

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(21) Číslo dokumentu:

2012-841

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.:

D01D 5/06 (2006.01)
D01F 9/00 (2006.01)
C08B 37/08 (2006.01)
C08L 5/08 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **27.11.2012**

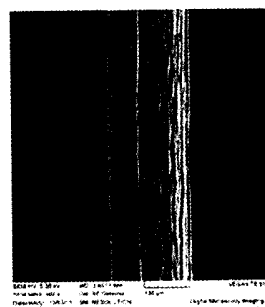
(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **19.02.2014**

(Věstník č. 8/2014)

(71) Přihlašovatel:
Contipro Biotech s.r.o., Dolní Dobrouč, CZ

(72) Původce:
Ščudlová Jolana, Brodek u Konice, CZ
Běťák Jiří, Dolní Újezd, CZ
Wolfová Lucie, Opava, CZ
Buffa Radovan, 06601 Humenné, SK
Šlezingrová Klára, Nekoř, CZ
Klein Pavel, Dolní Dobrouč, CZ
Matějková Ilona, Ústí nad Orlicí, CZ
Bobek Martin, Praha 3, CZ
Pitucha Tomáš, Bílá Třemešná, CZ
Velebný Vladimír, Žamberk, CZ
Šuláková Romana Ing. Ph.D., Ústí nad Orlicí, CZ

(74) Zástupce:
KANIA, SEDLÁK, SMOLA Patentová a
známková kancelář, Mgr. Martina Dvořáková,
Mendlovo nám. 1a, Brno, 60300



(54) Název přihlášky vynálezu:

Vlákna založená na hydrofobizovaném hyaluronanu, způsob jejich přípravy a použití, textilie na jejich bázi a použití

(57) Anotace:

Řešení se týká biodegradabilních vláken, která jsou založena na hydrofobizovaném hyaluronanu, konkrétně na bázi hyaluronanu C₁₁-C₁₈-acylovaného na hydroxylových skupinách kyseliny hyaluronové, a jejich použití. Dále se řešení týká přípravy těchto vláken, která je realizována pomocí metody mokrého zvlákňování v koagulační lázni obsahující vodný roztok organické kyseliny, produktem jsou poté nekonečné monofily, které lze následně zpracovat na nitě a dále na tkaniny, pleteniny či netkané textilie. Tyto tkaniny, pleteniny či netkané textilie jsou použitelné například pro výrobu implantovatelných chirurgických materiálů pro humánní a veterinární medicínu.

CZ 2012 - 841 A3

Vlákna založená na hydrofobizovaném hyaluronanu, způsob jejich přípravy a použití, textilie na jejich bázi a použití

Oblast techniky

- 5 Vynález se týká přípravy biodegradabilních vláken, která jsou založena na hydrofobizovaném hyaluronanu. Příprava vláken je realizována pomocí metody mokrého zvlákňování (wet spinning), produktem jsou poté nekonečné monofily, které lze následně zpracovat na nitě a dále na tkaniny, pleteniny, či netkané textilie. Výsledná vlákna mají vynikající zpracovatelské vlastnosti (pevnost, tažnost).
- 10 Aplikační využití těchto vláken je směřováno do medicíny, zejména do oblasti chirurgických materiálů, tkáňového inženýrství a systémů pro řízení uvolňování léčiv.

Dosavadní stav techniky

- 15 Hyaluronan (HA) je lineární polysacharid složený z opakujících se disacharidických jednotek tvořených kyselinou glukuronovou, která je β -1,3 glykosidickou vazbou spojena s N-acetyl-glukosaminem. Disacharidové podjednotky jsou mezi sebou svázány vazbou β -1,4. Jedná se o látku, která se přirozeně nachází v organismu, kde plní zejména funkci organizátora extracelulární matrix (EMS). Navíc díky tomu, že interaguje s receptory buněk, je hyaluronan schopen nejenom je poutat k EMS, nýbrž také prostřednictvím této interakce buňky i určitým způsobem regulovat.
- 20 díky svému složení je hyaluronan schopen vázat značné množství vody a tudíž tkáň hydratovat a zabezpečit tak nejenom transport živin a kyslíku k jednotlivým buňkám, nýbrž také přenos regulačních faktorů mezi buňkami [1]. Další velkou výhodou hyaluronanu je skutečnost, že se průmyslově dá získávat v prakticky neomezeném množství a ve velmi vysoké čistotě pomocí fermentace streptokoků [2].
- 25 To, že hyaluronan je látka tělu vlastní, která není navíc imunogenní, teratogenní či jinak toxická, interaguje se specifickými buněčnými receptory, silně hydratuje tkáň a lubrikuje klouby či pohyb víčka po oční bulvě ji předurčuje pro řadu aplikací v medicíně [3 - 5].

- 30 Jednou ze zajímavých aplikačních forem by mohly být různé textilní výrobky, tkaniny, pleteniny či netkané textilie pro externí či interní užití. To však vyžaduje, aby byla k dispozici vlákna, která na jedné straně budou schopna vázat na svůj povrch či nést ve své struktuře biologicky aktivní látky a navíc se díky své chemické struktuře budou

v organismu řízeně rozkládat a současně budou mít takové fyzikální a mechanické vlastnosti, které dovolí jejich textilní zpracování. V současné době lze v literatuře nalézt popis použití mokrého zvlákňování (wet spinningu) k výrobě vláken a filmů z hyaluronátu draselného (Rupprecht [6]) nebo vápenatého (Sheehan [7]). Zvláknění je v tomto případě prováděno do roztoku ethanolu s obsahem 0,1 M KCl nebo odpovídající vápenaté soli. Připravená vlákna jsou velmi dobře rozpustná ve vodě a již ve vlhkém prostředí se rozpadají, přičemž řádově v několika desítkách sekund ztrácejí jak svůj tvar, tak i mechanické vlastnosti. Výše uvedené vlastnosti zcela zásadním způsobem omezují aplikační možnosti nativního hyaluronanu. Dosud neexistuje na trhu žádný přípravek, který by nativní vlákna připravená z hyaluronanu využíval.

Příprava vláken z nativního hyaluronanu je chráněna patentem **WO 2009/050389**. Vlákna jsou získávána srážením v lázni koncentrované kyseliny octové (80% až 90%). Následně jsou vlákna sušena a dloužena. Vzhledem k tomu, že jsou připravována z nativního hyaluronanu, jsou velmi dobře rozpustná ve vodě. K omezení rozpustnosti autoři uvádějí, že lze vlákno povrchově upravit pomocí hydrofobních látek rostlinného nebo živočišného původu. Oproti tomu, jsou námi připravená vlákna z hydrofobizovaného hyaluronanu nerozpustná ihned po přípravě, nemusí se tedy později přidávat další látky pro povrchovou úpravu, a proto je celý proces technologicky i ekonomicky výrazně jednodušší.

