

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

301 555

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2008-705**
(22) Přihlášeno: **06.11.2008**
(40) Zveřejněno: **14.04.2010**
(Věstník č. 15/2010)
(47) Uděleno: **03.03.2010**
(24) Oznámení o udělení ve Věstníku: **14.04.2010**
(Věstník č. 15/2010)

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:
C08B 37/08 (2006.01)
C07H 13/02 (2006.01)
A61K 31/728 (2006.01)
A61K 31/738 (2006.01)

(56) Relevantní dokumenty:

CZ PV 2006-605; US 6509039 B1; JP 3975267; US 5690961.

(73) Majitel patentu:

CPN s. r. o., Dolní Dobrouč, CZ

(72) Původce:

Buffa Radovan Mgr. Ph.D., 06601 Humenné, SK

Velebný Vladimír RNDr. CSc., Žamberk, CZ

Palek Lukáš Mgr., Plzeň, CZ

Kettou Sofiane Mgr., Uherské Hradiště, CZ

Pravda Martin Mgr., Chrudim, CZ

(74) Zástupce:

KANIA, SEDLÁK, SMOLA Patentová a známková
kancelář, Ing. František Kania, Mendlovo nám. 1a, Brno,
60300

(54) Název vynálezu:

**Způsob přípravy DTPA síťovaných derivátů
kyseliny hyaluronové a jejich modifikace**

(57) Anotace:

Vynález se týká modifikace kyseliny hyaluronové pomocí protonizovaného bis anhydridu DTPA (diethylentriaminpentaoctové kyseliny) ve slabě kyselém až neutrálním polárním aprotickém rozpouštědle bez přítomnosti externí báze za vzniku síťovaných produktů. Reakce probíhá přes krok tvorby komplexu, kde acylačním činidlem je samotný kokation hyaluronanu konkrétně protonizovaný DTPA bis anhydrid. Výsledný síťovaný produkt (linker) obsahuje tři karboxylové skupiny a tři terciální aminy, které jsou schopny efektně komplexovat různé kovy. Výslednou DTPA síťovanou kyselinu hyaluronovou je možné také hydrofobizovat pomocí mono, bis a tris funkčních alkylačních činidel.

CZ 301555 B6

Způsob přípravy DTPA síťovaných derivátů kyseliny hyaluronové a jejich modifikace

Oblast techniky

5

Vynález se týká nového způsobu modifikace kyseliny hyaluronové za vzniku síťovaných derivátů DTPA (diethylentriaminpentaoctové kyseliny) a reakcí těchto modifikovaných derivátů. Modifikace kyseliny hyaluronové je provedena pomocí protonizovaného DTPA bis anhydridu ve slabě kyselém až neutrálním polárním aprotickém rozpouštědle bez přítomnosti externí báze za vzniku síťovaných produktů. Linkery těchto síťovaných derivátů obsahují tři karboxylové skupiny a tři terciální aminy, které jsou schopny efektivně komplexovat různé kovy a dávají také možnost dále modifikovat karboxylové skupiny DTPA, např. hydrofobizovat síťovaný derivát alkylačními činidly.

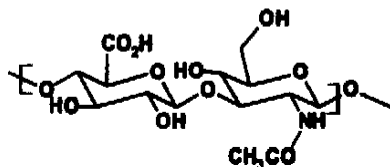
15

Dosavadní stav techniky

Polysacharidy jsou polymery složené z jednoduchých monosacharidů (monomerních jednotek) spojených glykosidickou vazbou. Podle počtu opakujících se jednotek rozlišujeme oligosacharidy (2 až 10 jednotek) spojených glykosidickou vazbou. Podle počtu opakujících se jednotek rozlišujeme oligosacharidy (2 až 10 jednotek) a polysacharidy (10 a více jednotek). Význam polysacharidů je značný. Polysacharidy plní funkci nutriční, ochrannou, stavební (celulóza, chitin) nebo zásobní (škrob). Polymery obecně jsou charakterizovány průměrnou molekulovou hmotností, která se běžně pohybuje okolo $16 \cdot 10^3 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ až $16 \cdot 10^6 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$. Počet opakujících se jednotek je dán stupněm polymerizace.

25

Významným polysacharidem je kyselina hyaluronová:



30

komponovaná z opakujících se jednotek β -(1,3)-D-glukuronové kyseliny a β -(1,4)-N-acetyl-D-glukosaminu. Vyznačuje se velkou molekulovou hmotností $5 \cdot 10^4$ až $5 \cdot 10^6 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$, která závisí na způsobu izolace a výchozím materiálu. Kyselina hyaluronová, respektive její sůl hyaluronan, je nezbytnou součástí pojivových tkání, synoviální tekutiny kloubů, hraje významnou roli v řadě biologických procesů jako je hydratace, organizace proteoglykanů, diferenciacce buněk, proliferace a angiogeneze. Tento značně hydrofilní polysacharid je ve vodě rozpustný ve formě soli v celé šíři pH.

35

Kyselina hyaluronová je zástupcem skupiny glykosaminoglykanů, která dále zahrnuje chondroitin sulfát, dermatan sulfát, keratan sulfát a heparan sulfát.

40

Acylace kyseliny hyaluronové

Acylace polysacharidů je nejčastěji využívaná metoda k zavedení alkylového řetězce, který mění vlastnosti převážně hydrofilních látek na látky hydrofobní. Reakce se nejčastěji provádí působením anhydridů příslušných kyselin, chloridů kyselin nebo samotnou kyselinou za přítomnosti katalyzátorů.

45

Příprava acyl-derivátů oligomerů kyseliny hyaluronové je patentována Couchmannem a kol. (US patent US 4 761 401; 1988), kde acylace probíhá jak na hydroxylové, tak na amino skupině deacetylovaného hyaluronanu. O-acylace zahrnuje reakci s organickou kyselinou za přítomnosti katalyzátorů.

50

kyselého katalyzátoru (minerální kyseliny, organické nebo Lewisovy kyseliny) a aktivačního činidla (*N,N*-dicyklohexylcarbodiimid, 2-chlor-1-methyl pyridiniumiodid a *N,N*-carbonyl diimidazol), nebo používá anhydridů a chloridů kyselin v přítomnosti báze. Michinori a kol. (JP patent 7309902, 1995) připravili acylovanou kyselinu hyaluronovou reakcí s anhydridy karboxylových kyselin nebo jejich acylhalogenidy ve vodném prostředí obsahujícím s výhodou mísitelné organické rozpouštědlo v přítomnosti katalyzátoru. Saponifikací acylových skupin kyseliny hyaluronové bylo docíleno derivátů s libovolným počtem acylových skupin. Chlorid kyseliny retinové a anhydrid kyseliny máselné použil k přípravě specifických derivátů hyaluronové kyseliny i Perbellini a kol. (WO 2004/056877 A1; 2004). Pro syntézu v prostředí *N,N*-dimethylformamidu byla použita kyselina hyaluronová ve formě tetrabutylamonných solí.

Dále je z PV 2006-605 znám způsob modifikace polysacharidů, mj. i kyseliny hyaluronové, pomocí směsných anhydridů v prostředí vody nebo organického rozpouštědla, případně v přítomnosti přídavných látek. Nevýhodou tohoto způsobu oproti vynálezu je nízký stupeň substituce kyseliny hyaluronové a nutnost přídavného kroku způsobu, spočívající v tom, že nestabilní sloučeninu RCO-O-CO-OR^1 je nutné si připravit těsně před reakcí.

