

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **037766**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.05.19

(21) Номер заявки
201990977

(22) Дата подачи заявки
2017.11.13

(51) Int. Cl. **C08B 37/08** (2006.01)
A61K 47/36 (2006.01)
A61K 31/727 (2006.01)

(54) **СУЛЬФАТИРОВАННЫЕ ГИАЛУРОНОВЫЕ КИСЛОТЫ,
ФУНКЦИОНАЛИЗИРОВАННЫЕ ДОФАМИНОМ**

(31) **102016000117042**

(32) **2016.11.18**

(33) **IT**

(43) **2019.11.29**

(86) **PCT/IB2017/057070**

(87) **WO 2018/092013 2018.05.24**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ФИДИЯ ФАРМАЧЕУТИЧИ С.П.А.
(IT)**

(72) Изобретатель:
**Гуаризе Кристиан, Плуца Стефано,
Галессо Девис (IT)**

(74) Представитель:
**Поликарпов А.В., Соколова М.В.,
Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнагьев
А.В. (RU)**

(56) ANA I. NETO ET AL.: "Nanostructured Polymeric Coatings Based on Chitosan and Dopamine-Modified Hyaluronic Acid for Biomedical Applications", *SMALL*, vol. 10, no. 12, 1 June 2014 (2014-06-01), pages 2459-2469, XP055376688, DE, ISSN: 1613-6810, DOI: 10.1002/smll.201303568, the whole document

YUHAN LEE ET AL.: "Thermo-sensitive, injectable, and tissue adhesive sol-gel transition

hyaluronic acid/pluronic composite hydrogels prepared from bio-inspired catechol-thiol reaction", *SOFT MATTER*, vol. 6, no. 5, 1 January 2010 (2010-01-01), page 977, XP055376863, GB, ISSN: 1744-683X, DOI: 10.1039/b919944f, the whole document

MAGNANI A. ET AL.: "HYALURONIC ACID AND SULFATED HYALURONIC ACID IN AQUEOUS SOLUTION: EFFECT OF THE SULFATION ON THE PROTONATION AND COMPLEX FORMATION WITH CU²⁺ AND ZN²⁺ IONS", *MACROMOLECULAR CHEMISTRY AND PHYSICS*, WILEY-VCH VERLAG, WEINHEIM, DE, vol. 200, no. 9, 1 September 1999 (1999-09-01), pages 2003-2014, XP000866771, ISSN: 1022-1352, DOI: 10.1002/(SICI)1521-3935(19990901)200:9<2003::AID-MACP2003>3.0.CO;2-W, the whole document

SATOH T. ET AL.: "THE BASIC RESEARCH ON PHYSIOLOGICAL PROPERTY OF FUNCTIONALIZED HYALURONAN-I. EFFECT OF HYALURONAN AND SULFATED HYALURONAN ON CELL PROLIFERATION OF HUMAN EPIDERMAL KERATINOCYTES", *POLYMERS FOR ADVANCED TECHNOLOGIES*, WILEY & SONS, BOGNOR REGIS, GB, vol. 15, no. 6, 1 June 2004 (2004-06-01), pages 329-334, XP001226876, ISSN: 1042-7147, DOI: 10.1002/PAT.468, the whole document
WO-A1-2010130468

(57) Раскрыта сульфатированная гиалуроновая кислота степени сульфатирования 2, имеющая от 2 до 60 мол.%, предпочтительно от 15 до 35% и еще более предпочтительно от 20 до 25% карбоксильных групп, функционализированных дофамином, конъюгированным непосредственно через амидную связь или посредством спейсера, имеющего аминогруппу для образования амидной связи с карбоксильными группами гиалуроновой кислоты и карбоксильную группу для образования амидной связи с аминогруппой дофамина

037766 B1

037766 B1

Изобретение относится к сульфатированным гиалуроновым кислотам, функционализированным дофамином посредством амидных связей, которые могут быть прямыми или образованными через подходящую спейсерную группу. Соединения по изобретению образуют соли с лекарственными средствами, имеющими ионизируемые группы с положительными зарядами, в частности с антибиотиками. Дополнительный объект изобретения представляет собой указанные соли и их применение для покрытия титановых эндопротезов, имплантируемых в живые организмы, или биомедицинских устройств в целом.

Предшествующий уровень техники

Гиалуроновая кислота (НА) представляет собой гетерополисахарид, состоящий из чередующихся остатков D-глюкуроновой кислоты и N-ацетил-D-глюкозамина, с прямой цепью, имеющий молекулярную массу в диапазоне от 50000 до 13×10^6 Да в зависимости от источника, из которого он получен, и применяемых методов получения.

Гиалуроновая кислота присутствует практически повсеместно в организме человека, где она играет важную роль, особенно в качестве механической поддержки для клеток многих тканей, таких как кожа, сухожилия, мышцы и хрящ. Также известно, что НА взаимодействует со своим мембранным рецептором CD44 и опиоидными рецепторами.

Известны O-сульфатированные производные НА, где группы -ОН этерифицированы серной кислотой. O-сульфатирование может быть выполнено известными методиками (см., например, EP 702699 и EP 940410); термин "степень сульфатирования" означает число молей сульфатных групп на моль димера НА (DSmol), в частности:

сульфатирование 1 степени обозначает DSmol в диапазоне от 0,5 до 1,5;

сульфатирование 2 степени обозначает DSmol в диапазоне от 1,5 до 2,5;

сульфатирование 3 степени обозначает DSmol в диапазоне от 2,5 и 3,5.

В общем HAS (сульфатированная гиалуроновая кислота) легко проходит через кожный барьер, таким образом облегчая проникновение ассоциированных с ней веществ, и, следовательно, представляет собой превосходный носитель для кожного всасывания фармакологически и биологически активных молекул.

Также было обнаружено (WO 2010130468; WO 2010130466), что HAS обладает фармакологическими свойствами: она представляет собой мощный противовоспалительный агент, который осуществляет свое действие посредством эффективной модуляции активностей множества про- и противовоспалительных цитокинов. Следовательно, HAS подходит для использования в лечении расстройств, опосредуемых изменением уровней цитокинов (ревматоидный артрит, астма, системные и кожные аутоиммунные заболевания, вирусные инфекции, атопический дерматит, экзема, витилиго, лимфомы и так далее).

DOPA (1-3,4-дигидроксифенилаланин), аминокислотное промежуточное соединение в синтезе дофамина, представляет собой известный нейротрансмиттер и также недавно был исследован как адгезивное вещество. В значительной концентрации остатки DOPA были обнаружены в аминокислотном составе белков, называемых "пищевые белки *Mytilus edulis*" ("*Mytilus edulis* foot proteins", Mefp, в частности Mefp-3 и Mefp-5), которые составляют ножку, с помощью которой *Mytilus edulis*, общеизвестный как мидия, прикрепляется к поверхностям. Ключевое свойство DOPA представляет собой наличие катехоловой группы; это позволяет предположить, что высокая концентрация катехоловых единиц играет ключевую роль в стимуляции адгезии ко многим поверхностям, включая стекло, пластик, керамику и поверхности на основе металлов и оксидов металлов. Хотя механизм, посредством которого происходит указанная адгезия, пока не полностью понятен, известно, что адгезия происходит как в кислой среде (pH равен 5), так и в щелочной среде (pH равен 8), когда катехоловые группы принимают форму хинонов. Поскольку производное дофамина также обладает идентичными свойствами, DOPA и дофамин определены и используются в научной литературе в равной степени с точки зрения адгезивной активности.