Patentová přihláška **PV 2010-1001** využívá k přípravě vláken z kyseliny hyaluronové také kyselinu 1 až 99% hm, avšak ve směsi s alkoholem 1 až 99%, který má vláknům dodávat vyšší pevnost. Nárokují si také použití kyseliny fosforečné a metalizačních lázní. Pro koagulaci upřednostňují kyselinu mravenčí, octovou, propionovou se směsí s methanolem, ethanolem, propan-1-olem nebo propan-2-olem. Opět se jedná o rozpustná vlákna oproti námi použitému hydrofobizovanému HA. Stejně vymezení se týká i patentové přihlášky **US2011/0263724 A1**.

Výše popsaná rozpustnost vláken z nativního hyaluronanu může být odstraněna použitím vhodných chemicky modifikovaných derivátů na bázi hyaluronanu.

V patentu **EP 216453 A2** autoři zvlákňovali pomocí wet spinningu estery kyseliny hyaluronové v lázni ethanol+DMSO. Konkrétně se jednalo o ethyl-ester (HYAFF7) a benzyl-ester (HYAFF11). Esterifikuje se karboxylová skupina, esterifikace probíhá vazbou aktivovaného alkylu na karboxylovou skupinu kyseliny glukuronové, která je

ovšem podle současných poznatků [8] významná pro specifickou vazbu kyseliny hyaluronové a buněčné receptory (CD44).

Naproti tomu hydrofobizované hyaluronany, ze kterých vycházíme v rámci této přihlášky vynálezu, jsou modifikovány pouze na hydroxylových skupinách, proto tedy biologické vlastnosti karboxylové skupiny zůstávají zachovány v plném rozsahu, tak, jako v případě nativního hyaluronanu.

Jelikož použitá lázeň ve výše uvedeném patentu neumožňuje dosáhnout mechanických vlastností požadovaných pro tvorbu nekonečného monofilu, autoři patentů je využívají pouze pro tvorbu netkaných textilií.

I další patenty od firmy Fidia Advanced Biopolymers se zabývají, tvorbou vláken a netkaných textilií z esterů kyseliny hyaluronové, jedná se o tyto patenty **WO 93/11803, WO 98/08876, US 5658582, US 006632802 B2, US 2004/0192643 A1**. Příprava vláken je stejná u všech patentů. Nejprve se rozpouští estery kyseliny hyaluronové v DMSO, následuje koagulace do absolutního ethanolu. Délka vláken se pohybuje v rozmezí 5 až 100 mm. Jejich krátká délka je dána značnou křehkostí vláken, kterou způsobuje použitá koagulační lázeň - absolutní ethanol, jak je dokázáno i v našem příkladu 20. Proto si také autoři těchto patentů nárokují pouze netkané textilie, jelikož svým technologickým postupem, zejména zvolenou srážecí lázní, nejsou schopni vyrobit nekonečné vlákno. V případě naší přihlášky vynálezu je závěrem příprava nekonečných vláken a jejich zpracování do podoby pravidelně strukturované textilie (tkanina, pletenina), u kterých lze předpokládat homogenní distribuci monofilamentu a vyšší tahové a flexibilní vlastnosti.

Dále jsou patentově chráněna směsná vlákna, kde deriváty hyaluronanu představují vedlejší komponentu, s obsahem max. do 10 hm%. Zbytek zvláknovací suroviny zaujímají jiné polysacharidy, například gelan, přihláška vynálezu **WO 2007/006403**. Autoři svým technologickým postupem nejsou schopni zvláknit hyaluronan jako nosný polymer, proto ho do vláken přidávají v malém množství k jinému nosnějšímu polymeru.

Obdobná situace je popsána ve **WO 2007/009728 A2**, kde autoři zvláknují karboxymethylcelulosu s deriváty kyseliny hyaluronové. Komponenty jsou rozpuštěny v DMSO a jsou vysráženy v koagulační lázni chloridu zinečnatého v ethanolu, nebo bromidu zinečnatém v ethanolu. Autoři zde již neuvádí, jak velké množství zinku zůstává obsaženo ve vláknech. Vyšší obsah zinku coby těžkého kovu je přitom cytotoxický. To dokazují i vlákna připravená dle příkladu 6 a přiložený graf viability 5.

Příhláška vynálezu **US 2011/0237539 A1** si nárokuje výrobu hemostatických vláken na bázi polysacharidů. Autoři uvádějí směsi materiálů: alginát, chitosan, kyselina hyaluronová a želatina. Jako koagulační roztok pro směs kyseliny hyaluronové a chitosanu si nárokují suspenzi hydroxidu sodného, methanolu a vody. Pro směs želatiny a chitosanu si nárokují stejnou lázeň hydroxidu sodného, methanolu a vody. Pro zvláknění směsi kyseliny hyaluronové a alginátu si nárokují suspenzi chloridu vápenatého, ethanolu a vody. Ovšem opět používají kyselinu hyaluronovou jako jednu z komponent, proto není kyselina hyaluronová brána jako nosný polymer vytvořených vláken.

Z hlediska aplikací vláken připravených z esterů hyaluronanu jsou patentována krátká vlákna, zejména netkané textilie (**US 5658582**), také jsou krátká vlákna využita k přípravě gázy, šicích materiálů, sítí, netkaných textilií (**WO 98/08876, US 006632802 B2**), nebo také k přípravě obvazového materiálu (**WO 2007/003905**). Příhláška vynálezu **US 2004/0192643 A1** také udává výsledky z preklinické a klinické studie materiálu HYAFF7 a HYAFF 11 proti po-operacním srůstům. Materiál testují ve formě gázy a netkané textilie.

Odkazy:

1. Radice a kol., Injectable hyaluronic acid derivatives with pharmaceuticals/cells, patent US20020076810 A1.
2. Lee S.A, VanSteenberg M., Rupprecht A.; Spectroscopic studies of the physical properties of hyaluronate films: the origin of the phase transition; *Carbohydrate Polymers*; 1995; 28; 61-67.
3. Guillaumie F., Furrer P., Felt-Bayens O., Fuhlendorff B. L., Nymand S.; Comparative studies of various hyaluronic acids produced by microbial fermentation for potential topical ophthalmic applications. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*; 2009; 1421-1430.
4. Miller R.J., Avila L.Z.; *Chemistry and Biology of Hyaluronan : Medicinal Uses of Modified Hyaluronate*. Elsevier Ltd. 2004. 505-528.
5. Juhlin L.; Hyaluronan in skin; *Journal of Internal Medicine*; 1997; 242; 61-66.
6. Rupprecht A.; Wet Spinning of Hyaluronic Acid. Preparation of Oriented Samples; *Acta Chemica Scandinavica*; 1979; 33; 779-780.
7. Sheehan J.K., Atkins E.D.T., Nieduszynski I.A.; X-ray diffraction studies on the connective tissue polysaccharides; *J. Mol. Biol.* 1975; 91; 153-163.

8. Banerji S., Wright A.J. a kol.; Structures of the Cd44-hyaluronan complex provide insight into a fundamental carboxyhydrate-protein interaction; *Nature structural and molecular biology*; 2007; 14; 234-239.
9. Káš Jan, Kodíček Milan, Valentová Olga; Laboratorní techniky biochemie, VŠCHT Praha, 138-139. ISBN: 80-7080-586-2.