JP 3975267 popisuje způsob acylace polysacharidů zahrnující reakci polysacharidu s anhydridem karboxylové kyseliny, kde je však nutné použít velký přebytek halogenidu kovu, z čehož plynou vysoké nároky na čištění produktu a vysoké vstupní náklady. Jelikož DTPA je známá jako vysoce účinné komplexační činidlo, není vhodná pro použití ve způsobu podle JP 3975267 z důvodu extrémní náročnosti odstraňování přítomného kovu ze struktury HA-DTPA-kov. Další nevýhodou JP 3975267 je nutnost použití velkého přebytku anhydridu, což může významně navýšit vstupní náklady. Ještě další nevýhodou JP 3975267 je, že jako rozpouštědlo je nutné použít karboxylovou kyselinu, která má stejný řetězec jako použitý anhydrid, t.j. kyselina octová – acetanhydrid, kyselina propionová – propionanhydrid apod. V případě, že příslušná karboxylová kyselina není v podmínkách reakce kapalná (např. kys. benzoová aj.), postup nelze použít vůbec (není přítomné rozpouštědlo). Navíc jako rozpouštědlo je nutné použít karboxylovou kyselinu, která alespoň částečně rozpouští HA, což úplně vylučuje použití např. lipofilních karboxylových kyselin.

Síťování kyseliny hyaluronové

Síťování neboli „crosslinking“ kyseliny hyaluronové bylo popsáno několika způsoby. Mezi nejjednodušší způsoby patří síťování pomocí POCl_3 (US 5 783 691). Balasz a kol. síťovali kyselinu hyaluronovou pomocí divinylsulfonu (US 4 582 865). Dalšími reaktivními elektrofilními vhodnými pro síťování jsou aldehydy (US 4 713 448). Velmi rozšířenými činidly schopnými reagovat se dvěma polymery jsou epoxidy nebo bisepoxidy (WO 86/00912, WO 2007/129828), kde nejznámějším zástupcem této skupiny je epichlorhydrin.

Použitím EDC je možné zvýšit reaktivitu karboxylové skupiny kyseliny hyaluronové, která je pak schopna síťovacích reakcí s polyanionickými sloučeninami (US 4 937 270). Jiným zástupcem polynukleofilních reaktantů jsou polyhydrazidy (WO 2006/001046). Způsob síťování kyseliny hyaluronové pomocí polyanhydridu, poly(alkylolchloridu), polyepoxidu, polykarbodiimidu byl shrnut v patentu (WO 00/46252). Při reakci bis karbodiimidu s kyselinou hyaluronovou (WO 2005/067994) dochází k síťování pomocí reaktivního elektrofilního činidla. Možnosti síťovat pomocí redox reakcí je zachycena v patentu (EP 1683812 A1), kde vzniká disulfidické přemostění z thiolových derivátů kyseliny hyaluronové. Zvláštní skupinu síťování tvoří fotochemické reakce. Je známo, že vinylenová skupina skořicové kyseliny nebo její aryl-substituovaný analog je schopný fotochemicky cyklizovat na cyklobutan. Tuto skutečnost využili autoři patentu (EP 1217008 A1), kteří *N*-deacylovaný derivát hyaluronové kyseliny acylovali na dusíku glukosaminové části polysacharidu s chloridem kyseliny skořicové. Samotné síťování proběhlo ozařováním světlem vlnové délky 280 nm. Kromě skořicové kyseliny je taky možné použít jiné fotoreaktivní skupiny navázané na kyselinu hyaluronovou (WO 97/18224, EP 0763754 A2), které ozařením světlem vhodné vlnové délky dávají síťované deriváty. Patenty, které se věnovaly

acylaci a síťování kyseliny hyaluronové v přítomnosti báze nebo v bazickém rozpouštědle, byly publikovány Yui a kol (US 6 673 919), resp. Nguyenem a kol. (US 5 690 961).

5 US 6 509 039 B1 popisuje zesíťované produkty biopolymerů obsahujících aminoskupiny, konkrétně produkty chitosanu nebo želatiny, s poly-anhydridy karboxylových kyselin, vznikající v prostředí kyseliny octové a acetonu. Nejdůležitější rozdíl mezi US 6 509 039 B1 a tímto vynálezem spočívá v tom, že popisuje modifikaci polysacharidů obsahujících volnou aminoskupinu, zatímco kyselina hyaluronová (HA) neobsahuje volnou aminoskupinu. Postupy aplikované v patentu US 6 509 039 B1 by nebyly schopné významněji modifikovat HA, protože HA nemá dostatečně reaktivní skupinu pro reakci s anhydridem v navrhovaných podmínkách.

15 Mezi nevýhody výše uvedených známých řešení patří náročné čištění síťovaných derivátů kyseliny hyaluronové od toxických nízkomolekulárních polárních sloučenin, které jsou uvězněny v síti derivátů, složitost známých postupů aj. Způsob podle vynálezu je oproti známým analogům jednodušší a nevyžaduje přítomnost výrazně toxických rozpouštědel nebo acylačních katalyzátorů.

20 Podstata vynálezu

Podstatou vynálezu je způsob přípravy derivátů kyseliny hyaluronové reakcí kyseliny hyaluronové s protonizovaným bis anhydridem DTPA (diethylentriaminpentaoctové kyseliny) dle Schématu 1:

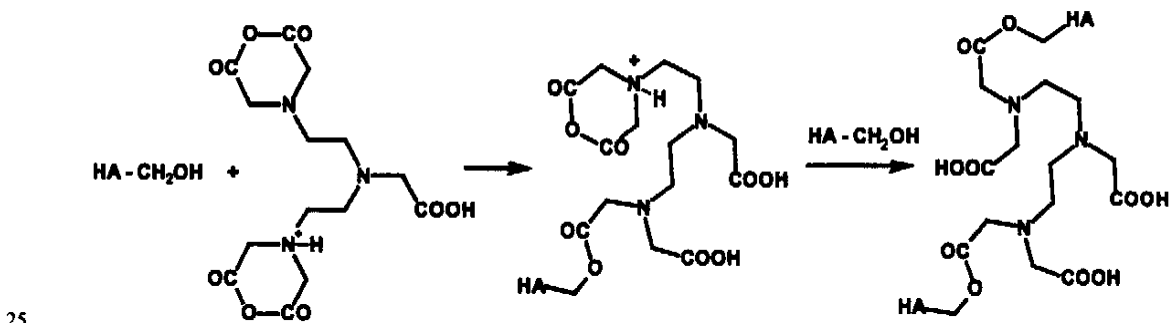


Schéma 1: Reakce protonizovaného DTPA bis anhydridu s kys. hyaluronovou ($\text{HA}-\text{CH}_2-\text{OH}$)

30 Reakce probíhá ve slabě kyselém až neutrálním polárním aprotickém rozpouštědle bez přítomnosti externí báze za vzniku síťovaných produktů. Rozpouštědlo je s výhodou vybráno ze skupiny zahrnující DMSO, sulfolan nebo dialkylsulfony. Ve způsobu podle vynálezu je kyselina hyaluronová s výhodou ve formě volné kyseliny a má s výhodou molekulovou hmotnost v rozsahu $1 \cdot 10^4$ až $5 \cdot 10^6 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ a polydisperzitu v rozsahu 1,02 až 5,0.