НА, и в том виде "как она есть", и в ее сульфатированной форме, использовали в комбинации с другими полимерами в покрытии металла (обычно титана) и полимерных (например PU (полиуретановых)) протезов для обеспечения био- и гемосовместимости (EP 1060204).

DOPA уже использовали в качестве адгезива для стимуляции связывания с другими молекулами (обычно полимерами), имеющими металлический кор (Lee et al., Adv Mat, 2008, 20, 4154-4157).

Наконец, имеются примеры, где металлический протез покрыт DOPA, конъюгированным с полимером, который, в свою очередь, может быть связан с антибиотиком, что таким образом уменьшает вероятность размножения бактерий. Например, Lee et al. (Bone, 2012, 50, 974-982) описывает DOPA, конъюгированный с гепарином и дополнительно функционализированный антибиотиком и BMP 2 (морфогенетический белок кости 2), для стимуляции остеointеграции титановых зубных протезов. Гепарин выбран, потому что он содержит сульфатные группы, которые делают конъюгат в целом отрицательно заряженным и, следовательно, способным присоединяться к положительно заряженному антибиотику. Однако присутствие гепарина является спорным, поскольку его хорошо известная антикоагулянтная активность может представлять проблему и вызывать аномальное кровотечение во время и после имплантации.

Описание изобретения

В настоящее время было обнаружено, что конъюгаты сульфатированной гиалуроновой кислоты (HAS) и дофамина могут благоприятным образом быть использованы для адсорбции положительно за-

ряженных биологически и/или фармакологически активных антибиотика или молекулы путем электростатического взаимодействия. Конъюгаты HAS и дофамина, функционализированные лекарственными средствами или другими активными соединениями, являются полезными для покрытия биомедицинских изделий в целом и титанового протеза в частности, для того чтобы сделать их биосовместимыми и, особенно в случае титанового протеза, для улучшения их интеграции в костный матрикс, в который они трансплантированы. Было подтверждено, что конъюгаты сульфатированной гиалуроновой кислоты (HAS) и дофамина, описанные здесь, особенно эффективны, когда их используют либо с классическими титановыми протезами, которые имеют компактную структуру, либо с протезами последнего поколения, которые имеют пористую (трабекулярную) поперечношпигнутую структуру, идеально интегрируемую в кость. После имплантации трабекулярный протез, обработанный конъюгатами, описанными здесь, является не только биосовместимым, но благодаря своей особенной структуре, также колонизируется клетками и идеально интегрируется в кость.

Конъюгаты сульфатированной гиалуроновой кислоты (HAS) и дофамина, составляющие объект данного изобретения, также играют ведущую роль в уменьшении возможных инфекций, связанных с имплантатом. Этот последний аспект является особенно важным, потому что бактериальный рост и последующее образование биопленки представляет собой основную трудность не столько на стадии первичной имплантации искусственного колена, тазобедренного сустава и так далее, как после первого осмотра протеза, приводящую к необходимости его удаления в 5-40% случаев. По имеющимся оценкам примерно 80% инфекций, приводящих к удалению протеза, является следствием образования бактериальной биопленки.

Биопленка представляет собой скопление микроорганизмов (*Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* и им подобных) с высокой плотностью бактерий, инкапсулированных в полисахаридном матриксе и прикрепившихся к твердой биологической или небиологической поверхности, обычно резистентное к системному лечению антибиотиками.

Сульфатированная гиалуроновая кислота, используемая согласно изобретению, имеет 2 степень сульфатирования (HAS2), а именно HAS, где количество молей сульфатных групп на моль димера HA (DSmol) находится в диапазоне от 1,5 до 2,5.

Процент функционализации карбоксильных групп HAS2 дофамином, присоединенным непосредственно или через спейсер, варьирует от 2 до 60 мол.% как для прямой, так и для не прямой связи, предпочтительно он варьирует от 15 до 40% и еще более предпочтительно от 20 до 32% для прямой связи, в то время как для не прямой связи он предпочтительно варьирует от 2 до 20%.

Связь между дофамином и HAS2 является связью амидного типа и может быть прямой (COOH HA - NH₂ дофамина), как показано на схеме А, или не прямой, когда спейсер вставлен между дофамином и HAS, всегда присоединенной через амидную связь, для достижения максимального взаимодействия дофамина с титановой поверхностью, которая подлежит функционализации, тем самым уменьшая пространственный эффект HAS2. Используемый спейсер может представлять собой алкильную цепь длиной в диапазоне от 5 до 10 метиленовых единиц, предпочтительно от 5 до 10 (схема В), или цепь полиэтиленгликоля формулы HOOC-(CH₂)_n-O-[(CH₂)₂-O]_m-(CH₂)₂-NH₂ (схема С).

Схема А

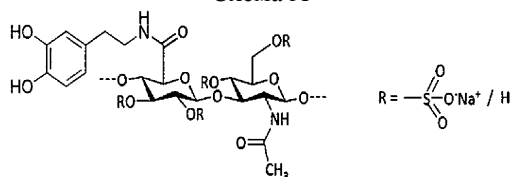


Схема В

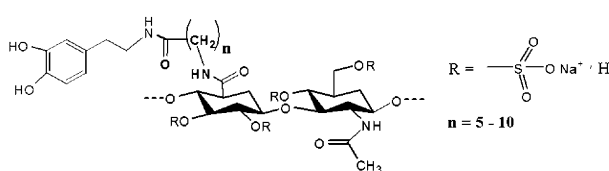
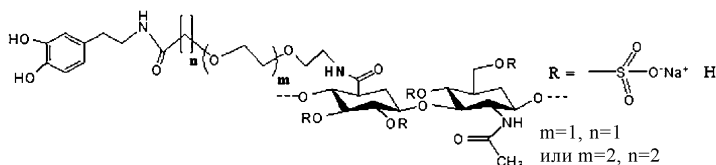


Схема С



Следовательно, спейсер имеет аминогруппу для образования амидной связи с карбоксильными группами гиалуроновой кислоты и карбоксильную группу для образования амидной связи с аминогруппой дофамина

Спейсерные соединения, подходящие для использования в получении сульфатированных гиалуро-

новых кислот 2 степени сульфатирования согласно изобретению имеют следующие формулы:

$\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_n-\text{NH}_2$, где n представляет собой целое число от 5 до 10 и предпочтительно 5 или 10,

$\text{HOOC}-\text{CH}_2-(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_m-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$, где m равен 1 или 2

Указанные соединения известны или могут быть получены известными способами.

Реакция между HAS2 и дофамином происходит в известных условиях для образования амидных связей, например, в присутствии конденсирующих агентов, таких как карбонилдиимидазол (CDI) или диимиды.