Podstata vynálezu

Nedostatky vyplývající ze stavu techniky, jako je okamžitá rozpustnost vláken připravených z nativního hyaluronanu, jsou v tomto vynálezu vyřešeny použitím hydrofobizovaného hyaluronanu. K modifikaci hyaluronanu dochází přednostně na primárním alkoholu N-acetyl-glukosaminu, ale k acylaci může též docházet na sekundárních alkoholech kyseliny glukuronové. Acylačními činidly jsou anhydridy mastných kyselin s přednostní délkou řetězce C₁₁ – C₁₈. Stupeň substituce hydrofobizovaných hyaluronanů vhodných pro zvlákňování je pro:

deriváty C₁₁ – C₁₂ s výhodou 30 % a vyšší

deriváty C₁₃ – C₁₅ s výhodou 20 % a vyšší

deriváty C₁₆ – C₁₈ s výhodou 5 % a vyšší.

Termínem „stupeň substituce“ se rozumí počet C₁₁ – C₁₈-acylů připojených na 100 dimerů hyaluronanu. Například 5% znamená, že 5 z každých 100 dimerů hyaluronanu je substituováno C₁₁ – C₁₈-acyly. Při substituci je atom vodíku z primární OH skupiny N-acetyl-glukosaminu nebo ze sekundárních OH skupin kyseliny glukuronové nahrazen C₁₁ – C₁₈-acylem.

Způsob přípravy vláken na bázi hyaluronanu C₁₁ – C₁₈-acylovaného na hydroxylových skupinách kyseliny hyaluronové, s výhodou acylovaného přednostně na primárním alkoholu N-acetyl-glukosaminu, podle vynálezu probíhá tak, že se připraví zvlákňovací roztok obsahující acylovaný hyaluronanu o koncentraci v rozmezí 0,01 % hmotn. až 15 % hmotn. ve směsi vody a propan-2-olu, kde obsah vody je v rozmezí 30 % obj. až 90 % obj. obsah propan-2-olu je 10 % obj. až 70 % obj. Ve výhodném provedení se použije palmitoyl-hyaluronan. Tento zvlákňovací roztok se zavádí do koagulační lázně obsahující vodný roztok organické kyseliny nebo její soli alkalických kovů nebo kovů alkalických zemin, kde kyselina je vybrána ze skupiny zahrnující kyselinu mléčnou, vinnou, citronovou, jablečnou, askorbovou, šťavelovou nebo jejich kombinaci, za vzniku vláken. Vlákna se následně promyjí

alkoholem, například ethanolem, propan-1-olem nebo propan-2-olem, a suší. Případně se vlákna po promytí mohou i dloužit. Koncentrace vodného roztoku organické kyseliny v koagulační lázni je pro kyselinu mléčnou 0,5 % až 30 % hmotn., pro kyselinu vinnou 0,01 % až 57 % hmotn., pro kyselinu citronovou 0,5 % až 42 % hmotn., pro kyselinu jablečnou 0,5 % až 50 % hmotn., pro kyselinu askorbovou 0,5 % až 25 % hmotn. a pro kyselinu šřavelovou 0,5 % až 60 % hmotn. S výhodou je koagulační lázeň tvořena nasyceným vodným roztokem organické kyseliny. V jednom výhodném provedení je koagulační lázeň tvořena nasyceným vodným roztokem kyseliny mléčné. Před zavedením do koagulační lázně se zvláknovací roztok s výhodou odplyní. Teplota koagulační lázně je v rozmezí 15 do 45 °C a doba pobytu vláken v koagulační lázni je v rozmezí od 10 sekund až 24 hodin.

Dále se vynález týká vláken na bázi hyaluronanu C₁₁–C₁₈-acylovaného na hydroxylových skupinách kyseliny hyaluronové, která mají průměr 50 až 300 μm a pevnost v tahu v rozmezí 0,3 až 1 cN/dtex a tažnost v rozmezí 10 až 40 %. Vlákna se mohou použít pro výrobu pletených, tkaných nebo netkaných textilií. Textilie z vláken podle vynálezu se mohou použít například pro výrobu implantovatelných chirurgických materiálů pro humánní a veterinární medicínu.

Důležité je, že oproti derivátům popsaným v patentových spisech EP 216453 A2, WO 93/11803, WO 98/08876, US 5658582, US 006632802 B2 a US 2004/0192643 A1 zůstávají zachovány veškeré přítomné karboxylové skupiny kyseliny glukuronové, což jsou skupiny odpovědné za biologické vlastnosti.

Navíc je také využito nových a efektivnějších srážecích lázní se sníženou škodlivostí na lidské zdraví a životní prostředí. Jedná se o netoxické, nevýbušné a nehořlavé roztoky oproti lázním využívaným v PV 2010-1001.

	třída nebezpečnosti	H věty	P věty
kyselina mravenčí dle PV2010-1001	C, hořlavý	H226, H314	P210, P260, P280, P305+P351+P338, P301+P330+P331
kyselina octová dle PV2010-1001	C, hořlavý	H226, H314	P210, P260, P280, P305+P351+P338, P301+P330+P332
kyselina propionová dle PV2010-1001	C	H314	P280, P301+P330+P331, P305+P351+P338
	třída nebezpečnosti	H věty	P věty
kyselina citronová	Xi	H319	P280, P305+P351+P338
kyselina D,L jablečná	Xn, Xi	H302, H318, H315, H335	P261, P280, P305+P351+P338
kyselina vinná	Xi	H319, H335, H315	P280, P305+P351+P338

kyselina mléčná	Xi	H315, H318	P280, P305+P351+P338
Kyselina askorbová	-	-	-
Kyselina šťavelová	Xn	H302, H312	P302+P352

Vlákna z hydrofobizovaného hyaluronanu mají ve srovnání s vlákny z nativního hyaluronanu výrazně lepší textilně-zpracovatelské vlastnosti, které jsou dány především zvýšenou tažností. V tomto řešení již nedochází k lámání vláken a je možné vlákna vyrobit v délce několika stovek metrů až kilometrů, přičemž lze vlákna dále zpracovávat běžnými textilními technikami jako je tkaní, pletení atd. na provozních strojích.

Tažnost je velmi důležitá pro zpracování vláken. Při tkaní dochází k dynamickému namáhání osnovy a útku při tvorbě prošlupu a prohozu útku. U pletení se vyskytuje dynamické namáhání nitě při odtahu cívky a utahování oka [Učební texty Technické university Liberec]. Hodnoty tažností vláken jsou převážně dány použitým acylovaným hyaluronanem a předpoklad k dobré tažnosti vychází z jeho chemické struktury [Rogovin Z.A. Chemie a technologie umělých vláken, 1956].

Použití nárokových organických kyselin jako srážecích lázní není zcela zřejmé, jelikož oproti zmiňovaným kyselinám v patentové přihlášce PV2010-1001 (kyselina mravenčí, octová, propionová) se jedná o kyseliny v tuhém skupenství. Pokusy připravit vlákna pouze ve vodě nebo pouze v alkoholu nebyly úspěšné. Bylo tedy zapotřebí experimentálně vyzkoušet nejvhodnější směsi z hlediska pevnosti a tažnosti vláken, tak aby bylo možné získaná vlákna textilně zpracovávat na provozních textilních strojích.