35 Navrhovaný postup je oproti známým analogům jednodušší a nevyžaduje přítomnost výrazně toxických rozpouštědel nebo acylačních katalyzátorů.

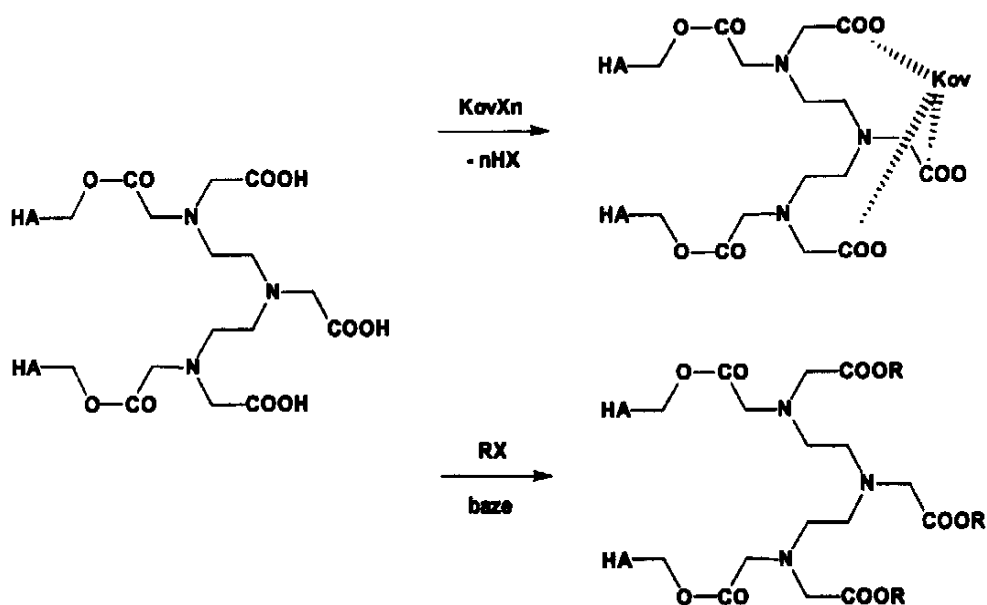


Schéma 2: Reakce HA–DTPA–HA s kovy a alkylačními činidly

- 5 Navázání DTPA bis anhydridu esterickou vazbou probíhá při 15 až 70 °C, s výhodou při 60 °C, což je možné vysvětlit tím, že DTPA bis anhydrid je protonizován karboxylovou skupinou kyseliny hyaluronové za vzniku komplexu, kde acylačním činidlem je samotný kokation hyaluronanu. Příslušná acylace probíhá buď přímo na některé hydroxy skupině, anebo na karboxylátové skupině glukuronové části a následně intramolekulově na hydroxy skupině – viz Schéma 3.

10

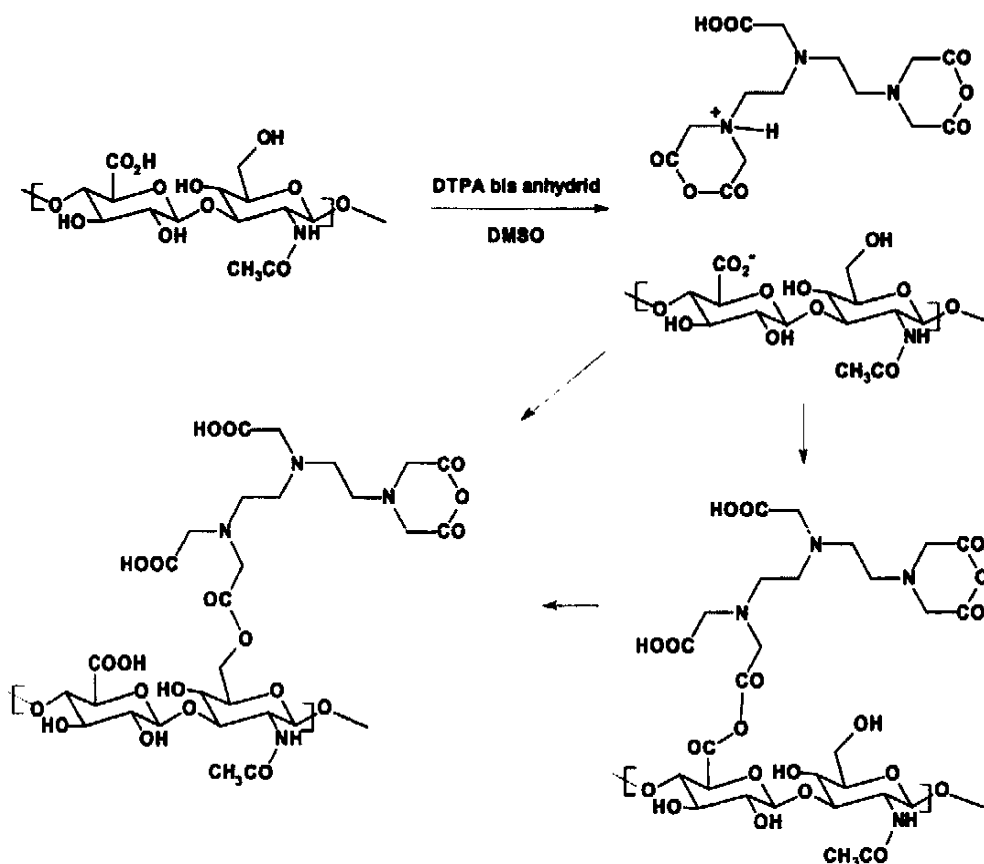


Schéma 3: Detailní schéma reakce protonizovaného DTPA bis anhydridu s kyselinou hyaluronovou.

¹H NMR spektrum směsi kyseliny hyaluronové a DTPA bis anhydridu v deuterovaném DMSO v časech 0,1h až 24h (viz obr. 1) potvrzuje zánik původních signálů vodíků –N–CH₂–CH₂–N–
 patřících DTPA bis anhydridu (3,3; 3,4; 3,65; 3,85 ppm) a vznik nové kvality (píků) v oblasti 3,2
 5 až 3,8 ppm indikující vznik protonovaného DTPA bis anhydridu. Tabulkové údaje pro pKa hodnoty analogických systémů (R–COOH – pKa ~ 4, alkyl₃N – pKa ~ 11) tuto možnost také preferují.

Ve způsobu podle vynálezu se kyselina hyaluronová s výhodou rozpustí v DMSO nebo sulfolanu,
 10 pak se přidá DTPA bis anhydrid a směs se míchá bez přístupu vzdušné vlhkosti při teplotě 15 až 70 °C, s výhodou při 60 °C, po dobu 1 až 150 h, s výhodou 24 h.

Linker, tj. získaný zesíťovaný derivát, obsahuje tři karboxylové skupiny a tři terciální aminy,
 15 které jsou schopny efektivně komplexovat různé kovy a dávají taky možnost hydrofobizovat karboxylové skupiny DTPA linkeru pomocí mono, bis a trisfunkčních alkylačních činidel – viz Schéma 2.