Для получения производных, где дофамин присоединен через спейсер к сульфатированной гиалуроновой кислоте, предпочтительно сначала синтезировать промежуточное соединение дофамин-спейсер и затем конъюгировать это промежуточное соединение с HAS2. Спейсер, аминогруппа которого защищена подходящим образом, может быть приведен во взаимодействие с гидрохлоридом дофамина в присутствии традиционных конденсирующих агентов и оснований. Полученное в результате промежуточное соединение после удаления защитной группы затем приводят во взаимодействие с HAS2 в условиях, описанных выше для образования амидных связей.

Исходная гиалуроновая кислота может быть получена из любого известного источника, например путем экстракции из петушиных гребней (EP 138572), ферментации или биосинтеза (из *Bacillus*, WO 2012032154); в этом конкретном случае используют HAS степени сульфатирования 2, полученную из HA со средневзвешенной MW (молекулярной массой) в диапазоне от 100000 до 250000 Да, в частности от 180000 до 230000 Да, здесь и далее обозначаемой "MW 200 кДа". Получение проводили известными способами (EP 0702699; IT 102015000073016), и оно изложено в примерах.

Термин "средняя молекулярная масса" (MW) здесь обозначает средневзвешенную MW, рассчитанную по методу "внутренней вязкости" (Terbojevich et al., *Carbohydr. Res.*, 1986, 363-377).

Соединения по изобретению можно использовать в качестве носителей лекарственных средств и для покрытия эндопротезов.

Имплантируемые протезы, изготовленные главным образом из металла на основе титана, с компактной или трабекулярной структурой покрывают просто путем распыления раствора соединений по изобретению на протез, возможно с последующим распылением раствора антибиотиков или биологически или фармакологически активных веществ, подходящим образом обработанных так, чтобы иметь положительный заряд, таких как факторы роста (BMP-2; TGF (трансформирующий фактор роста) 1 β ; IGF (инсулиноподобный фактор роста) или искусственно синтезированные молекулы, ингибирующее действие которых в отношении образования биопленки уже известно (такие как диклофенак в кислотной форме).

Применимые антибиотики представляют собой такие, которые могут заряжаться положительно, в частности гентамицин, даптомицин, ванкомицин, цiproфлоксацин, меропенем, амикацин, тобрамицин, полимиксин, колистин и бацитрацин, предпочтительно гентамицин, колистин и даптомицин.

Указанные антибиотики образуют соли с сульфатированными гиалуроновыми кислотами степени сульфатирования 2, функционализированными дофамином. Указанные соли и протезы, на которых они адсорбированы, представляют дополнительный объект настоящего изобретения.

Соединение HAS2-дофамин по настоящему изобретению имеет следующие преимущества перед данным уровнем техники: оно распыляемое. В то время как в уровне техники требуется, чтобы протез был погружен, иногда в течение длительных периодов времени (часов), в раствор, содержащий "адгезивный" полимер, настоящее изобретение применяют путем простого распыления, даже непосредственно в операционной, обеспечивая ровное гомогенное покрытие, общее поддержание стерильности, и прежде всего, значительное уменьшение или даже исключение времени адгезии и высушивания перед имплантацией протеза;

оно идеально прикрепляется к металлическому протезу;

оно является биосовместимым;

оно сохраняет шероховатость поверхности протеза, требуемую для стимуляции интеграции в костный матрикс;

оно допускает стерилизацию общеизвестными методами (облучение бета-или гамма-лучами) и после стерилизации сохраняет свои структурные характеристики интактными (не происходит окислительного разрушения дофамина) и, следовательно, после конъюгации с антибиотиком также поддерживает свою биологическую эффективность (неизменную антибактериальную активность). Это означает, что при необходимости протез, предназначенный для имплантации, может быть покрыт HAS2-DOPA, стерилизован, помещен на хранение задолго до его использования в операционной и распылен с антибиотиком во время использования, в этом случае нет необходимости ждать завершения времени адгезии и высушивания протеза в операционной, что особенно важно в случае длительных операций;

оно стимулирует регенерацию остеообластов;

оно создает набор отрицательных зарядов, подходящий для электростатического взаимодействия с положительно заряженными антибиотиками (или активными молекулами в целом). Таким образом, возникновение инфекций значительно сокращается, поскольку образование бактериальной биопленки исключено или сильно ограничено;

оно практически не оказывает гепариноподобного эффекта, хотя оно содержит сульфатные группы, и следовательно не вызывает аномального кровотечения, оно действует исключительно эффективным, быстрым, продолжительным образом.

Краткое описание графических материалов

Фиг. 1: Изображение поверхности необработанного титанового цилиндра, полученное с помощью ESEM (экологический сканирующий электронный микроскоп), и соответствующий спектр XPS (рентгеновская фотоэлектронная спектроскопия) выделенных зон.

Фиг. 2: Изображение поверхности титанового цилиндра, покрытого производным из примера 3, полученное с помощью ESEM, и соответствующий спектр выделенных зон, полученный с помощью XPS.

Фиг. 3: Изображение поверхности цилиндра, обработанного производным из примера 3 и затем промытого, полученное с помощью ESEM.

Фиг. 4: Кривые, показывающие ингибирование роста *S. aureus* на титановых цилиндрах, функционализированных HAS2-DOPA из примера 3 или HA-DOPA из примера 12, покрытых гентамицином.

Фиг. 5: Антимикробная активность, выраженная в КОЕ/мл, конъюгата HAS2-DOPA из примера 3 в сравнении с конъюгатом гепарин-DOPA (HEPA-DOPA) из примера 11, связанных с гентамицином.

Фиг. 6: Антикоагулянтный эффект HAS2-DOPA из примера 6 в сравнении с таковым для HEPA-DOPA из примера 11.

Фиг. 7: Действие HAS2-DOPA из примеров 3 и 12 на пролиферацию остеобластов в сравнении с таковым для фибронектина. RFU - относительная единица флуоресценции.

Примеры получения

Конъюгаты сульфатированной гиалуроновой кислоты степени сульфатирования 2 с дофамином (здесь и далее называемой HAS2-DOPA) синтезируют в два этапа:

синтез HAS2 и реакция между HAS2 и дофамином. HAS2, в свою очередь, может быть получена из HA, образовавшей соль с тетрабутиламмонием (ТВА; EP702699) или образовавшей соль с натрием (IT102015000073016).

Пример 1. Получение HAS2 из HA-ТВА

2,0 г сухого вещества (d.m.) ($3,22 \times 10^{-3}$ моль; 1 экв.) HA⁻ ТВА⁺ (MW 200 кДа) растворяли в 200 мл DMSO (диметилсульфоксид). После завершения растворения добавляли 3,59 г P₂O₅ (8 экв.). После инкубации в течение ночи при комнатной температуре продукт осаждали EtOH и полученный осадок отфильтровывали, дважды промывали EtOH и повторно растворяли в 150 мл деионизированной воды; добавляли 8 мл насыщенного раствора NaCl и 115 мл DMSO и pH подвели до $3,4 \pm 0,1$ с использованием 3М NaOH. Продукт осаждали 440 мл EtOH и полученный осадок отфильтровывали, промывали смесью EtOH/H₂O (80:20) и EtOH и, наконец, сушили в вакууме при 37°C.