Dalším příkladem nejednoznačnosti je i použití kyseliny mléčné jako srážecí lázně. Kyselina mléčná je běžně k dostání jako 80% vodný roztok, tento roztok je velmi viskózní, proto srážení vláken do tohoto roztoku není možné.

Experimentálně se ukázalo jako optimální toto koncentrační složení:

kyselina mléčná – s výhodou 0,5% až 30% vodný roztok

kyselina vinná – s výhodou 0,01% až nasycený roztok (57%)

kyselina citronová – s výhodou 0,5% až nasycený roztok (42%)

kyselina jablečná – s výhodou 0,5% až 50%

kyselina askorbová – s výhodou 0,5% až nasycený roztok (25%)

nebo jakákoliv kombinace výše uvedeného.

Překvapivé je, že při použití silnější kyseliny (mravenčí, citronové, mléčné, jablečné, vinné) by se dalo očekávat, že síla kyseliny bude mít vliv na snížení molekulové hmotnosti acylovaného hyaluronanu (kyselá hydrolyza sacharidů). Snížení molekulové hmotnosti vede ke snížení pevnosti vláken [Hladík V., Textilní vlákna, 1970]. Ale pouze při použití vodného roztoku kyseliny mravenčí i směsi mravenčí s alkoholem (propan-2-ol) v poměru 4:1 (viz PV2010-1001) se vznikající vlákna z hydrofobizovaného HA nepodařilo odvíjet pomocí navíjecích válců k dalším operacím. Vlákno se při pokusu o odvíjení (zvýšení nároků na pevnost) trhlo. Nízká pevnost je způsobená poklesem molekulové hmotnosti.

Ovšem při použití nárokováných lázní (kyselina vinná, citronová, mléčná, jablečná, askorbová) není pevnost nikterak nízká. Z výsledků měření na SEC-MALLS vláken připravených pomocí různých lázní vyplývá, že u vláken připravených pomocí kyseliny citronové, mléčné, jablečné, vinné se sice Mw snižuje, ale vlastnosti vláken zůstávají zachovány.

	připraveno dle	Mw HA [kDa]	p Ka	pevnost [cN/dtex]	tažnost [%]
Hydrofobizovaný hyaluronan	příkladu 1	253	-	-	-
kyselina mravenčí	příkladu 25	88	3,75	nebylo možné proměřit	
Kyselina octová	příkladu 26	167	4,76	5,60	16,13
Kyselina propionová	příkladu 24	193	4,88	3,00	11,00
kyselina askorbová	příkladu 10	120	4,1	9,37	21,07
Kyselina mléčná	příkladu 12	137	3,86	5,77	21,90
Kyselina jablečná	příkladu 11	130	3,46	7,50	25,83
Kyselina citronová	příkladu 5	106	3,15	7,80	20,53
Kyselina vinná	příkladu 8	95	3,01	4,93	16,49

Podstata vynálezu tedy spočívá ve využití uvedených hydrofobizovaných hyaluronanů v kombinaci s uvedenými lázněmi, díky čemuž tato vlákna vykazují nové, vylepšené vlastnosti v podobě nerozpustných, biodegradabilních nekonečných vláken se zvýšenou tažností. Díky tomuto lze tato vlákna zpracovávat běžnými textilními technologiemi, jako je tkaní, pletení atd. Zpracování je možné na běžných provozních zařízeních (příklad 29), což doposud s vlákny z nativního HA nebo z derivátů HA nebylo možné. V patentové přihlášce PV 2010-1001 jsou uvedeny

prakticky pouze ručně vytvořené tkaniny. Ale na vlákna zpracovávaná textilními stoji jsou kladeny vyšší nároky na pevnosti a především tažnosti.

Z hlediska odbouratelnosti v organismu se jako nejvýhodnější výchozí acylovaný hyaluronan jeví palmitoyl hyaluronan. Kyselina palmitová je součástí živočišného (tělesného) tuku. Palmitátový řetězec se běžně v těle odbourává β -oxidací.

Vlákna jsou připravována pomocí technologie mokrého zvlákňování (wet spinning). Specifické pro přípravu těchto vláken jsou koagulační lázně, které jsou složeny z:

- vodných roztoků organických kyselin
- vodných roztoků solí organických kyselin
- nebo jakákoliv kombinace výše uvedených

Koncentrace roztoků pro přípravu vláken se pohybuje od 0,01% až po nasycené. S výhodou se využívá nasycených roztoků.

Vlákna získaná ze srážecí lázně jsou dále promývána nižším alkoholem (ethanol, propan-1-ol, propan-2-ol) a s výhodou mohou být dloužena. Získaná vlákna mají v průměru $50 \pm 300 \mu\text{m}$, dle použitých vláknících parametrů (vlákníčí tryska, extruzní rychlost a rychlost navíjení, poměr dloužení) a jsou vyráběna jako nekonečné monofilamenty a dále zakrucována do formy skaných kabiček vhodných pro strojové zpracování textilními technikami. Vlákna jsou ve vodě nerozpustná, pouze botnají. Nevykazují cytotoxické vlastnosti a jsou enzymaticky degradovatelná. Pevnost i tažnost je vyhovující pro jejich další zpracování, jako je zakrucování do nití nebo pro přípravu pletených, tkaných či netkaných textilií.

Přehled obrázků na výkresech

Obr. 1 znázorňuje monofil připravený dle příkladu 12, zobrazený pomocí skenovací elektronové mikroskopie.

Obr. 2 a Obr. 3 znázorňují grafy vypovídající o vlivu acylovaných hyaluronanů využívaných k výrobě vláken na viabilitu buněk. Konkrétně obr. 2 znázorňuje výsledky z testů vlivu palmitoylu hyaluronanu připraveného dle příkladu 1 na viabilitu. V grafu je vynesena viabilita buněk (v procentech kontroly v čase 0) v závislosti na čase (hodiny). Obrázek 3 znázorňuje výsledky z testů vlivu palmitoylu hyaluronanu připraveného dle příkladu 4 na viabilitu. V grafu je vynesena viabilita buněk (v procentech kontroly v čase 0) v závislosti na čase (hodiny).

Obr. 4 až 8 znázorňují grafy vypovídající o výsledcích vlivu vláken získaných z různých srážecích lázní na viabilitu buněk. Konkrétně obr. 4 znázorňuje výsledky

vlivu vláken připravených podle příkladu 3 (srážecí lázeň vodný roztok kyseliny citronové) na viabilitu buněk, Obr. 5 znázorňuje výsledky vlivu vláken připravených podle příkladu 12 (srážecí lázeň vodný roztok kyseliny mléčné) na viabilitu buněk, Obr. 6 znázorňuje výsledky vlivu vláken připravených podle příkladu 8 (srážecí lázeň vodný roztok kyseliny vinné) na viabilitu buněk, Obr. 7 znázorňuje výsledky vlivu vláken připravených podle příkladu 11 (srážecí lázeň vodný roztok kyseliny jablečné) na viabilitu buněk.

