovaly srovnatelnou molekulovou hmotností a stupněm substituce. Všechny vzorky měly stejné rozměry a byly proměřovány za konstantních laboratorních podmínek (teplota, tlak, vlhkost).

U vzorků byl stanovován Youngův modul pružnosti v kompresi, houževnatost, mez pevnosti v kompresi a odpovídající deformace vzorku; rámci viskoelastických vlastností vzorků potom modul pružnosti ve smyku a ztrátový úhel.

- 5 Ze získaných výsledků jasně vyplývá, že zavedení flexibilního spaceru mezi ligand a základní řetězec hyaluronanu vede k dosažení vyšší elasticity, houževnatosti a pevnosti hydrogelů na bázi těchto derivátů, oproti hydrogelům na bázi analogických derivátů hyaluronanu bez spaceru.
- 10 Tab. 1 Znázorňuje porovnání mechanických vlastností hydrogelu v závislosti na typu použitého derivátu pro jeho přípravu. Koncentrace (%) znamená koncentrace polymeru v roztoku, z něž se hydrogel připravil, stupeň substituce (%) udává stupeň substituce reaktivním/síťovacím ligandem, tj. počet navázaných ligandů na 100 strukturních jednotek polymeru, kde v případě HA je strukturní jednotkou polymeru míněn disacharid (neboli dimer) glykosamin+kyselina glukuronová.
- 15

Tab. 1

Typ použitého derivátu	Derivát HA dle příkladu VIII	Derivát HA dle příkladu IX	Derivát HA dle příkladu VIII	Derivát HA dle příkladu XI	Derivát HA dle příkladu XII
Mw (kDa) / koncentrace (%)	320 / 3	250 / 3	280 / 2	280 / 2	285 / 2
Stupeň substituce (%)	3	3	2	1	1
Youngův modul pružnosti v kompresi (kPa)	6,59	5,68	8,99	3,87	8,19
Mez pevnosti (kPa)	73	310	108	167	218
Deformace v mezi pevnosti (%)	67	68	58	65	65
Houževnatost (J/m ³)	9150	23460	8050	9670	13650
Ztrátový úhel (°)	0,12	0,18	0,19	0,96	0,43
Modul pružnosti ve smyku (Pa)	1861	1534	876	504	1105

1. Slaughter, B.V.; Khurshid, S.S.; Fisher, O.Z.; Khademhosseini, A.; Peppas, N.A., Hydrogels in Regenerative Medicine. *Advanced Materials* 2009, 21 (32–33), 3307–3329.
2. Benedetti, L.; Cortivo, R.; Berti, T.; Berti, A.; Pea, F.; Mazzo, M.; Moras, M.; Abatangelo, G., Biocompatibility and biodegradation of different hyaluronan derivatives (Hyaff) implanted in rats. *Biomaterials* 1993, 14 (15), 1154–1160.
3. Calabro, A.; Gross, R.A.; Darr, A.B. Hydroxyphenyl cross-linked macromolecular network and applications thereof. 2004.
4. Calabro, A.; Akst, L.; Alam, D.; Chan, J.; Darr, A.B.; Fukamachi, K.; Gross, R.A.; Haynes, D.; Kamohara, K.; Knott, D.P.; Lewis, H.; Melamund, A.; Miniaci, A.; Strome, M. Hydroxyphenyl cross-linked macromolecular network and applications thereof. 2008 (WO2006/010066).