Пример 2. Получение HAS2 из HA-Na

4,0 г сухого вещества ($9,96 \times 10^{-3}$ моль; 1 экв.) HA⁻ Na⁺ (MW 200 кДа) диспергировали в 220 мл DMSO, добавляли 3,6 мл метансульфоновой кислоты (5 экв.) и смесь оставляли при перемешивании на 24 ч при комнатной температуре. После завершения растворения добавляли 12,8 г P₂O₅ (8 экв.). После инкубации в течение ночи при комнатной температуре продукт осаждали EtOH и полученный осадок отфильтровывали в тигле Гуча, дважды промывали EtOH и повторно растворяли в 150 мл деионизированной воды; добавляли 8 мл насыщенного раствора NaCl и 115 мл DMSO и подвели pH до $3,4 \pm 0,1$ с использованием 3М NaOH. Продукт осаждали 440 мл EtOH и полученный осадок отфильтровывали, промывали смесью EtOH/H₂O (80:20) и EtOH и, наконец, сушили в вакууме при 37°C.

Пример 3. Синтез конъюгата HAS2-DOPA с дериватизацией 23% (прямая связь)

2,0 г сухого вещества ($3,3 \times 10^{-3}$ моль, 1 экв.) натриевой соли HAS2, полученной как в примере 2, растворяли в 100 мл деионизированной воды, и 3,0 г хлорида бензалкония (BA⁺Cl⁻) растворяли отдельно в 100 мл деионизированной воды. После завершения растворения раствор BA⁺Cl⁻ добавляли к раствору HAS2, таким образом получая осадок, который отфильтровывали, промывали H₂O, EtOH и затем ацетоном и сушили в ротормном испарителе в высоком вакууме. Полученный осадок растворяли в 160 мл DMSO, затем добавляли 0,267 г (0,5 экв.) CDI и 0,1 мл метансульфоновой кислоты (0,5 экв.). Через 30 мин перемешивания при 40°C добавляли 0,5 г (0,8 экв.) гидрохлорида дофамина и продолжали реакцию в течение ночи при медленном перемешивании при 40°C. На следующие сутки добавляли 16 мл насыщенного раствора NaCl и продукт осаждали EtOH. Полученный осадок отфильтровывали и промывали 2 объемами смеси, состоящей из EtOH/H₂O (85:15), затем EtOH и, наконец, ацетоном. Полученный в результате продукт растворяли в 50 мл деионизированной H₂O и подвергали диализу (диализная мембрана Spectra/Por® с порогом отсечения, равным 12000-14000 Да) в течение 3 суток в 0,05 М ацетатном буфере с pH 5 и в течение 1 суток в H₂O с pH, доведенным до 5 путем добавления 1 М HCl.

Время диализа регулировали, контролируя исчезновение свободного дофамина в диализной мембране путем GPC (гель-проникающая хроматография). Наконец, диализованный продукт замораживали и лиофилизировали.

Пример 4. Синтез конъюгата HAS2-DOPA с дериватизацией 55% (прямая связь)

Производное синтезировали и характеризовали как описано в примере 3, начиная с 2 г натриевой

соли HAS2, которая образовывала соль с ВА и была подвергнута взаимодействию с 1,34 г (2,5 экв.) CDI и 2,5 г (4,0 экв.) гидрохлорида дофамина.

Пример 5. Синтез конъюгата HAS2-DOPA с дериватизацией 31% (прямая связь)

Производное синтезировали и характеризовали, как описано в примере 3, начиная с 2 г натриевой соли HAS2, которая образовывала соль с ВА и была подвергнута взаимодействию с 0,801 г (1,5 экв.) CDI и 1,25 г (2,0 экв.) гидрохлорида дофамина.

Пример 6. Синтез конъюгата HAS2-DOPA с дериватизацией 21% (прямая связь)

Производное синтезировали и характеризовали, как описано в примере 3, начиная с 2 г натриевой соли HAS2, которая образовывала соль с ВА и была подвергнута взаимодействию с 0,134 г (0,25 экв.) CDI и 0,25 г (0,4 экв.) гидрохлорида дофамина.

Пример 7. Синтез конъюгата HAS2-DOPA с дериватизацией 6% (прямая связь)

Производное синтезировали и характеризовали, как описано в примере 3, начиная с 2 г натриевой соли HAS2, которая образовывала соль с ВА и была подвергнута взаимодействию с 0,067 г (0,125 экв.) CDI и 0,25 г (0,4 экв.) гидрохлорида дофамина.

Пример 8. Синтез конъюгата HAS2-CONH-(CH₂)₁₀-CONH-дофамин с дериватизацией 5% (непрямая связь через алкильный спейсер с 10 атомами углерода)

Образование не прямой связи включает два этапа: синтез соединения дофамин-спейсер с последующим синтезом дофамин-спейсер с HAS2:

8.1: синтез дофамин-спейсер: NH₂-(CH₂)₁₀-CONH-дофамин

0,55 г 11-(Вос-амино)ундекановую кислоту растворяли в 10 мл DMF (диметилформамид) и карбоксильную группу активировали с использованием 0,56 г EDC (гидрохлорид N-этил-N'-(3-диметиламинопропил)карбодиимида), добавляя DMAP (диметиламинопиридин) (0,07 г) в присутствии третичного основания (TEA (триэтанолламин), 0,31 мл) при 0°C при перемешивании. Через 10 мин добавляли 0,4 г гидрохлорида дофамина и смесь оставляли при перемешивании при комнатной температуре на ночь. Затем добавляли 40 мл дихлорметана и 40 мл H₂O и экстрагировали органическую фазу, промывали ее водой и сушили в роторном вакуумном испарителе. Защитную группу ВОС высвобождали путем добавления 5 мл следующей кислотной смеси: TFA (трифторуксусная кислота) 15%/H₂O 5%/DCM (дихлорметан) 80%, оставляя полученную смесь при перемешивании в течение 20 мин при комнатной температуре. Затем растворитель выпаривали и продукт сушили.

8.2: Синтез HAS2-CONH-(CH₂)₁₀-CONH-DOPA

Производное описывали и характеризовали, как описано в примере 3, начиная с 1 г натриевой соли HAS2, которая образовывала соль с ВА и была подвергнута взаимодействию с 0,45 г CDI и 0,5 г NH₂-(CH₂)₁₀-CONH-DOPA, полученного как в примере 8.1.

Пример 9. Синтез конъюгата HAS2-CONH-(CH₂)₅-CONH-дофамин с дериватизацией 5% (непрямая связь через алкильный спейсер с 5 атомами углерода)

Дофамин-спейсер получали путем использования 6-(Вос-амино)капроновой кислоты в качестве реагента и следуя методике, описанной в примере 8.1.

Продукт HAS2-CONH-(CH₂)₅-CONH-дофамин получали согласно методике, описанной в примере 8.2.

Пример 10. Синтез конъюгата HAS2-CONH-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-CH₂-CONH-DOPA с дериватизацией 5% (непрямая связь через полиэтиленгликолевый спейсер).

Образование не прямой связи включает два этапа: синтез соединения DOPA-спейсер с последующим синтезом DOPA-спейсер с HAS2.