Obr. 8 znázorňuje graf vypovídající o vlivu degradačních produktů vláken na viabilitu buněk.

Obr. 9 znázorňuje nitě z palmitoylu hyaluronanu. Vlevo nit ze dvou monofilů, vpravo nit ze tří monofilů.

Obr. 10 znázorňuje ukázkou zpracování vláken z hydrofobního hyaluronanu do zátažné jednolící pleteniny (bílá část).

Obr. 11 znázorňuje ukázkou zpracování vláken z hydrofobního hyaluronanu do zátažné oboulící pleteniny.

Obr. 12 znázorňuje ukázkou zpracování vláken z hydrofobního hyaluronanu do tubulární pleteniny.

Příklady provedení vynálezu

Molekulová hmotnost byla měřena pomocí HPLC od firmy Shimadzu, který je doplněn detektorem rozptylu světla miniDAWN firmy Wyatt Technologies (tzv. metoda SEC-MALLS). Pokud není uvedeno jinak, uvedené molekulové hmotnosti jsou hmotnostně střední.

Identifikace a stanovení stupně substituce bylo provedeno pomocí NMR. Stupeň substituce (DS) byl vypočten z integrálu signálů příslušného substituentu (tzn. C16 acyl) a signálu CH₃-GlcN při 2,0 ppm. Stupeň substituce 100 % odpovídá navázání jednoho substituentu na jednu dimerovou jednotku hyaluronanu. NMR spektra acylovaných hyaluronanů byla naměřena na BRUKER AVANCE 500 (500 MHz) v D₂O, ve směsi D₂O/2-propanol-d₈ v poměru 4:1. Chemické posuny byly kalibrovány vůči vnitřnímu standardu deuterované 3-trimethylsilylpropanové kyselině (TSPA).

Byla proměřena tato spektra: ¹H NMR, ¹³C NMR, HH COSY, HSQC a DOSY-NMR. Pro zpracování experimentálních dat byl použit software firmy Bruker TOPSPIN 1.2 a software SpinWorks 3.1.

Acylované hyaluronany (palmitoylhyaluronan, stearylhyaluronan) byly připravovány obdobným způsobem dle příkladu 1. Stupeň substituce se řídí použitými ekvivalenty, uvedené rozmezí je následující:

HDA 0,5 eq	HDA 1 eq	HDA 2 eq
DS \leq 12 %	DS 12 % - 30 %	DS 35 % - 55 %

5 Acylované undekanoylhyaluronanu byly připraveny obdobným způsobem dle příkladu 2.

Snímky ze skenovacího elektronového mikroskopu byly pořízeny na přístroji Tescan VEGA II LSU s wolframovou katodou a maximálním rozlišení 3 nm. Urychlovací napětí primárního svazku bylo 5 kV, pracovní vzdálenost 3-4 mm snímky byly
10 pořízeny v režimu vysokého vakua.

Příklad 1

Hyaluronan sodný (15 g; 250 kDa) byl rozpuštěn ve 300 ml destilované vody, po úplném rozpuštění hyaluronanu sodného (HA-Na) bylo k roztoku přidáno 300 ml tetrahydrofuranu (THF). Poté byl do roztoku přidán triethylamin (TEA) (2,5 eq),
15 dimethylaminopyridin (DMAP) (0,04 eq) a anhydrid kyseliny palmitové (HDA) (2 eq). Tento roztok byl míchán 2 h při laboratorní teplotě a poté 0,5 h při 45 °C (teplota roztoku). Do homogenního roztoku bylo následně přidáno 300 ml destilované vody s 5 eq NaCl (vztaženo na HA-Na) a 300 ml destilované vody na vypláchnutí reakční
20 baňky. Roztok byl promíchán a posléze vysrážen 900 ml 100% propan-2-olem, promyt 1x 100% propan-2-olem (500 ml) a 4x 80% propan-2-olem (500 ml) a 2x 100% propan-2-olem (500 ml). Vlhký palmitoyl hyaluronan byl sušen v sušárně 48 hodin při 40 °C. Vykazoval stupeň substituce 36 % (stanoveno z NMR) a Mw 250 kDa.

Příklad 2

25 5,0 g hyaluronanu sodného (12,5 mmol, 250 kDa) bylo rozpouštěno ve 100 ml destilované vody. Poté bylo přidáno 70 ml THF. Poté se do roztoku přidaly TEA (7,0 ml; 4 eq.) a DMAP (153,0 mg; 0,1 eq.). Současně byla rozpuštěna kyselina undekanová (9,3 g; 4 eq) v 30 ml THF, poté se do roztoku přidal TEA (7,0 ml; 4 eq.)

a ethyl-chlorformiát (4,76 ml, 4 eq.). Aktivace kyseliny probíhala při 0-5 °C po dobu 15 min. Po aktivaci kyseliny byla sraženina, tj. směsný anhydrid kyseliny undekanové a ethyl-chlorformiátu, zfiltrována do připraveného roztoku HA. Reakce probíhala po dobu 5 h při pokojové teplotě. Poté se reakční směs naředila 50 ml vody s
5 přidavkem 4,0 g NaCl. Acylovaný hyaluronan byl z reakční směsi izolován srážením za použití 4-násobku absolutního propan-2-olu. Po dekantaci se sraženina opakovaně promyla nejprve vodným roztokem propan-2-olu (80%obj.) a potom absolutním propan-2-olem. Sraženina byla poté sušena po dobu 48 h při teplotě 40 °C. Stanovený stupeň substituce byl 37 % (stanoveno z NMR).

10 **Příklad 3**

Navážka 1 g palmitoylu hyaluronanu o stupni substituce 36 % a Mw 250 kDa byla rozpuštěna ve směsi 10 ml demi vody a 10 ml propan-2-olu. Vzniklý 5,3% roztok byl odplyněn centrifugací a pomocí dávkovače NEXUS 6000 byl extruzní rychlostí 200 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ přiváděn do koagulační lázně. Koagulační lázeň tvořil nasycený vodný
15 roztok kyseliny citronové o laboratorní teplotě. Vlákno procházelo 0,4 m dlouhou lázní rychlostí 1,2 $\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$ a pomocí soustavy navíjecích válců bylo odtahováno a navíjeno na válec z části ponořený do 100% propan-2-olu, kde docházelo k promývání, cca 1 h.

Příklad 4

20 Navážka 1,3 g palmitoylu hyaluronanu o stupni substituce 15 % a Mw 250 kDa byla rozpuštěna ve směsi 10 ml demi vody a 10 ml propan-2-olu. Vzniklý 6,8% roztok byl odplyněn centrifugací a pomocí dávkovače NEXUS 6000 byl extruzní rychlostí 200 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ přiváděn do koagulační lázně. Koagulační lázeň tvořil nasycený vodný roztok kyseliny citronové o laboratorní teplotě. Vlákno procházelo 0,4 m dlouhou
25 lázní rychlostí 1,2 $\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$ a pomocí soustavy navíjecích válců bylo odtahováno a navíjeno na válec z části ponořený do 100% propan-2-olu, kde docházelo k promývání, cca 1 h.