5. Tan, H.; Chu, C. R.; Payne, K.A.; Marra, K.G., Injectable in situ forming biodegradable chitosan–hyaluronic acid based hydrogels for cartilage tissue engineering. *Biomaterials* 2009, 30 (13), 2499–2506.
- 5 6. Darr, A.; Calabro, A., Synthesis and characterization of tyramine–based hyaluronan hydrogels. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 2009, 20 (1), 33–44.
7. Kurisawa, M.; Lee, F.; Chung, J.E. Formation of Hydrogel in the Presence of Peroxidase and Low Concentration of Hydrogen Peroxide 2009 (WO2009/148405).
- 10 8. Lee, F.; Chung, J.E.; Kurisawa, M. An injectable enzymatically crosslinked hyaluronic acid–tyramine hydrogel system with independent tuning of mechanical strength and gelation rate. *Soft Matter* 2008, 4, 880–887.
- 15 9. Akkara, J.A.; Senecal, K.J.; Kaplan, D.L., Synthesis and characterization of polymers produced by horseradish peroxidase in dioxane. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* 1991, 29 (11), 1561–1574.
10. Shutava, T.; Zheng, Z.; John, V.; Lvov, Y., Microrcapsule modification with peroxidase–catalyzed phenol polymerization. *Biomacromolecules* 2004, 5 (3), 914–21.
- 20 11. Ghan, R.; Shutava, T.; Patel, A.; John, V. T.; Lvov, Y.; Enzyme–Catalyzed Polymerization of Phenols within Polyelectrolyte Microcapsule. *Macromolecules* 2004, 37 (12), 4519–4524.
- 25 12. Higashimura, H.; Kobayashi, S., *Oxidative Polymerization*. John Wiley & Sons, Inc.: 2002.
13. Veitch, N.C., Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. *Phytochemistry* 2004, 65 (3), 249–259.
- 30 14. Gilabert, M.A.; Fenoll, L.G.; Garcia–Molina, F.; Garcia–Ruiz, P.A.; Tudela, J.; Garcia–Canovas, F.; Rodriguez–Lopez, J.N., Stereospecificity of horseradish peroxidase. *Biol Chem* 2004, 385 (12), 1177–84.
- 35 15. Uyama, H.; Kobayashi, S., Enzymatic Synthesis of Polyphenols. *Current Organic Chemistry* 2003, 7, 1387.
16. Gilabert, M.A.; Fenoll, L.G.; Garcia–Molina, F.; Tudela, J.; Garcia–Canovas, F.; Rodriguez–Lopez, J.N., Kinetic characterization of phenol and aniline derivatives as substrates of peroxidase. *Biol. Chem.* 2004, 385 (9), 795–800.
- 40 17. Gilabert, M.A.; Hiner, A.N.; Garcia–Ruiz, P.A.; Tudela, J.; Garcia–Molina, F.; Acosta, M.; Garcia–Canovas, F.; Rodriguez–Lopez, J.N., Differential substrate behaviour of phenol and aniline derivatives during oxidation by horseradish peroxidase: kinetic evidence for a two–step mechanism. *Biochim. Biophys Acta* 2004, 1699 (1–2), 235–43.
- 45 18. Hewson, W.D.; Dunford, H.B., Oxidation of p–cresol by horseradish peroxidase compound I. *J. Biol Chem.* 1976, 251 (19), 6036–42.
19. Burner, U.; Obinger, C., Transient–state and steady–state kinetics of the oxidation of aliphatic and aromatic thiols by horseradish peroxidase. *FEBS Letters* 1997, 411 (2–3), 269–274.
- 50 20. Patel, P.K.; Mondal, M.S.; Modi, S.; Behere, D.V., Kinetic studies on the oxidation of phenols by the horseradish peroxidase compound II. *Biochim Biophys Acta* 1997, 1339 (1), 79–87.

21. Hewson, W.D.; Dunford, H.B., Stoichiometry of the reaction between horseradish peroxidase and p-cresol. *J. Biol.Chem.* 1976, 251 (19), 6043–52.

22. Job, D.; Dunford, H.B., Substituent effect on the oxidation of phenols and aromatic amines by horseradish peroxidase compound I. *Eur J Biochem.* 1976, 66 (3), 607–14.

23. Dunford, H.B.; Cotton, M.L., Kinetics of the oxidation of p-aminobenzoic acid catalyzed by horseradish peroxidase compounds I and II. *J. Biol Chem* 1975, 250 (8), 2920–32.

24. Kalyanaraman, B.; Felix, C.C.; Sealy, R.C., Peroxidatic oxidation of catecholamines. A kinetic electron spin resonance investigation using the spin stabilization approach. *Journal of Biological Chemistry*, 1984, 259 (12), 7584–7589.

25. Won, K.; Kim Y. H.; An, E.S.; Lee, Y.S.; Song, B.K., Horseradish Peroxidase Catalyzed Polymerization of Cardanol in the Presence of Redox Mediators. *Biomacromolecules* 2003, 5 (1), 1–4.

26. Xu, Y.-P.; Hung, G.-L.; Yu, Y.-T. Kinetics of phenolic polymerization catalyzed by peroxidase in organic media. *Biotechnology and Bioengineering* 1995, 47 (1), 117–119.

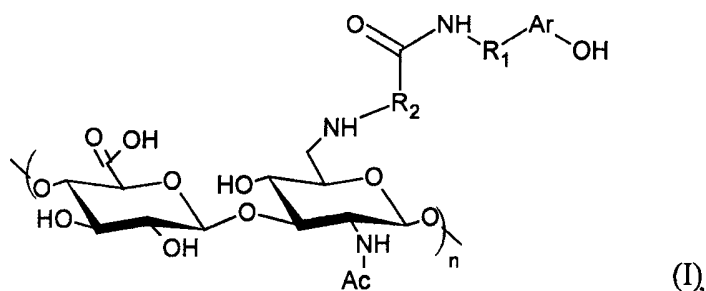
27. Tonelli, A. E., Effects of crosslink density and length on the number of intramolecular cross-links (defects) introduced into a rubbery network. *Polymer* 1974, 15 (4), 194–196.