Komplexy síťovaných derivátů kyseliny hyaluronové a diethylentriaminpentaoctové kyseliny
 s atomy kovů se připraví reakcí chloridu nebo acetátu příslušného kovu, jako například kovů
 20 alkalických zemin – Ca, Mg nebo přechodných kovů – Fe, Gd, In, Zn, Eu, Tb ve vodě nebo v polárním aprotickém rozpouštědle při teplotě 15 až 70 °C, s výhodou při 20 °C po dobu 1 min až 24 h. Z hlediska komplexačních vlastností DTPA se nabízí možnost tvorby chelátových komplexů DTPA hyaluronanu např. s gadoliniem pro diagnostické účely nebo s radioaktivním indiem ¹¹³In pro účely sledování distribuce hyaluronanu v živém organismu nebo zinkem, který
 25 by mohl v komplexu s DTPA hyaluronanem vykazovat určitou aktivitu využitelnou v kosmetice.

Hydrofobizace síťovaných derivátů kyseliny hyaluronové a diethylentriaminpentaoctové kyseliny
 nastává po reakci s mono, bis nebo tris funkčními alkylačními činidly ve vodě nebo v polárním
 30 aprotickém rozpouštědle nebo směsi těchto rozpouštědel a báze při teplotě 15 až 70 °C, s výhodou při 60 °C, po dobu 1 až 150 h. Alkylační činidla obecného vzorce R–X zahrnují alkyl(aryl)-halogenidy, kde R je lineární nebo rozvětvený řetězec C₁ až C₃₀ volitelně s obsahem aromatických nebo heteroaromatických skupin a X je halogen, nebo alkyl(aryl)sulfáty, kde R má výše uvedený význam a X je skupina –O–SO₂–R. Použité báze zahrnují anorganické sloučeniny obecného vzorce M₂CO₃, MF, kde M je alkalický kov, nebo dusíkaté organické báze obecného vzorce R₃N, kde R je alkyl C₁ až C₃₀ s lineárním nebo rozvětveným řetězcem volitelně
 35 s obsahem aromatických nebo heteroaromatických skupin.

Zde uváděné molekulové hmotnosti kyseliny hyaluronové a jejích derivátů jsou hmotnostně
 40 střední molekulové hmotnosti.

Přehled obrázků na výkresech

Obr. 1 znázorňuje změny v ¹H NMR spektru směsi kyseliny hyaluronové a DTPA bis anhydridu
 45 v DMSO v čase 0,1 h až 24 h.

Příklady provedení vynálezu

5 Příklad 1

Modifikace kyseliny hyaluronové s DTPA bis anhydridem.

10 Kyselá forma kyselina hyaluronové HA-COOH (10 kDa, 50 mg) byla rozpuštěna v bezvodém DMSO (5 ml) při 60 °C. DTPA bisanhydrid (95 mg) byl přidán k roztoku polysacharidu při 60 °C a směs byla míchána 24 h bez přístupu vzdušné vlhkosti. Po ochlazení ledovou vodou byla přidána destilovaná voda a roztok 150 mg Na₂CO₃ v 30 ml vody, směs se míchala 30 min. a potom byla zředěna destilovanou vodou na 100 ml a dialyzována proti destilované vodě 7 krát l l. Výsledný roztok byl lyofilizován za vzniku 88 mg produktu.

15 M_w = 2800 kDa, Polydisperzita = 2,563 (stanoveno pomocí metody SEC-MALL),

20 IR 1739 cm⁻¹, stupeň substituce 110 % (počítáno z NMR na dimer polysacharidu), ¹H NMR (měřeno po přidání 0,02 ml 20 % aq NaOD) DTPA (δ 2,55 4H, 2,6 4H, 3,10 2H, 3,5 6H), ¹³C NMR DTPA (δ 183,0, 182,8, 61,5, 61,1, 54,5, 54,4 ppm).

Příklad 2

25 *Modifikace kyseliny hyaluronové s DTPA bis anhydridem*

30 Kyselá forma kyseliny hyaluronové HA-COOH (10 kDa, 50 mg) byla rozpuštěna v bezvodém sulfolanu (5 ml) při 60 °C. DTPA bisanhydrid (95 mg) byl přidán k roztoku polysacharidu při 60 °C a směs byla míchána 24 h bez přístupu vzdušné vlhkosti. Po ochlazení ledovou vodou byla přidána destilovaná voda a roztok 150 mg Na₂CO₃ v 30 ml vody, směs se míchala 30 min a potom byla zředěna destilovanou vodou na 100 ml a dialyzována proti destilované vodě 7 krát l l. Výsledný roztok byl lyofilizován za vzniku 78 mg produktu.

35 M_w = 2600 kDa, Polydisperzita = 2,951 (stanoveno pomocí metody SEC-MALL),

40 IR 1739 cm⁻¹, stupeň substituce 98 % (počítáno z NMR na dimer polysacharidu), ¹H NMR (měřeno po přidání 0,02 ml 20 % aq NaOD) DTPA (δ 2,55 4H, 2,6 4H, 3,10 2H, 3,5 6H), ¹³C NMR DTPA (δ 183,0, 182,8, 61,5, 61,1, 54,5, 54,4 ppm).

40 Příklad 3

Modifikace kyseliny hyaluronové s DTPA bis anhydridem

45 Kyselá forma kyseliny hyaluronové HA-COOH (350 kDa, 50 mg) byla rozpuštěna v bezvodém DMSO (5 ml) při 60 °C. DTPA bisanhydrid (95 mg) byl přidán k roztoku polysacharidu při 60 °C a směs byla míchána 24 h bez přístupu vzdušné vlhkosti. Po ochlazení ledovou vodou byla přidána destilovaná voda a roztok 150 mg Na₂CO₃ v 30 ml vody, směs se míchala 30 min a potom byla zředěna destilovanou vodou na 100 ml a dialyzována proti destilované vodě 7 krát l l. Výsledný roztok byl lyofilizován za vzniku 83 mg produktu.

50 IR 1739 cm⁻¹, stupeň substituce 90 % (počítáno z NMR na dimer polysacharidu), ¹H NMR (měřeno po přidání 0,02 ml 20 % aq NaOD) DTPA (δ 2,55 4H, 2,6 4H, 3,10 2H, 3,5 6H), ¹³C NMR DTPA (δ 183,0, 182,8, 61,5, 61,1, 54,5, 54,4 ppm).

55

Příklad 4

Modifikace kyseliny hyaluronové s DTPA bis anhydridem

5

Kyselá forma kyseliny hyaluronové HA-COOH (350 kDa, 50 mg) byla rozpuštěna v bezvodém DMSO (5 ml) při 60 °C. DTPA bisanhydrid (25 mg) byl přidán k roztoku polysacharidu při 60 °C a směs byla míchána 24 h bez přístupu vzdušné vlhkosti. Po ochlazení ledovou vodou byla přidána destilovaná voda a roztok 150 mg Na₂CO₃ v 30 ml vody, směs se míchala 30 min a potom byla zředěna destilovanou vodou na 100 ml a dialyzována proti destilované vodě 7 krát l l. Výsledný roztok byl lyofilizován za vzniku 61 mg produktu.