Příklad 5

Navážka 1,32 g palmitoylu hyaluronanu o stupni substituce 46 % a Mw 250 kDa byla rozpuštěna ve směsi 11 ml demi vody a 11 ml propan-2-olu. Vzniklý 6,3% roztok byl odplyněn centrifugací a pomocí dávkovače NEXUS 6000 byl extruzní rychlostí 200 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ přiváděn do koagulační lázně. Koagulační lázeň tvořil nasycený vodný roztok kyseliny citronové o laboratorní teplotě. Vláknem procházelo 0,4 m dlouhou lázní rychlostí 1,2 $\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$ a pomocí soustavy navíjecích válců bylo odtahováno a navíjeno na válec z části ponořený do 100% propan-2-olu, kde docházelo k promývání, cca 1 h $\dot{\text{p}}\dot{\text{e}}\dot{\text{t}}$.

Příklad 6

Navážka 0,95 g stearylu hyaluronanu o stupni substituce 35 % a Mw 130 kDa byla rozpuštěna ve směsi 10 ml demi vody a 10 ml propan-2-olu. Vzniklý 5% roztok byl odplyněn centrifugací a pomocí dávkovače NEXUS 6000 byl extruzní rychlostí 200 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ přiváděn do koagulační lázně. Koagulační lázeň tvořil nasycený vodný roztok kyseliny citronové o laboratorní teplotě. Vláknem procházelo 0,4 m dlouhou lázní rychlostí 1,2 $\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$ a pomocí soustavy navíjecích válců bylo odtahováno a navíjeno na válec z části ponořený do 100% propan-2-olu, kde docházelo k promývání, cca 1 h $\dot{\text{p}}\dot{\text{e}}\dot{\text{t}}$.

Příklad 7

Navážka 0,5 g undekanoylu hyaluronanu o stupni substituce 37 % a Mw 250 kDa byla rozpuštěna ve směsi 10 ml demi vody a 10 ml propan-2-olu. Vzniklý 2,7 % roztok byl odplyněn centrifugací a pomocí dávkovače NEXUS 6000 byl extruzní rychlostí 200 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ přiváděn do koagulační lázně. Koagulační lázeň tvořil nasycený vodný roztok kyseliny citronové o laboratorní teplotě. Vláknem procházelo 0,4 m dlouhou lázní rychlostí 1,2 $\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$ a pomocí soustavy navíjecích válců bylo odtahováno a navíjeno na válec z části ponořený do 100% propan-2-olu, kde docházelo k promývání, cca 1 h $\dot{\text{p}}\dot{\text{e}}\dot{\text{t}}$.

Příklad 8

Navážka 1,32 g palmitoylu hyaluronanu o stupni substituce 46 % a Mw 250 kDa byla rozpuštěna ve směsi 11 ml demi vody a 11 ml propan-2-olu. Vzniklý 6,3% roztok byl odplyněn centrifugací a pomocí dávkovače NEXUS 6000 byl extruzní rychlostí 200 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ přiváděn do koagulační lázně. Koagulační lázeň tvořil nasycený vodný

Příklad 12

Navážka 1,32 g palmitoylu hyaluronanu o stupni substituce 46 % a Mw 250 kDa byla rozpuštěna ve směsi 11 ml demi vody a 11 ml propan-2-olu. Vzniklý 6,3% roztok byl odplyněn centrifugací a pomocí dávkovače NEXUS 6000 byl extruzní rychlostí 200 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ přiváděn do koagulační lázně. Koagulační lázeň tvořil 20% vodný roztok kyseliny mléčné o laboratorní teplotě. Vlákno procházelo 0,4 m dlouhou lázní rychlostí 1,2 $\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$ a pomocí soustavy navíjecích válců bylo odtahováno a navijeno na válec z části ponořený do 100% propan-2-olu, kde docházelo k promývání, cca 1 h β d.

Příklad 13

Navážka 1,32 g palmitoylu hyaluronanu o stupni substituce 46 % a Mw 250 kDa byla rozpuštěna ve směsi 11 ml demi vody a 11 ml propan-2-olu. Vzniklý 6,3% roztok byl odplyněn centrifugací a pomocí dávkovače NEXUS 6000 byl extruzní rychlostí 200 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ přiváděn do koagulační lázně. Koagulační lázeň tvořil 20% vodný roztok kyseliny mléčné o laboratorní teplotě. Vlákno procházelo 0,4 m dlouhou lázní rychlostí 1,2 $\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$ a pomocí soustavy navíjecích válců bylo odtahováno a navijeno na válec z části ponořený do 100% propan-2-olu, kde docházelo k promývání, cca 1 h β d. Poslední válec byl od předposledního urychlen na 1,4 $\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$, docházelo tedy k dloužení vláken asi o 20 %.

Příklad 14

Navážka 1,32 g palmitoylu hyaluronanu o stupni substituce 46 % a Mw 250 kDa byla rozpuštěna ve směsi 11 ml demi vody a 11 ml propan-2-olu. Vzniklý 6,3% roztok byl odplyněn centrifugací a pomocí dávkovače NEXUS 6000 byl extruzní rychlostí 200 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ přiváděn do koagulační lázně. Koagulační lázeň tvořil 50% vodný roztok kyseliny šřavelové. Vlákno procházelo 0,4 m dlouhou lázní rychlostí 1,2 $\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$ a pomocí soustavy navíjecích válců bylo odtahováno a navijeno na válec z části ponořený do 100% propan-2-olu, kde docházelo k promývání, cca 1 h β d.

Příklad 15

Navážka 1,3 g palmitoylu hyaluronanu o stupni substituce 15 % a Mw 250 kDa byla rozpuštěna ve směsi 10 ml demi vody a 10 ml propan-2-olu. Vzniklý 6,8% roztok byl

odplyněn centrifugací a pomocí dávkovače NEXUS 6000 byl extruzní rychlostí 200 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ přiváděn do koagulační lázně. Koagulační lázeň tvořil roztok kyseliny mléčné ve složení: 80 hm% propan-2-ol, 18 hm% kyselina mléčná, 2 hm% voda o laboratorní teplotě. Vlákno procházelo 0,4 m dlouhou lázní rychlostí 1,2 $\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$ a pomocí soustavy navíjecích válců bylo odtahováno a navíjeno na válec z části ponořený do 100% propan-2-olu, kde docházelo k promývání, cca 1 h_{bd}.

Příklad 16

Navážka 0,95 g stearylu hyaluronanu o stupni substituce 35 % a Mw 130 kDa byla rozpuštěna ve směsi 10 ml demi vody a 10 ml propan-2-olu. Vzniklý 5% roztok byl odplyněn centrifugací a pomocí dávkovače NEXUS 6000 byl extruzní rychlostí 200 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ přiváděn do koagulační lázně. Koagulační lázeň tvořil roztok kyseliny mléčné ve složení: 80 hm% propan-2-ol, 18 hm% kyselina mléčná, 2 hm% voda o laboratorní teplotě. Vlákno procházelo 0,4 m dlouhou lázní rychlostí 1,2 $\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$ a pomocí soustavy navíjecích válců bylo odtahováno a navíjeno na válec z části ponořený do 100% propan-2-olu, kde docházelo k promývání, cca 1 h_{bd}.