Синтез DOPA-спейсер: NH₂-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-CH₂-CONH-DOPA

0,64 г Вос-NH-(PEG)-COOH. DCHA (7 атомов) (DCHA - дициклогексиламин) растворяли в 10 мл DMF и карбоксильную группу активировали с использованием 0,56 г EDC (гидрохлорид N-этил-N'-(3-диметиламинопропил)карбодиимида), добавляя DMAP (0,07 г) в присутствии третичного основания (TEA, 0,31 мл) при 0°C при перемешивании. Через 10 мин добавляли DOPA (гидрохлорид дофамина) и оставляли при перемешивании при КТ на ночь. Затем добавляли 40 мл дихлорметана и 40 мл H₂O и органическую фазу экстрагировали, промывали водой и сушили в роторном испарителе. Защитную группу ВОС освобождали путем добавления 5 мл следующей кислотной смеси: TFA 15%/H₂O 5%/DCM 80%, оставляя при перемешивании в течение 20 мин при КТ. Затем растворитель выпаривали и продукт сушили. Получили 0,5 г продукта (выход 83%).

Синтез HAS2-CONH-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-CH₂-CONH-DOPA

Производное синтезировали как ранее описано для производного HAS₂-DOPA, начиная с 1 г натриевой соли HAS2, которая образовывала соль с ВА и была подвергнута взаимодействию с 0,45 г CDI и 0,5 г NH₂-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-CH₂-CONH-DOPA.

Пример 11 (сравнительный). Синтез конъюгата гепарина (HEPA)-DOPA с дериватизацией 21% (полученного согласно Lee et al., 2012)

1,0 г сухого вещества (3,3×10⁻⁶ моль, 1 экв.) гепарина натрия (HEPA) растворяли в 50 мл деионизованной воды и 1,5 г хлорида бензалкония (BA⁺Cl⁻) растворяли отдельно в 100 мл деионизованной воды. Когда растворение было завершено, раствор BA⁺Cl⁻ добавляли к раствору HEPA, получая таким образом

осадок, который отфильтровывали, промывали H₂O, EtOH и затем ацетоном и сушили в ротормном испарителе в высоком вакууме. Полученный осадок растворяли в 80 мл DMSO и затем добавляли 0,134 г (0,5 экв.) CDI и 0,05 мл метансульфоновой кислоты (0,5 экв.). После перемешивания в течение 30 мин при 40°C добавляли 0,25 г (0,8 экв.) гидрохлорида дофамина и реакцию продолжали в течение ночи при медленном перемешивании при 40°C. На следующие сутки добавляли 8 мл насыщенного раствора NaCl и продукт осаждали EtOH. Полученный осадок отфильтровывали и промывали 2 объемами смеси, состоящей из EtOH/H₂O (85:15), затем EtOH и, наконец, ацетоном. Полученный в результате продукт растворяли в 50 мл деионизованной H₂O и подвергали диализу (диализная мембрана Spectra/Por® с порогом отсечения, равным 3000 Да) в течение 3 суток в 0,05 М ацетатном буфере с pH 5 и 1 суток в H₂O с pH, подведенным до 5 путем добавления 1 М HCl.

Время диализа регулировали, контролируя исчезновение свободного дофамина из диализной мембраны посредством GPC.

Пример 12 (сравнительный). Синтез конъюгата HA-DOPA с дериватизацией 23%

Производное HA-DOPA синтезировали с помощью методики, описанной в примере 3, начиная с 1,32 г (0,0033 моль) натриевой соли HA 200 кДа, которая образовывала соль с BA и была подвергнута взаимодействию с 0,267 г (0,5 экв.) CDI и 0,5 г (0,8 экв.) гидрохлорида дофамина.

Пример 13. Тестирование на адгезию производного HAS2-DOPA

Поскольку дофамин действует как адгезив при различных значениях pH, провели тестирование его способности покрывать конъюгат HAS2-DOPA (полученный как описано в примере 5), растворенный в PBS, при двух наиболее репрезентативных значениях pH, а именно 5 и 8:

Раствор А: 20 мг HAS2-DOPA (31%) в 4 мл 0,1 М MES (метилэтилсульфат) pH 5.

Раствор В: 20 мг HAS2-DOPA (31%) в 4 мл 0,1 М PBS (фосфатно-солевой буферный раствор) pH 8.

Для этого теста использовали флуоресцентный зонд, положительно заряженный при любом pH (сангвинарина гидрохлорид), для стимуляции взаимодействия производного с положительно заряженным антибиотиком при физиологическом pH.

Два титановых цилиндра (d=15 × h=17 мм) равномерно опрыскивали раствором А и раствором В, соответственно, промывали деионизованной водой, сушили в потоке воздуха и погружали в различные сосуды, содержащие раствор сангвинарина в концентрации 0,5 мг/мл в 0,1 М MES, pH 5. Цилиндры оставляли при слабом перемешивании в течение ночи при КТ. На следующие сутки цилиндры снова промывали деионизованной водой, сушили в потоке N₂ и облучали УФ-лампой на 360 нм, проводя визуальный контроль.

По оценке флуоресценции, испускаемой обработанными цилиндрами, было установлено, что производное дофамина при pH 8 (Раствор В) лучше всех прикреплялось к поверхности. Это обнаружение показывает, что раствор В представляет собой идеальное средство для целей воплощения настоящего изобретения.

13.1: Электронно-микроскопический (ESEM) анализ покрытия титановой поверхности

Данный тест установил, что производное HAS2-DOPA, нанесенное путем распыскивания на поверхность цилиндра, не только равномерно прикрепляется к Ti (титан), но и сохраняет шероховатость поверхности, необходимую для стимуляции остеоинтеграции протеза в костный матрикс. Готовили раствор HAS2-DOPA (23%; пример 3) 25 мг/мл в 0,1 М PBS, pH 8, и 1 мл указанного раствора распыскивали на Ti-цилиндр; его оставляли сушиться на воздухе и поверхность исследовали с помощью ESEM, сравнивая ее с поверхностью необработанного цилиндра (фиг. 1 и 2). Качественный анализ XPS (фотоэлектронная рентгеновская спектроскопия, которая определяет присутствие органического вещества на анализируемой поверхности) проводили в дополнение к фотографическому сканированию. Затем обработанный цилиндр промывали, для того чтобы установить, продолжает ли производное оставаться прикрепленным к поверхности даже в ситуации, где, как и после имплантации *in vivo*, оно находится в контакте с потоком физиологических жидкостей (фиг. 3).

На изображении обработанной поверхности ясно видно присутствие материала, подтвержденное анализом XPS. Более того, высушенное производное создает неровности поверхности, которые придают поверхности шероховатую структуру, что является важным параметром в стимулировании интеграции имплантата в костный матрикс.

После отмывки остатки производного были все еще видны на поверхности, подтверждая, что данное производное активно взаимодействует с Ti и продолжает оставаться прикрепленным даже после отмывки.

Это демонстрирует, что конъюгат HAS2-DOPA

превосходно прикрепляется к титановой поверхности, особенно когда получен в растворе с pH равным 8;

также он остается присоединенным к поверхности после отмывки

и придает металлической поверхности шероховатую структуру, необходимую для стимуляции остеоинтеграции протеза.