IR 1739 cm⁻¹, stupeň substituce 30 % (počítáno z NMR na dimer polysacharidu), ¹H NMR (měřeno po přidání 0,02 ml 20 % aq NaOD) DTPA (δ 2,55 4H, 2,6 4H, 3,10 2H, 3,5 6H), ¹³C NMR DTPA (δ 183,0, 182,8, 61,5, 61,1, 54,5, 54,4 ppm)

15

Příklad 5

Modifikace kyseliny hyaluronové s DTPA bis anhydridem

20

Kyselá forma kyseliny hyaluronové HA-COOH (350 kDa, 50 mg) byla rozpuštěna v bezvodém DMSO (5 ml) při 60 °C. DTPA bisanhydrid (10 mg) byl přidán k roztoku polysacharidu při 60 °C a směs byla míchána 24 h bez přístupu vzdušné vlhkosti. Po ochlazení ledovou vodou byla přidána destilovaná voda a roztok 150 mg Na₂CO₃ v 30 ml vody, směs se míchala 30 min a potom byla zředěna destilovanou vodou na 100 ml a dialyzována proti destilované vodě 7 krát l l. Výsledný roztok byl lyofilizován za vzniku 53 mg produktu.

IR 1739 cm⁻¹, stupeň substituce 6 % (počítáno z NMR na dimer polysacharidu), ¹H NMR (měřeno po přidání 0,02 ml 20 % aq NaOD) DTPA (δ 2,55 4H, 2,6 4H, 3,10 2H, 3,5 6H), ¹³C NMR DTPA (δ 183,0, 182,8, 61,5, 61,1, 54,5, 54,4 ppm).

30

Příklad 6

35

Modifikace kyseliny hyaluronové s DTPA bis anhydridem

Kyselá forma kyseliny hyaluronové HA-COOH (2000 kDa, 50 mg) byla rozpuštěna v bezvodém DMSO (10 ml) při 60 °C. DTPA bisanhydrid (95 mg) byl přidán k roztoku polysacharidu při 60 °C a směs byla míchána 24 h bez přístupu vzdušné vlhkosti. Po ochlazení ledovou vodou byla přidána destilovaná voda a roztok 150 mg Na₂CO₃ v 30 ml vody, směs se míchala 30 min a potom byla zředěna destilovanou vodou na 100 ml a dialyzována proti destilované vodě 7 krát l l. Výsledný roztok byl lyofilizován za vzniku 68 mg produktu.

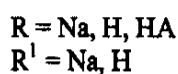
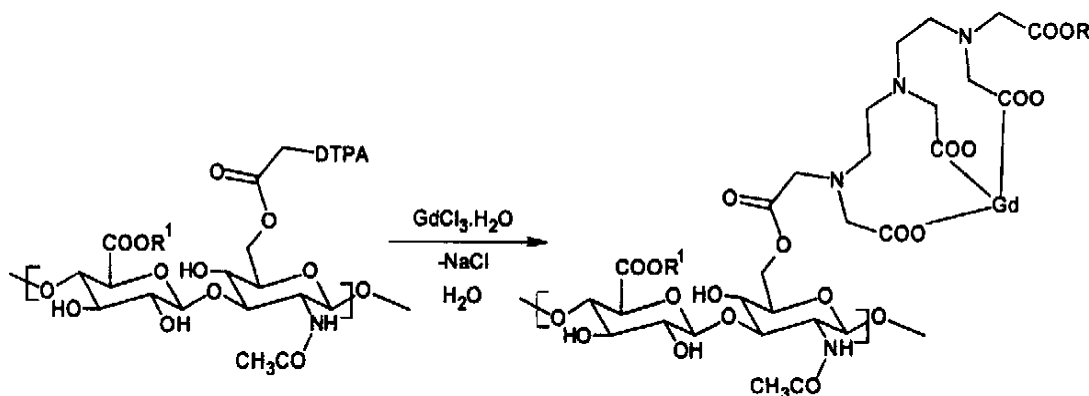
40

IR 1739 cm⁻¹, stupeň substituce 76 % (počítáno z NMR na dimer polysacharidu), ¹H NMR (měřeno po přidání 0,02 ml 20 % aq NaOD) DTPA (δ 2,55 4H, 2,6 4H, 3,10 2H, 3,5 6H), ¹³C NMR DTPA (δ 183,0, 182,8, 61,5, 61,1, 54,5, 54,4 ppm).

45

Příklad 7

Příprava komplexů HA-DTPA-Gd



5

Schéma 4

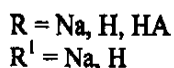
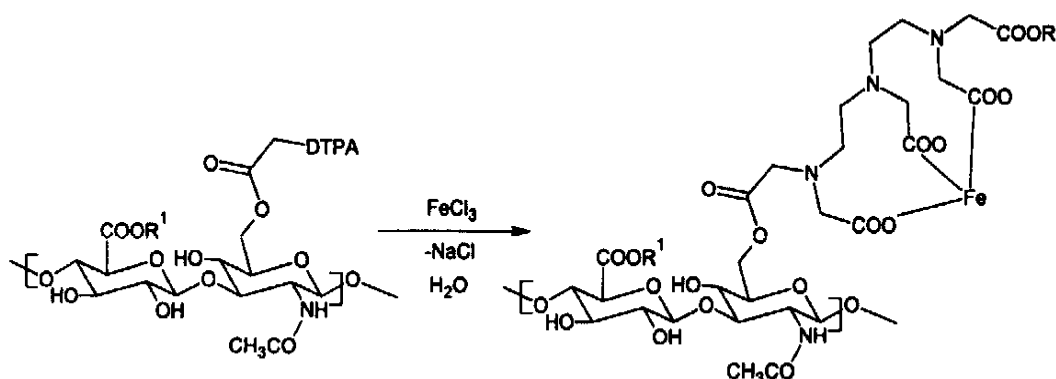
Do roztoku HA-DTPA (modifikované kyseliny hyaluronové z příkladu 5) (stupeň substituce 6 % mol, počítáno na dimer kyseliny hyaluronové, 1 g) ve vodě (100 ml) byl přidán 1% roztok GdCl₃·6H₂O (40 mg GdCl₃·6H₂O, 0,04 eq ve vodě) a směs byla míchána 1 h při teplotě místnosti. Výsledný roztok byl pak dialyzován oproti 1 litru destilované vody, přičemž v oddialyzovaném roztoku po odpaření solventu nebyla zjištěna přítomnost gadolinia pomocí chelatačního barviva xylenolové oranže v acetátovém pufru. Z této skutečnosti a z faktu, že takto lze detekovat koncentraci Gd v 10⁻³ mg/ml, je možné usoudit, že víc než 95 % přidaného gadolinia bylo vázáno v HA-DTPA.