Příklad 17

Navážka 0,5 g undekanoylu hyaluronanu o stupni substituce 37 % a Mw 250 kDa byla rozpuštěna ve směsi 10 ml demi vody a 10 ml propan-2-olu. Vzniklý 2,7 % roztok byl odplyněn centrifugací a pomocí dávkovače NEXUS 6000 byl extruzní rychlostí 200 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ přiváděn do koagulační lázně. Koagulační lázeň tvořil roztok kyseliny mléčné ve složení: 80 hm% propan-2-ol (100%), 18 hm% kyselina mléčná, 2 hm% voda o laboratorní teplotě. Vlákno procházelo 0,4 m dlouhou lázní rychlostí 1,2 $\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$ a pomocí soustavy navíjecích válců bylo odtahováno a navíjeno na válec z části ponořený do 100% propan-2-olu, kde docházelo k promývání, cca 1 h_{bd}.

Příklad 18

Navážka 1,3 g palmitoylu hyaluronanu o stupni substituce 15 % a Mw 250 kDa byla rozpuštěna ve směsi 10 ml demi vody a 10 ml propan-2-olu. Vzniklý 6,8% roztok byl odplyněn centrifugací a pomocí dávkovače NEXUS 6000 byl extruzní rychlostí 200 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ přiváděn do koagulační lázně. Koagulační lázeň tvořil roztok o složení 33 hm% kyseliny benzoové a 67 hm% propan-2-olu o laboratorní teplotě. Vlákno procházelo 0,4 m dlouhou lázní rychlostí 1,2 $\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$ a pomocí soustavy navíjecích

válců bylo odtahováno a navíjeno na z části válec ponořený do 100% propan-2-olu, kde docházelo k promývání, cca 1 h_{pr}.

Soli organických kyselin

Příklad 19

5 Navážka 1 g palmitoylu hyaluronanu o stupni substituce 36 % a Mw 250 kDa byla rozpuštěna ve směsi 10 ml demi vody a 10 ml propan-2-olu. Vzniklý 5,3% roztok byl odplyněn centrifugací a pomocí dávkovače NEXUS 6000 byl extruzní rychlostí 200 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ přiváděn do koagulační lázně. Koagulační lázeň tvořil nasycený vodný roztok citronanu (tri)sodného o laboratorní teplotě. Vlákno procházelo 0,4 m dlouhou
10 lázní rychlostí 1,2 $\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$ a pomocí soustavy navíjecích válců bylo odtahováno a navíjeno na válec z části ponořený do 100% propan-2-olu, kde docházelo k promývání, cca 1 h_{pr}.

Příklad 20

15 Navážka 1 g palmitoylu hyaluronanu o stupni substituce 36 % a Mw 250 kDa byla rozpuštěna ve směsi 10 ml demi vody a 10 ml propan-2-olu. Vzniklý 5,3% roztok byl odplyněn centrifugací a pomocí dávkovače NEXUS 6000 byl extruzní rychlostí 200 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ přiváděn do koagulační lázně. Koagulační lázeň tvořil nasycený vodný roztok octanu hořečnatého o laboratorní teplotě. Vlákno procházelo 0,4 m dlouhou
20 lázní rychlostí 1,2 $\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$ a pomocí soustavy navíjecích válců bylo odtahováno a do nádoby obsahující 100% propan-2-olu, kde docházelo k promývání, cca 1 h_{pr}.

Příklad 21

25 Navážka 1 g palmitoylu hyaluronanu o stupni substituce 36 % a Mw 250 kDa byla rozpuštěna ve směsi 10 ml demi vody a 10 ml propan-2-olu. Vzniklý 5,3% roztok byl odplyněn centrifugací a pomocí dávkovače NEXUS 6000 byl extruzní rychlostí 200 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ přiváděn do koagulační lázně. Koagulační lázeň tvořil nasycený vodný roztok octanu sodného o laboratorní teplotě. Vlákno procházelo 0,4 m dlouhou lázní rychlostí 1,2 $\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$ a pomocí soustavy navíjecích válců bylo odtahováno a do nádoby obsahující 100% propan-2-olu, kde docházelo k promývání, cca 1 h_{pr}.

Srovnávací příklady 22-24

Příklad 22

Srovnání s lázní použitou v dokumentech WO 93/11803, WO 98/08876, US 5658582, US 006632802 B2, US 2004/0192643 A1.

Navážka 1 g palmitoylu hyaluronanu o stupni substituce 36 % a Mw 250 kDa byla rozpuštěna ve směsi 10 ml demi vody a 10 ml propan-2-olu. Vzniklý 5,3% roztok byl odplyněn centrifugací a pomocí dávkovače NEXUS 6000 byl extruzní rychlostí 200 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ přiváděn do koagulační lázně. Koagulační lázeň tvořil roztok absolutního ethanolu. Vzniklé vlákno nebylo možné odtahovat soustavou navíjecích válců, jelikož docházelo k jeho trhání. Podařilo se získat maximálně 100 mm dlouhé kousky, které byly vytaženy pomocí pinzety.

Příklad 23

Srovnání s lázní použitou v dokumentech WO2009/050389, PV 2010-1001.

Navážka 1,32 g palmitoylu hyaluronanu o stupni substituce 46 % a Mw 250 kDa byla rozpuštěna ve směsi 11 ml demi vody a 11 ml propan-2-olu. Vzniklý 6,3% roztok byl odplyněn centrifugací a pomocí dávkovače NEXUS 6000 byl extruzní rychlostí 200 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ přiváděn do koagulační lázně. Koagulační lázeň tvořil alkoholový roztok o složení 98% kyseliny octové a 100% propa-2-olu (obj. poměr 4:1) o laboratorní teplotě. Vlákno procházelo 0,4 m dlouhou lázní rychlostí 1,2 $\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$ a pomocí soustavy navíjecích válců bylo odtahováno a navíjeno na válec z části ponořený do 100% propan-2-olu, kde docházelo k promývání, cca 1 hod.

Příklad 24

Srovnání s lázní použitou v dokumentu PV2010-1001.

Navážka 1,32 g palmitoylu hyaluronanu o stupni substituce 46 % a Mw 250 kDa byla rozpuštěna ve směsi 11 ml demi vody a 11 ml propan-2-olu. Vzniklý 6,3% roztok byl odplyněn centrifugací a pomocí dávkovače NEXUS 6000 byl extruzní rychlostí 200 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ přiváděn do koagulační lázně. Koagulační lázeň tvořil alkoholový roztok o složení 98% kyseliny mravenčí a 100% propa-2-olu (obj. poměr 4:1) o laboratorní teplotě. Vlákno procházelo 0,4 m dlouhou lázní rychlostí 1,2 $\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$ a pomocí soustavy navíjecích válců bylo odtahováno. Při odtahu se vlákno velmi často trhalo (nedostatečná pevnost) byly získány 300 mm kousky.