28. Jin, R.; Hiemstra, C.; Zhong, Z.; Feijen, J., Enzyme-mediated fast in situ formation of hydrogels from dextran–tyramine conjugates. *Biomaterials* 2007, 28 (18), 2791–2800.

29. Park, K.-D.; Joung, Y.-K.; Park, K.-M. In situ Forming Hydrogel and Biomedical Use Thereof 2011 (WO2011/028031).

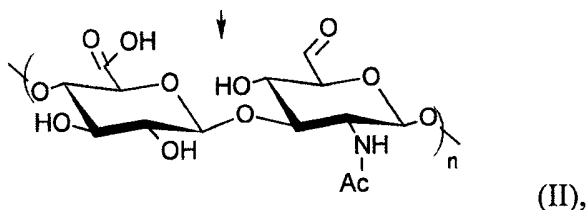
PATENTOVÉ NÁROKY

1. Derivát na bázi kyseliny hyaluronové podle obecného vzorce (I)



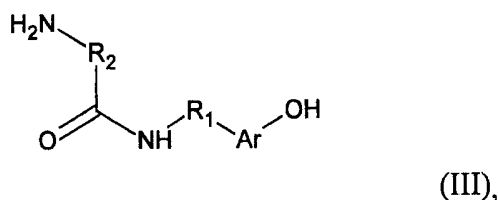
kde Ar je fenyl a R₁ je ethylen, nebo Ar je indol a R₁ je ethylen, nebo Ar je indol a R₁ je karboxy-ethylen, a kde R₂ je alkyl o počtu uhlíku 3 až 7, a kde n je v rozmezí od 1 do 7500.

2. Způsob přípravy derivátu podle obecného vzorce (I), **vyznačující se tím**, že se nejprve připraví aldehydický derivát kyseliny hyaluronové podle vzorce (II)



kde aldehydický derivát se připraví s použitím oxidačního systému 4-acetamido-TEMPO/NaClO v protickém prostředí a má stupeň substituce 5 až 15 % a molekulovou hmotnost v rozmezí 10 000 g/mol až 2 000 000 g/mol,

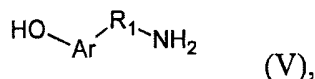
dále se zvlášť připraví sloučenina obecného vzorce (III)



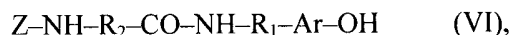
kde Ar je fenyl a R₁ je ethylen, nebo Ar je indol a R₁ je ethylen, nebo Ar je indol a R₁ je karboxy-ethylen, a kde R₂ je alkyl o počtu uhlíků 3 až 7, a kde n je v rozmezí od 1 do 7500, přičemž sloučenina obecného vzorce (III) se připraví reakcí prekursoru spaceru podle vzorce (IV)



kde Z je chránicí skupina běžně používaná k ochraně primární aminoskupiny, s ligandem podle vzorce (V)



v aprotickém prostředí při teplotě v rozmezí 40 °C až 150 °C po dobu 1 až 24 hodin v přítomnosti činidla aktivujícího karboxylové funkční skupiny, za vzniku sloučeniny obecného vzorce (VI)



ze které se sloučenina obecného vzorce (III) připraví odstraněním chránicí skupiny Z, a pak se aldehydický derivát kyseliny hyaluronové podle vzorce (II) nechá reagovat se sloučeninou obecného vzorce (III) při pH v rozmezí 3 až 8 při laboratorní teplotě po dobu 1 až 72 hodin v přítomnosti pikolin-boranového komplexu za vzniku derivátu podle vzorce (I).

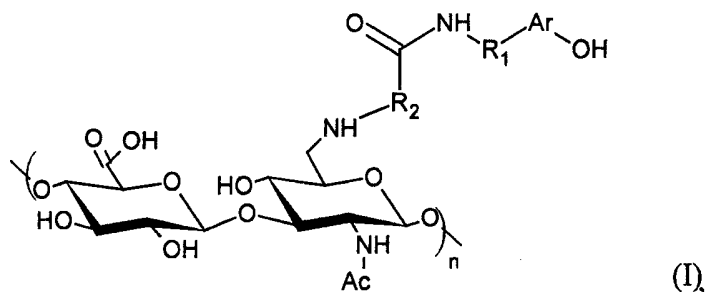
3. Způsob přípravy podle nároku 2, vyznačující se tím, že ligand dle obecného vzorce (V) je vybrán ze skupiny zahrnující tyramin, serotonin a 5-hydroxytryptofan.