Пример 14. In vitro тест ингибирования роста бактерий *S. aureus* (титановый цилиндр, функционализированный HAS2-DOPA или HA-DOPA и гентамицином)

Готовили следующее:

раствор HAS2-DOPA (23%, пример 3) в 0,1 М PBS, pH=8;

раствор HA-DOPA (23%, пример 12) в 0,1 М PBS, pH=8;

раствор гентамицина (25 мг/5 мл 0,25 М MES, pH=5,2);

раствор 0,1 М PBS, pH=8 (контроль).

2 титановых цилиндра ($d=15 \times h=17$ мм) опрыскивали раствором HAS2-DOPA, оставляли сушиться на воздухе на 15 мин, опрыскивали раствором гентамицина и снова оставляли сушиться на воздухе на 15 мин.

Идентичную обработку применяли к двум другим титановым цилиндрам такого же размера, которые опрыскивали сначала раствором производного HA-DOPA и затем раствором гентамицина с использованием методик, описанных выше.

Наконец, два других титановых цилиндра идентичного размера опрыскивали раствором PBS и затем раствором гентамицина с использованием методик, описанных выше.

Затем каждый цилиндр (всего 6) погружали один раз в воду MQ на 5 с, оставляли сушиться на воздухе на 15 мин и помещали в культуральный бульон (забуференная пептонная вода: пептон 10,0 г/л, хлорид натрия 5,0 г/л, безводный гидрофосфат натрия 3,6 г/л, фосфат калия 1,5 г/л, Biokar Diagnostics), инокулированный 600000000 КОЕ/мл *Staphylococcus aureus*. Бульон инкубировали при 37°C и в заранее установленные моменты времени (6, 12, 24, 48, 144 ч) отбирали 1 мл супернатанта и разбавляли скалярно 1:10 (в соответствии с ростом бактерий) стерильным солевым раствором для посева на чашку (PCA - стандартный агар: триптон 5,0 г/л, дрожжевой экстракт 2,5 г/л, глюкоза 1,0 г/л, бактериологический агар 12,0 г/л. Произведено Biokar Diagnostics). Затем проводили подсчет КОЕ/мл.

Данные о проценте ингибирования роста бактерий с течением времени в сравнении с исходным инокулятом 600 млн КОЕ/мл *S. aureus* приведены на фиг. 4.

На графике ясно показано, что

HAS2-DOPA действует намного более эффективно, чем контроль (PBS);

это означает, что HAS2-DOPA высвобождает гентамицин контролируемым постоянным во времени образом;

HAS2-DOPA действует в значительно более сильной степени, чем HA-DOPA;

неожиданно, в дополнение к общему антимикробному действию в течение первых 24 ч оказалось, что HAS2-DOPA поддерживает длительное антибактериальное действие в течение вплоть до 144 ч, то есть 7 суток после инокуляции, в то время как HA-DOPA допускает возобновление пролиферации *S. aureus* уже через 48 ч.

Подобный эксперимент проводили с даптомицином в таких же концентрациях, и был получен идентичный профиль активности.

Пример 15. Сравнительный тест: антимикробная активность конъюгата HAS2-DOPA в сравнении с конъюгатом гепарин-DOPA (HEPA-DOPA), связанных с гентамицином.

Конъюгат HAS2-DOPA был получен как в примере 6, а производное HEPA-DOPA как в примере 11 (степень дериватизации 21%).

Два титановых цилиндра ($d=15 \times h=17$ мм) опрыскивали HAS2-DOPA или HEPA-DOPA, соответственно, оба в концентрации 20 мг/мл в PBS с pH 8 и последовательно гентамицином в концентрации 5 мг/мл в MES, pH 5,2. Затем проводили 3 последовательные промывки погружением (5 с) в воде MQ; цель повторных промывок заключается в устранении всего гентамицина, фактически не связанного электростатически с тестируемым соединением. Затем цилиндры вставляли в тестовые пробирки с инокулятом *S. aureus* (600000000 КОЕ/мл); 1 мл супернатанта отбирали в заранее установленные моменты времени и затем разбавляли скалярно 1:10 (в соответствии с ростом бактерий) стерильным солевым раствором для посева на чашки (PCA - стандартный агар: триптон 5,0 г/л, дрожжевой экстракт 2,5 г/л, глюкоза 1,0 г/л, бактериологический агар 12,0 г/л (Biokar Diagnostics). Затем проводили подсчет КОЕ/мл, как показано на фиг. 5.

Результаты показывают, что продукт HAS2-DOPA является значительно более активным в ингибировании пролиферации *S. aureus*, при одинаковой степени дериватизации и концентрации, и что указанная активность сохраняется в течение по меньшей мере 36 ч. Этот результат является особенно существенным, принимая во внимание, что производное HEPA-DOPA прогрессивно и быстро теряет свою антибактериальную активность, становясь равным "Контролю" (который не имеет антибактериальной активности) через 36 ч.

Пример 16. Сравнение антикоагулянтного действия HAS2-DOPA и HEPA-DOPA

Были получены конъюгат HAS2-DOPA из примера 6 и производное HEPA-DOPA из примера 11.

Антикоагулянтное действие оценивали с использованием чистого гепарина в качестве стандарта. Использовали набор (Nurphen BioMed, Biophen Heparin AT+ Ref 221007), в котором применяется колориметрический метод; оценивали фактор свертывания Ха, не входящий в состав комплекса и ингибирован-

ный гепарином или тестируемым полимером. Поглощение при 405 нм прямо пропорционально концентрации свободного фактора Ха и, следовательно, обратно пропорционально гепариноподобной активности тестируемого соединения (фиг. 6).

Очевидно, что антикоагулянтное действие HAS2-DOPA значительно меньше, чем у HEPA-DOPA при одинаковых концентрациях; для получения такого же эффекта (50% уменьшение Abs (поглощение)) с системой HAS2-DOPA необходима концентрация примерно в 50 раз больше. Это означает, что конъюгат HAS2-DOPA обладает более слабым антикоагулянтным действием, чем известные продукты, хотя он содержит сульфатированный полимер, точно так же как гепарин.

Конъюгат HAS2-DOPA, связанный с гентамицином или с подобным антибактериальным средством, является полезным, так как помимо того, что его можно применять путем распыления, его можно использовать через очень короткие промежутки времени, он практически не оказывает гепариноподобного эффекта и, следовательно, не вызывает аномального кровотечения и обладает значительно более эффективным, быстрым, продолжительным действием, чем известные эквиваленты.

Пример 17. Оценка эффекта HAS2-DOPA и HA-DOPA в отношении пролиферации остеобластов *in vitro*

Готовили следующее:

водный раствор HAS2-DOPA (23%, пример 3) 10 мг/мл;

водный раствор HA-DOPA (23%, пример 12) 10 мг/мл;

водный раствор фибронектина 20 мкг/мл (положительный контроль).

Круговую верхнюю поверхность двух 2 титановых цилиндров ($d=15 \times h=17$ мм) опрыскивали раствором HAS2-DOPA и оставляли сушиться на воздухе на 15 мин; идентичную обработку применяли к двум другим титановым цилиндрам идентичного размера, которые опрыскивали раствором HA-DOPA согласно методикам, описанным выше. Наконец, два других титановых цилиндра идентичного размера опрыскивали раствором фибронектина в воде согласно методикам, описанным выше. Фибронектин широко используют в качестве референсного стандарта в экспериментах по исследованию пролиферации клеток *in vitro*, так как он стимулирует адгезию, пролиферацию и миграцию клеток.