10

15

Příklad 8

Příprava komplexů HA-DTPA-Fe



20

Schéma 5

Do roztoku HA-DTPA (modifikované kyseliny hyaluronové z příkladu 5) (stupeň substituce 6 % mol, počítáno na dimer kyseliny hyaluronové, 1 g) ve vodě (100 ml) byl přidán 1% roztok FeCl₃ (20 mg FeCl₃, 0,04 eq ve vodě) a směs byla míchána 1 h při teplotě místnosti. Výsledný

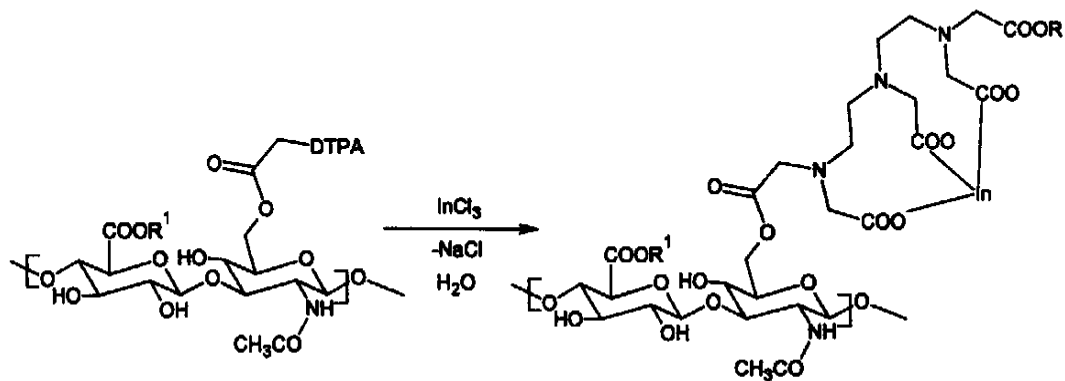
roztok byl pak dialyzován oproti 1 litru destilované vody, přičemž v oddialyzovaném roztoku po odpaření solventu nebyla zjištěna přítomnost železa pomocí chelatačního barviva xylenolové oranže v acetátovém pufru. Z této skutečnosti a z faktu, že takto lze detekovat koncentraci Fe v 10^{-4} mg/ml, je možné usoudit, že víc než 97 % přidaného železa bylo vázáno v HA-DTPA.

5

Příklad 9

Příprava komplexů HA-DTPA-In

10



R = Na, H, HA
R¹ = Na, H

Schéma 6

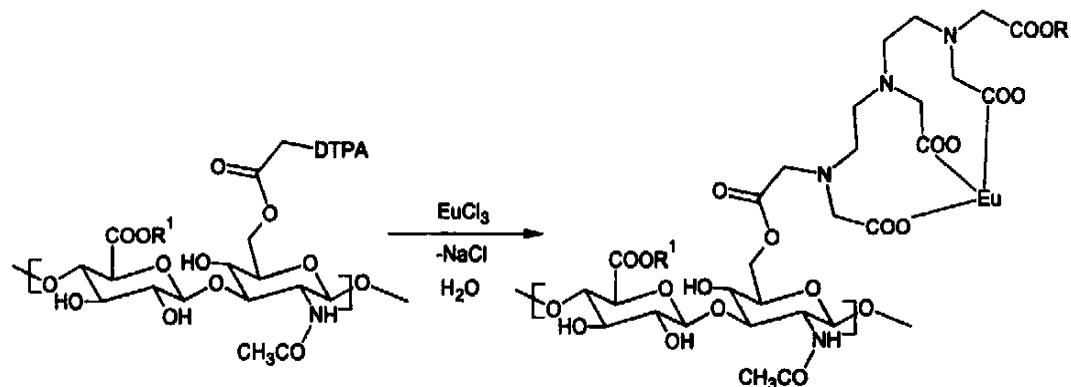
Do roztoku HA-DTPA (modifikované kyseliny hyaluronové z příkladu 5) (stupeň substituce 6 % mol, počítáno na dimer kyseliny hyaluronové, 1 g) ve vodě (100 ml) byl přidán 1% roztok InCl_3 (17 mg InCl_3 , 0,04 eq ve vodě) a směs byla míchána 1 h při teplotě místnosti. Výsledný roztok byl pak dialyzován oproti 1 litru destilované vody, přičemž v oddialyzovaném roztoku po odpaření solventu nebyla zjištěna přítomnost india pomocí chelatačního barviva xylenolové oranže v acetátovém pufru. Z této skutečnosti a z faktu, že takto lze detekovat koncentraci In v 10^{-4} mg/ml, je možné usoudit, že víc než 97 % přidaného india bylo vázáno v HA-DTPA.

15

20

Příklad 10

25 Příprava komplexů HA-DTPA-Eu



R = Na, H, HA
R¹ = Na, H

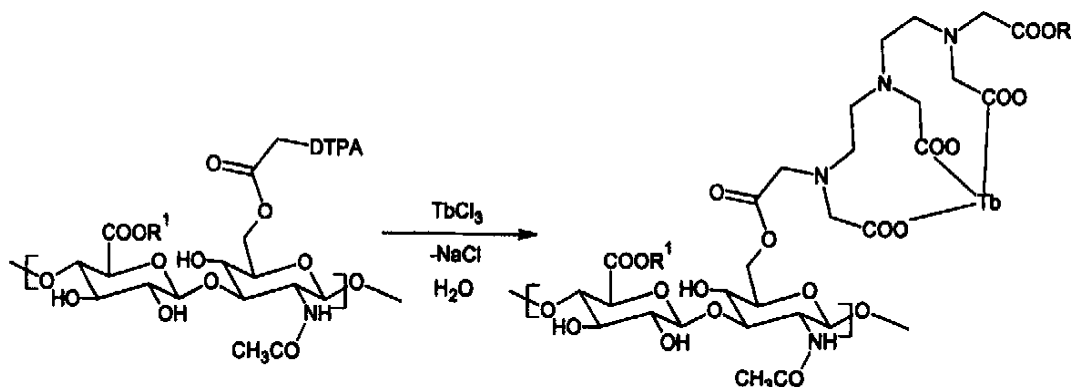
Schéma 7

Do roztoku HA-DTPA (modifikované kyseliny hyaluronové z příkladu 5) (stupeň substituce 6 % mol, počítáno na dimer kyseliny hyaluronové, 1 g) ve vodě (100 ml) byl přidán 1% roztok EuCl_3 (40 mg EuCl_3 , 0,04 eq ve vodě) a směs byla míchána 1 h při teplotě místnosti. Výsledný roztok byl pak dialyzován oproti 1 litru destilované vody, přičemž v oddialyzovaném roztoku po odpaření solventu nebyla zjištěna přítomnost europia pomocí chelatačního barviva xylenolové oranže v acetátovém pufru. Z této skutečnosti a z faktu, že takto lze detekovat koncentraci Eu v 10^{-3} g/ml, je možné usoudit, že víc než 95 % přidaného europia bylo vázáno v HA-DTPA.

10

Příklad 11

Příprava komplexů HA-DTPA-Tb



R = Na, H, HA

R¹ = Na, H

15

Schéma 8

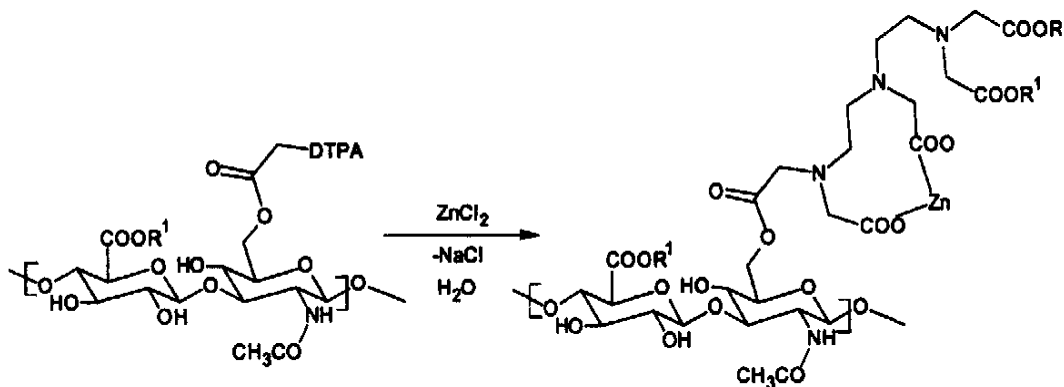
Do roztoku HA-DTPA (modifikované kyseliny hyaluronové z příkladu 5) (stupeň substituce 6 % mol, počítáno na dimer kyseliny hyaluronové, 1 g) ve vodě (100 ml) byl přidán 1% roztok TbCl_3 (40 mg TbCl_3 , 0,04 eq ve vodě) a směs byla míchána 1 h při teplotě místnosti. Výsledný roztok byl pak dialyzován oproti 1 litru destilované vody, přičemž v oddialyzovaném roztoku po odpaření solventu nebyla zjištěna přítomnost therbia pomocí chelatačního barviva xylenolové oranže v acetátovém pufru. Z této skutečnosti a z faktu, že takto lze detekovat koncentraci Tb v 10^{-3} g/ml, je možné usoudit, že víc než 95 % přidaného therbia bylo vázáno v HA-DTPA.