4. Způsob přípravy podle kteréhokoli z nároků 2 až 3, vyznačující se tím, že sloučenina obecného vzorce (IV), tj. prekursor spaceru, je vybrána ze skupiny aminokyselin zahrnující deriváty ω-[(*tert*-butoxykarbonyl)amino]karboxylových kyselin, kde R₂ je alkyl o počtu uhlíků 3 až 7.

5. Způsob přípravy podle kteréhokoli z nároků 2 až 4, vyznačující se tím, že reakce prekursoru spaceru s ligandem probíhá v prostředí THF nebo DMF při teplotě 50 °C po dobu 2 až 6 hodin v přítomnosti 1,1'-karbodiimidazolu.

6. Způsob přípravy podle kteréhokoli z nároků 2 až 5, **vyznačující se tím**, že odstranění chránicí skupiny Z se provede prostřednictvím trifluoroctové nebo chlorovodíkové kyseliny.

- 5 7. Hydrogel na bázi zesíťovaného derivátu podle obecného vzorce (I)



- 10 kde Ar je fenyl a R₁ je ethylen, nebo Ar je indol a R₁ je ethylen, nebo Ar je indol a R₁ je karboxyethylen, a kde R₂ je alkyl o počtu uhlíků 3 až 7, a kde n je v rozmezí od 1 do 7500.

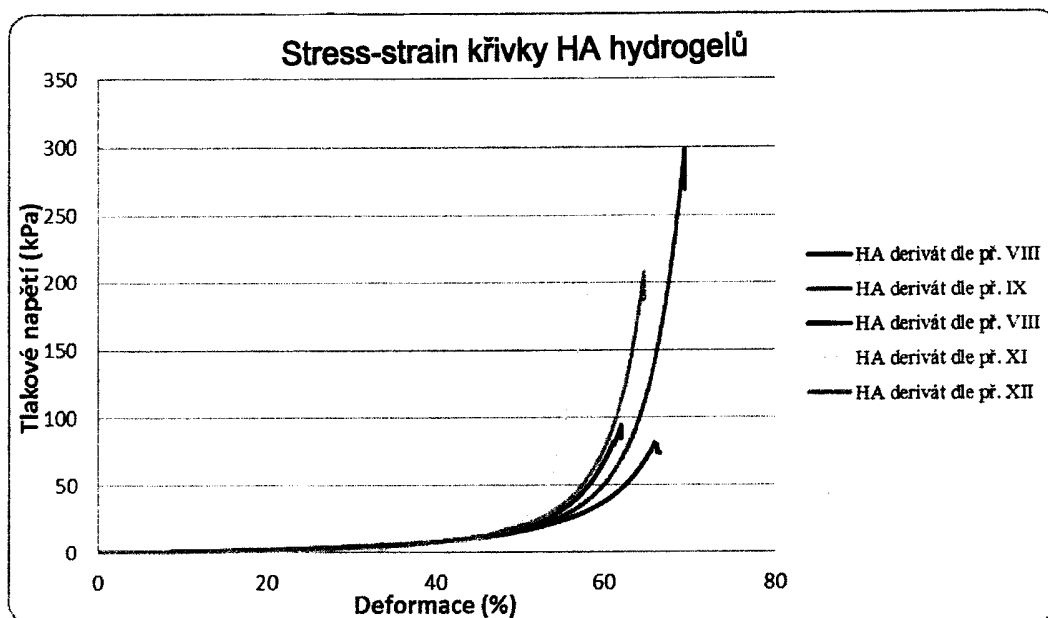
- 15 8. Způsob výroby hydrogelu definovaného v nároku 7, **vyznačující se tím**, že se na derivát podle obecného vzorce (I) působí generátorem reaktivních fenoxyradikálů při pH v rozmezí 4 až 10.

- 20 9. Způsob výroby podle nároku 8, **vyznačující se tím**, že generátor reaktivních fenoxyradikálů je vybrán ze skupiny zahrnující systém křenová peroxidáza a zdroj hydroxylových radikálů, kde zdrojem hydroxylových radikálů může být roztok peroxidu vodíku ve vodě, nebo systém oxidáza–kyslík–substrát, např. galaktózooxidáza–galaktóza nebo glukózooxidáza–glukóza.

10. Použití hydrogelu definovaného v nároku 7 pro výrobu přípravků pro kosmetiku, medicínu, či regenerativní medicínu.

- 25 11. Použití podle nároku 10, kde přípravky zahrnují krytí pro hojení ran, biodegradabilní bariéry bránící vzniku pooperačních srůstů, přípravky pro augmentaci měkkých tkání, výplně tkáňových defektů, scaffoldy pro tkáňové inženýrství.

- 30 12. Použití podle nároku 10, kde přípravky zahrnují oseté nebo neoseté scaffoldy pro léčbu defektů kloubní chrupavky a kostních defektů.

**Obr. 1**

Konec dokumentu