Затем каждый цилиндр (всего 6) погружали один раз в воду MilliQ на 5 с, оставляли сушиться на воздухе на 15 мин и вставляли в лунку планшета; затем на поверхность каждого цилиндра наносили 0,10 мл остеобластов (клеточная линия Saos-2 из остеосаркомы) в культуральной среде (McCOY'S 5A плюс 10% FBS (телячья сыворотка крови)) в количестве примерно 50000 клеток/см титана. Клетки инкубировали на титане в течение 4 ч при 37°C (5% CO₂) для обеспечения возможности адгезии, затем добавляли среду до тех пор, пока цилиндры не оказывались погруженными, и продолжали инкубацию в течение ночи в таких же условиях.

Среду удаляли на следующие сутки и цилиндры промывали PBS для удаления не прикрепившихся клеток, затем к каждому цилиндру добавляли равный объем такой же среды с 10% аламаровым синим и цилиндры продолжали инкубировать в течение 24 ч при 37°C (5% CO₂). После инкубации выполняли считывание флуоресценции (возбуждение λ : 530 нм и испускание: 590 нм); интенсивность флуоресценции пропорциональна уровню клеточного метаболизма и, следовательно, числу жизнеспособных остеобластов.

Результаты (фиг. 7) показывают, что при одинаковой степени дериватизации и концентрации HAS2-DOPA обладает очень высокой активностью остеointеграции, почти равной таковой у фибронектина и, неожиданно, почти в два раза больше, чем таковая у HA-DOPA. Эти значения являются статистически значимыми.

"С-" представляет отрицательный контроль, а именно титановый цилиндр "как есть", без посева остеобластов.

Пример 18. Оценка стабильности при стерилизации бета- и гамма-лучами порошка 23% HAS2-DOPA, полученного как в примере 3.

Как описано в примере 3, были приготовлены три образца по 1 г порошка 23% HAS2-DOPA. Образцы подвергали, соответственно:

стерилизации бета-лучами;

стерилизации гамма-лучами;

не подвергали стерилизации (контроль).

Затем образцы анализировали различными известными методами, а именно структурным анализом ¹H-ЯМР (протонная ядерная магнитно-резонансная спектроскопия) после растворения порошка в тяжелой воде (D₂O), анализом IR (инфракрасный диапазон) (в осадке KBr) и, наконец, визуальным анализом в ультрафиолетовом диапазоне (UV-Vis) после растворения в воде.

Результаты анализа подтвердили, что сигналы стерилизованных образцов являются идентичными, и прежде всего, что отсутствует различие между ними и сигналами нестерилизованного контроля. В частности, не наблюдали никаких сигналов, вызванных образованием побочных продуктов (ЯМР и IR-анализ) или сдвигов сигнала поглощения UV-Vis, вызванных, например, окислением дофамина.

Следовательно, полимер HAS2-DOPA является стабильным и совместимым со стерилизацией бета

или гамма-лучами.

Пример 19. In vitro тест ингибирования роста бактерий *S. aureus* на титановом цилиндре, функционализированном HAS2-DOPA и стерилизованном бета-лучами с последующей обработкой ванкомицином

Готовили следующее:

раствор HAS2-DOPA (23%, пример 3), 10 мг/мл в воде;

раствор ванкомицина, 5 мг/мл в воде.

Один титановый цилиндр ($d=15 \times h=17$ мм) (образец А, контроль) не подвергали никакой обработке, в то время как второй титановый цилиндр с такими же размерами (образец В) опрыскивали раствором HAS2-DOPA и оставляли сушиться на воздухе на 15 мин.

Оба цилиндра, подвергнутые стерилизации путем облучения бета-лучами, затем опрыскивали приготовленным раствором ванкомицина и, наконец, оставляли сушиться на воздухе на 15 мин.

Затем оба цилиндра погружали 10 раз в разные растворы воды MQ на 5 с для удаления присутствующего избытка антибиотика и оставляли сушиться на воздухе на 15 мин. Суспензию *Staphylococcus aureus* (200 мкл с О.Д. (оптическая плотность) при 650 нм более 0,5) равномерно распределяли по поверхности агара Мюллера-Хинтона (BD Biosciences) на планшете и каждый из двух титановых цилиндров помещали в центр инокулированной поверхности агара. Планшет инкубировали при 35°C в течение 18 ч и затем измеряли диаметр поверхности, на которой рост бактерий был ингибирован антибиотиком.

Было подтверждено, что образец В, обработанный HAS2-DOPA и стерилизованный, ингибирует рост бактерий значительно более эффективно, чем контрольный образец, который был только стерилизован.

Это означает, что стерилизация не изменяет структуру или свойства HAS2-DOPA, который продолжает оставаться закрепленным на Ti и, следовательно, сохраняет свою способность связываться с ванкомицином и впоследствии высвобождать его.

Подобный эксперимент был проведен с гентамицином в тех же концентрациях и с ванкомицином на поперечно-сшитых титановых образцах в таких же условиях и при таких же концентрациях с получением профиля ингибирования роста бактерий, идентичного тому, как обсуждался выше.

Следовательно, стерилизация бета-лучами

не изменяет адгезию HAS2-DOPA к титану,

не изменяет структурные свойства HAS2-DOPA

и, следовательно, не модифицирует способность HAS2-DOPA связываться с антибиотиком и оказывать желаемое антибактериальное действие.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Сульфатированная гиалуроновая кислота 2 степени сульфатирования, имеющая от 2 до 60 мол.% карбоксильных групп, функционализированных дофамином, конъюгированным или непосредственно через амидную связь, или через спейсер, имеющий аминогруппу для образования амидной связи с карбоксильными группами гиалуроновой кислоты и карбоксильную группу для образования амидной связи с аминогруппой дофамина.

2. Сульфатированная гиалуроновая кислота по п.1, где дофамин непосредственно конъюгирован через амидную связь с 15-40%, предпочтительно 20-32% карбоксильных групп сульфатированной гиалуроновой кислоты.

3. Сульфатированная гиалуроновая кислота по п.1, где дофамин конъюгирован с сульфатированной гиалуроновой кислотой через спейсер, имеющий аминогруппу для образования амидной связи с 2-20% карбоксильных групп сульфатированной гиалуроновой кислоты и карбоксильную группу для образования амидной связи с аминогруппой дофамина.

4. Сульфатированная гиалуроновая кислота по п.3, где спейсер представляет собой соединение формулы $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_n-\text{NH}_2$, где n представляет собой целое число от 5 до 10, предпочтительно 5 или 10.

5. Сульфатированная гиалуроновая кислота по п.3, где спейсер представляет собой соединение формулы $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_n-\text{O}-[(\text{CH}_2)_2-\text{O}]_m-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}_2$, где n равно 1 или 2 и m равно 1 или 2.

6. Сульфатированная гиалуроновая кислота по любому из пп.1-5, полученная путем функционализации сульфатированной гиалуроновой кислоты 2 степени сульфатирования, полученной из гиалуроновой кислоты, имеющей средневзвешенную молекулярную массу от 100000 до 250000 Да, в частности от 180000 до 230000 Да.