25

Příklad 12

Příprava komplexů HA-DTPA-Zn

5



R = Na, H, HA
R¹ = Na, H

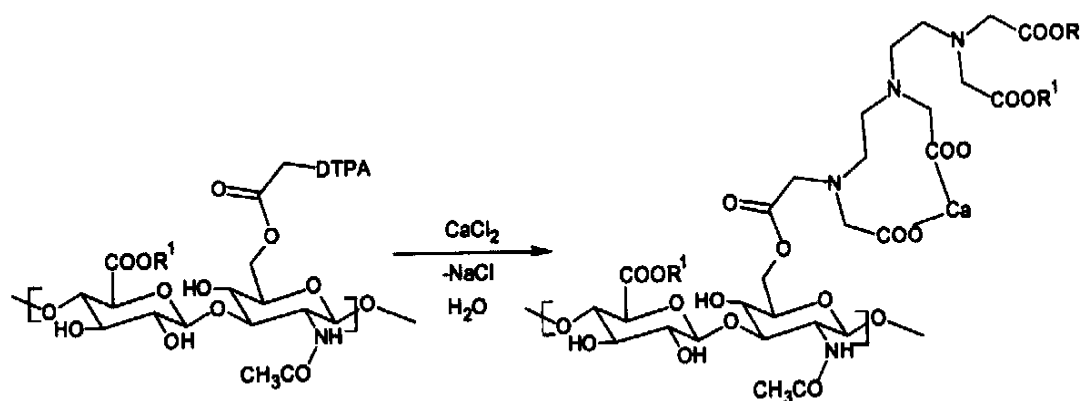
Schéma 9

10 Do roztoku HA-DTPA (modifikované kyseliny hyaluronové z příkladu 5) (stupeň substituce
6 % mol, počítáno na dimer kyseliny hyaluronové, 1 g) ve vodě (100 ml) byl přidán 1% roztok
ZnCl₂ (0,04 eq) ve vodě a směs byla míchána 1 h při teplotě místnosti. Výsledný roztok byl pak
dialyzován oproti 1 litru destilované vody, přičemž v oddialyzovaném roztoku po odpaření sol-
15 ventu nebyla zjištěna přítomnost zinku pomocí chelatačního barviva xylenolové oranže v acetát-
ovém pufru. Z této skutečnosti a z faktu, že takto lze detekovat koncentraci Zn v 10⁻⁴ mg/ml, je
možné usoudit, že víc než 97 % přidaného zinku bylo vázáno v HA-DTPA.

Příklad 13

Příprava komplexů HA-DTPA-Ca

20



R = Na, H, HA
R¹ = Na, H

Schéma 10

25

Do roztoku HA-DTPA (0,1 g, stupeň substituce 30 % mol, počítáno na dimer hyaluronové kyseliny, derivát z příkladu 4) v 10 ml vody byl přidán roztok CaCl₂ (0,3 eq) ve vodě (2 ml) a směs

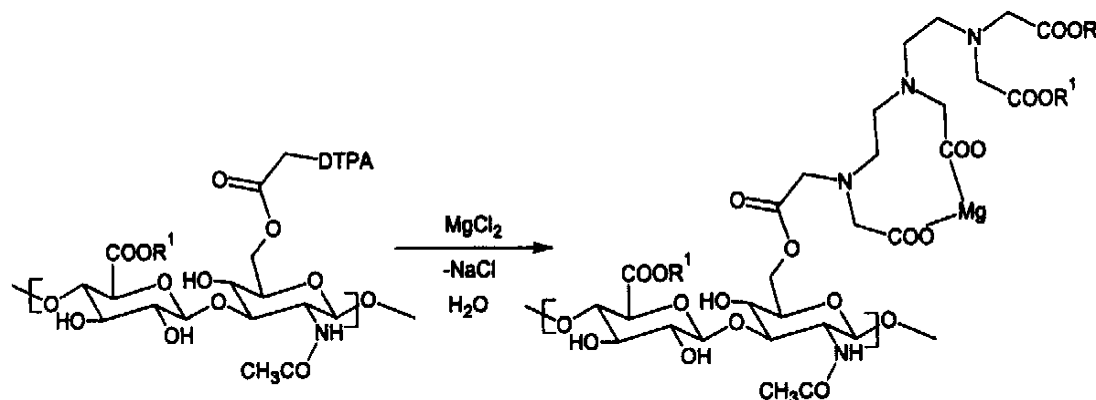
byla míchána 1 h při teplotě místnosti. Reakční směs byla pak zředěna na 300 ml dialyzována oproti 7 krát 1 l destilované vody. Výsledný roztok byl lyofilizován za vzniku 110 mg produktu.

IR 1739 cm^{-1} , ^1H NMR (měřeno po přidání 0,02 ml 20% aq NaOD) DTPA (δ 2,4 4H, 2,7 4H, 3,15 2H, 3,30 6H) ^{13}C NMR DTPA (δ 64,4, 62,6, 58,5, 57,9 ppm).

ICP 3,1% Ca.

10 Příklad 14

Příprava komplexů HA-DTPA-Mg



R = Na, H, HA

R¹ = Na, H

15

Schéma 11

Do roztoku HA-DTPA (0,1 g, stupeň substituce 30 % mol, počítáno na dimer hyaluronové kyseliny, derivát z příkladu 4) v 10 ml vody byl přidán roztok MgCl_2 (0,3 eq) ve vodě (2 ml) a směs byla míchána 1 h při teplotě místnosti. Reakční směs byla pak zředěna na 300 ml dialyzována oproti 7 krát 1 l destilované vody. Výsledný roztok byl lyofilizován za vzniku 110 mg produktu.

20

IR 1739 cm^{-1} , ^1H NMR (měřeno po přidání 0,02 ml 20% aq NaOD) DTPA (δ 2,4 4H, 2,7 4H, 3,15 2H, 3,30 6H) ^{13}C NMR DTPA (δ 64,4, 62,6, 58,5, 57,9 ppm).

25

ICP 2,3% Mg.