7. Соль сульфатированной гиалуроновой кислоты по пп.1-6 с положительно заряженным лекарственным средством.

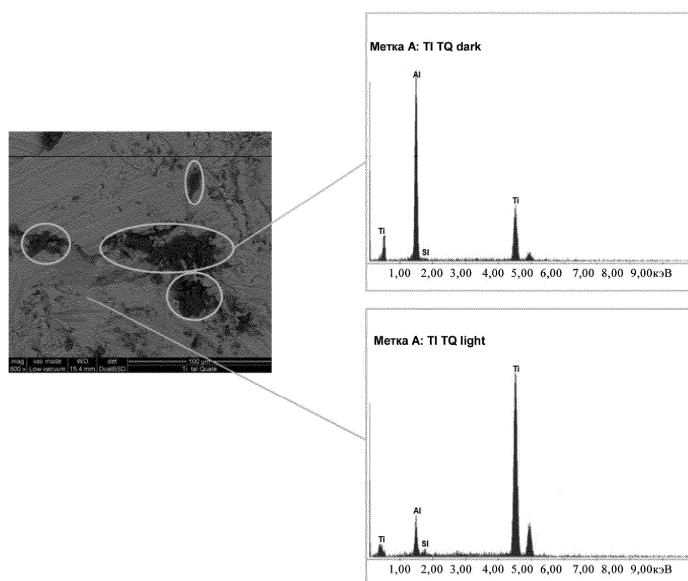
8. Соль по п.7, где положительно заряженное лекарственное средство выбрано из антибиотиков, факторов роста и диклофенака в кислотной форме.

9. Соль по п.8, где положительно заряженное лекарственное средство выбрано из аминогликозидных антибиотиков, даптомицина, ципрофлоксацина, меропенема, ванкомицина, полимиксина, колистина и бацитрацина.

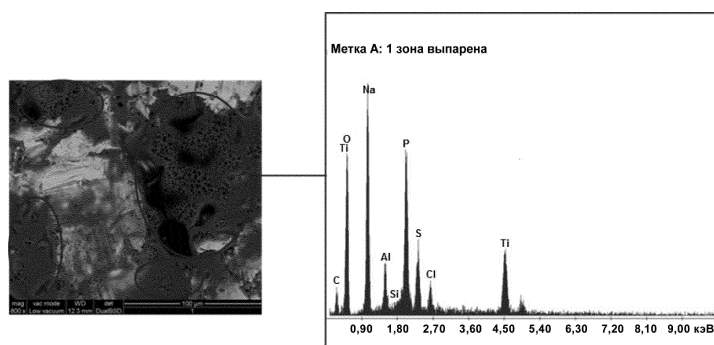
10. Соль по п.9, где аминогликозидные антибиотики выбраны из амикацина, гентамицина и тобрамицина.

11. Применение сульфатированных гиалуроновых кислот по пп.1-6 в покрытии биомедицинских изделий.

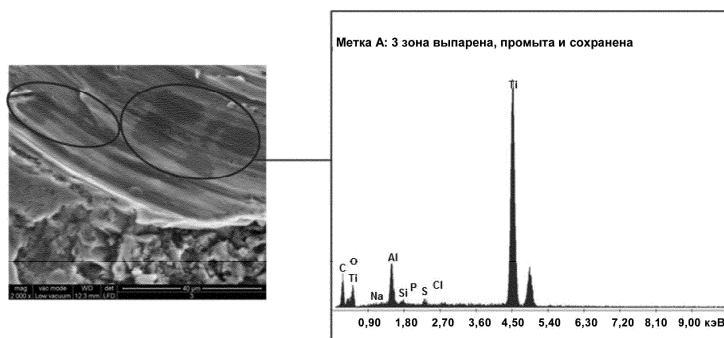
12. Титановые эндопротезы, покрытые солями по пп.7-10.



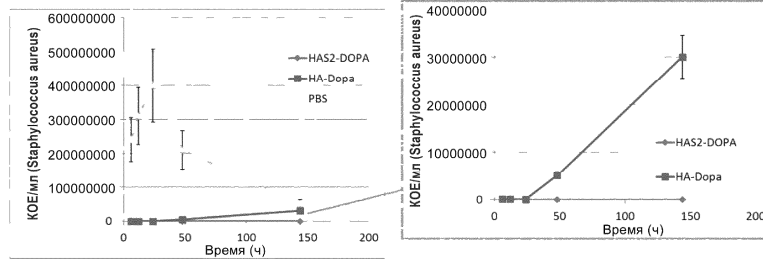
Фиг. 1



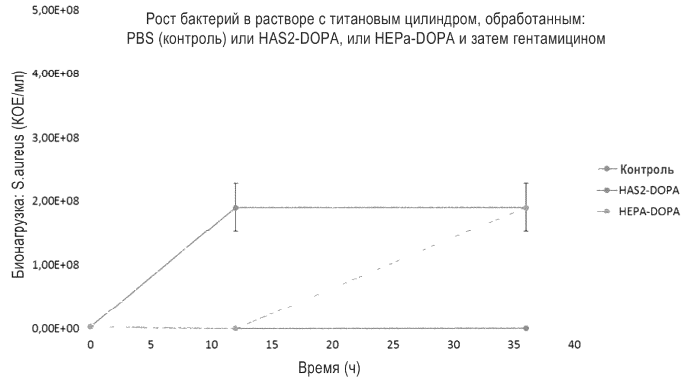
Фиг. 2



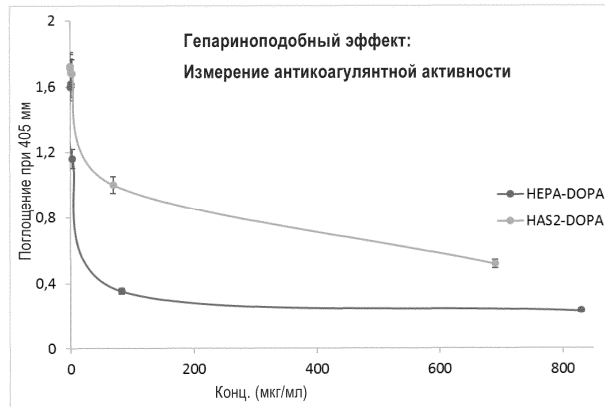
Фиг. 3



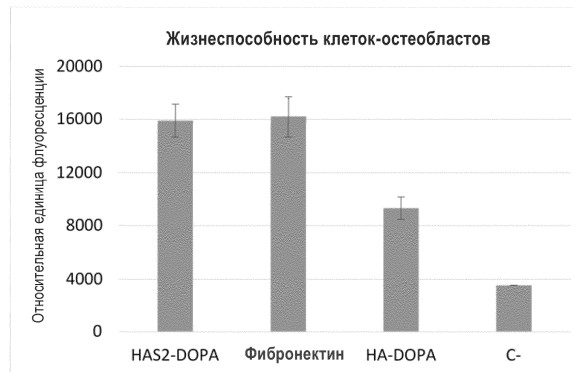
Фиг. 4



Фиг. 5



Фиг. 6



Фиг. 7