30 Příklad 15

30

Alkylace HA-DTPA-HA s alkylhalogenidy

Síťovaná forma kyseliny hyaluronové HA-DTPA (100 mg, derivát z příkladu 1) byla rozpuštěna ve vodě na 1% roztok a DMSO bylo přidáváno až do vzniku jemného zákalu při teplotě místnosti. Do směsi přidán nasycený vodný roztok NaHCO_3 (2 eq), hexylbromid (2 eq) a roztok byl zahříván na 60 °C 48 h. Po ochlazení ledovou vodou byl přidán nasycený vodný roztok Na_2CO_3 (5 eq), směs se míchala 30 min a pak byla zředěna destilovanou vodou na 150 ml, dialyzována oproti 5 litrům destilované vody (opakováno 7 krát). Výsledný roztok byl lyofilizován za vzniku 90 mg produktu.

40

IR 1738 cm^{-1} , $^1\text{H NMR}$ hexyl (δ 0,85 3H, 1,3 4H, 1,35 2H, 1,70 2H, 4,25 2H)

Příklad 16

5

Alkylace HA-DTPA-HA s alkyltosyláty

10 Sítovaná forma kyseliny hyaluronové HA-DTPA (100 mg, derivát z příkladu 1) byla rozpuštěna ve vodě na 0,5% roztok. Do směsi přidán nasycený vodný roztok NaHCO_3 (2 eq), hexyl tosylát (2 eq) a roztok byl zahříván na 60 °C 48 h. Po ochlazení ledovou vodou byl přidán nasycený vodný roztok Na_2CO_3 (5 eq), směs se míchala 30 min a pak byla zředěna destilovanou vodou na 150 ml, dialyzována oproti 5 litrům destilované vody (opakováno 7 krát). Výsledný roztok byl lyofilizován za vzniku 90 mg produktu.

15 IR 1737 cm^{-1} , $^1\text{H NMR}$ hexyl (δ 0,86 3H, 1,3 4H, 1,35 2H, 1,70 2H, 4,27 2H).

20

PATENTOVÉ NÁROKY

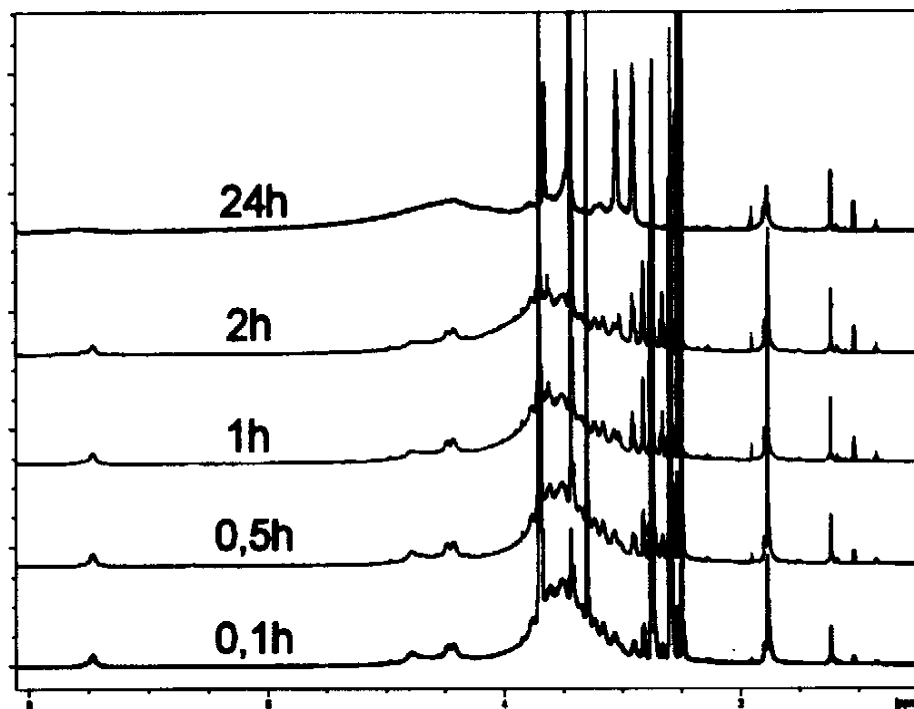
1. Způsob přípravy derivátů kyseliny hyaluronové reakcí kyseliny hyaluronové s anhydridem karboxylové kyseliny, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že se kyselina hyaluronová rozpustí ve slabě kyselém až neutrálním polárním aprotickém rozpouštědle, přidá se anhydrid karboxylové kyseliny při teplotě v rozmezí od 15 °C do 70 °C a směs se míchá po dobu 1 až 150 hodin, přičemž anhydrid karboxylové kyseliny je protonizovaný pomocí kyseliny hyaluronové na protonizovaný bis anhydrid diethylen-triaminpentaoctové kyseliny.
2. Způsob přípravy podle nároku 1, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že kyselina hyaluronová je ve formě volné kyseliny.
3. Způsob přípravy podle nároku 1, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že kyselina hyaluronová má molekulovou hmotnost v rozsahu $1 \cdot 10^4$ až $5 \cdot 10^6$ $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$ a polydisperzitu v rozsahu 1,02 až 5,0.
4. Způsob přípravy podle nároku 1, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že slabě kyselé až neutrální polární aprotické rozpouštědlo je vybráno ze skupiny zahrnující DMSO, sulfolan nebo dialkylsulfony.
5. Způsob přípravy podle nároku 1, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že reakce kyseliny hyaluronové s protonizovaným bis anhydridem diethylentriaminpentaoctové kyseliny probíhá při teplotě 60 °C po dobu 24 hodin.
6. Použití derivátu získaného způsobem podle nároku 1 pro přípravu komplexu derivátu kyseliny hyaluronové s navázanou diethylentriaminpentaoctovou kyselinou s atomy kovů, kde derivát reaguje s halogenidem nebo acetátem kovu v prostředí vody a/nebo polárního aprotického rozpouštědla.
7. Použití podle nároku 6, kde atomy kovů jsou kovy alkalických zemin Ca, Mg nebo přechodné kovy Fe, Gd, In, Zn, Eu, Tb a rozpouštědlo je vybráno ze skupiny zahrnující DMSO, sulfolan nebo dialkylsulfony.

8. Použití derivátu získaného způsobem podle nároku 1 pro hydrofobizaci derivátu kyseliny hyaluronové s navázanou diethylentriaminpentaoctovou kyselinou pomocí alkylačních činidel, kde derivát reaguje s mono, bis anebo tris funkčním alkylačním činidlem obecného vzorce R-X obsahujícím jednu až tři skupiny X, kde R je alkylový lineární nebo rozvětvený řetězec C₁ až C₃₀, volitelně s obsahem aromatických nebo heteroaromatických skupin, a kde X je halogen nebo skupina -O-SO₂-R, v prostředí vody a/nebo polárního aprotického rozpouštědla a báze, při teplotě 15 °C až 70 °C po dobu 1 až 150 hodin.
9. Použití podle nároku 8, kde báze je vybrána ze skupiny zahrnující anorganické sloučeniny obecného vzorce MHCO₃, M₂CO₃, MF, kde M je alkalický kov, nebo dusíkaté organické sloučeniny obecného vzorce R₃N, kde R je alkylový, lineární nebo rozvětvený řetězec C₁ až C₃₀ volitelně s obsahem aromatických nebo heteroaromatických skupin, a rozpouštědlo je vybráno ze skupiny zahrnující DMSO, sulfolan nebo dialkylsulfony.

15

1 výkres

20



Obr. 1 Změny v ¹H NMR spektru směsi kyseliny hyaluronové a DTPA bis anhydridu v DMSO v čase 0,1h až 24h

Konec dokumentu