Příklad 25

Navážka 1,32 g palmitoylu hyaluronanu o stupni substituce 46 % a Mw 250 kDa byla rozpuštěna ve směsi 11 ml demi vody a 11 ml propan-2-olu. Vzniklý 6,3% roztok byl odplyněn centrifugací a pomocí dávkovače NEXUS 6000 byl extruzní rychlostí 200 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ přiváděn do koagulační lázně. Koagulační lázeň tvořil vodný roztok 80% kyseliny propionové o laboratorní teplotě. Vlákno procházelo 0,4 m dlouhou lázní rychlostí 1,2 $\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$ a pomocí soustavy navíjecích válců bylo odtahováno a navíjeno na válec z části ponořený do 100% propan-2-olu, kde docházelo k promývání, cca 1 hod.

Příklad 26

Navážka 1,32 g palmitoylu hyaluronanu o stupni substituce 46 % a Mw 250 kDa byla rozpuštěna ve směsi 11 ml demi vody a 11 ml propan-2-olu. Vzniklý 6,3% roztok byl odplyněn centrifugací a pomocí dávkovače NEXUS 6000 byl extruzní rychlostí 200 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ přiváděn do koagulační lázně. Koagulační lázeň tvořil vodný roztok 80% kyseliny octové o laboratorní teplotě. Vlákno procházelo 0,4 m dlouhou lázní rychlostí 1,2 $\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$ a pomocí soustavy navíjecích válců bylo odtahováno a navíjeno na válec z části ponořený do 100% propan-2-olu, kde docházelo k promývání, cca 1 hod.

Příklad 27

Navážka 1,32 g palmitoylu hyaluronanu o stupni substituce 46 % a Mw 250 kDa byla rozpuštěna ve směsi 11 ml demi vody a 11 ml propan-2-olu. Vzniklý 6,3% roztok byl odplyněn centrifugací a pomocí dávkovače NEXUS 6000 byl extruzní rychlostí 200 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ přiváděn do koagulační lázně. Koagulační lázeň tvořil vodný roztok 80% kyseliny mravenčí o laboratorní teplotě. Vlákno procházelo 0,4 m dlouhou lázní rychlostí 1,2 $\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$ a pomocí soustavy navíjecích válců bylo odtahováno. Při odtahu se vlákno velmi často trhalo (nedostatečná pevnost) byly získány 300 mm kousky.

Příklad 28

Biodegradabilita vláken byla testována v prostředí enzymů hyaluronidázy (bovinní testikulární hyaluronidázy, Sigma Aldrich) a esterázy (esteráza z králíčích jater, Sigma Aldrich).

Metodou sledování degradace vláken v přítomnosti enzymů je stanovení rozpustného podílu (oligosacharidů hyaluronanu) pomocí Somogyiho – Nelsonova činidla [9]. Při stanovování enzymatické degradace vláken bylo postupováno následovně:

5 Vlákná připravená obdobným způsobem jako v příkladu 12, byla odměřena na konstantní délku 400 mm, při konstantní hmotnosti 10 mg, smotána do panenky, vložena do 500 μ l mikrozkušavky eppendorf a zalita sterilním PBS po dobu 24 hodin, aby se vlákna propláchna. Po odsátí proplachového PBS byla zkumavka doplněna čerstvým pufrem (500 μ l). Od každého vlákna byly připraveny vždy 3
10 vzorky:

A) vlákno jen v PBS (kontrola);

B) vlákno v PBS s bovinní testikulární hyaluronidázou (200 U)

C) vlákno v PBS s hyaluronidázou (BTH; 200 U) a s králičí jaterní esterázou (CHE; 20 U).

15 Protože i enzymy mohou být zdrojem redukujících konců, byla pro všechna vlákna připravena ještě kontrola na pozadí, tj. samotný PBS, PBS+BTH a PBS+BTH+CHE. Absorbance pozadí byla při měření odečítána od absorbance vzorků s vlákny.

Po přidání enzymů k vláknům a po promíchání byly odebírány vzorky v časech 0, 2, 4 a 6 hodin. Odebrané vzorky (60 μ l) byly uloženy do $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ v 200 μ l mikrozkušavkách. Před vlastní analýzou byly vzorky podrobeny tepelné degradaci (60 minut, $100\text{ }^{\circ}\text{C}$), aby byl minimalizován vliv různé MW odštěpených fragmentů. Volné redukující konce byly stanoveny reakcí se Somogyiho a Nelsonovým činidlem [9] v následující modifikaci: 50 μ l vzorku bylo smícháno se stejným objemem čerstvě připraveného Somogyiho činidla. Směs byla po promíchání 15 minut inkubována v termobloku při $100\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po ochlazení bylo přidáno 100 μ l Nelsonova činidla, vzorky byly promíchány, krátce odstředěny, 125 μ l barevného produktu bylo přeneseno do mikrotitrační 96-jamkové destičky a byla změřena absorbance při 540 nm. Po odečtení pozadí byly z kalibrační přímky zjištěny hodnoty ekvivalentů glukózy (= počet volných redukujících konců).

30

Výsledky z degradací – závislost rychlosti enzymatické degradace na stupni substituce acylovaného hyaluronanu

			koncentrace volných redukujících konců (mM)
--	--	--	--

acylovaný hyaluronan	st. substituce	lázeň srážecí	0 hod	2 hod	4 hod	6 hod
Palmitoyl HA	15 %	20 % vodný roztok kyseliny mléčné	0,0026	0,8271	0,9501	1,2202
Palmitoyl HA	36 %	20 % vodný roztok kyseliny mléčné	0	0,1826	0,3464	0,3826
Palmitoyl HA	52 %	20 % vodný roztok kyseliny mléčné	0,0026	0,2014	0,2764	0,2943
Stearoyl HA	37%	20 % vodný roztok kyseliny mléčné	0,86	0,182	0,23	0,302
Undekanoyl HA	37%	20 % vodný roztok kyseliny mléčné	0,129	0,469	0,578	0,585

Závěrem tedy je, že připravená vlákna jsou biodegradabilní. Rychlost degradace je dána použitým acylovaným hyaluronanem a jeho stupněm substituce.

5 Příklad 29

Cytotoxicity acylovaných hyaluronanů a vláken byly sledovány pomocí MTT testu na kultuře myších kožních fibroblastů 3T3 po dobu 72 hodin. Acylovaný hyaluronan i vlákna byly naváženy a v laminárním boxu byly ponořeny do izopropanolu, dokud nebyl izopropanol odpařen. Suché acylované hyaluronany/vlákna jsou transportovány do růstového média (3600 $\mu\text{g/ml}$ vláken a 1000 $\mu\text{g/ml}$ acylovaného hyaluronanu) a ponechána přes noc botnat. Vlákna byla rozmixovaná ultraturaxem do získání homogenní suspenze. Další testovací možností byl také extrakt z vláken nebo filtrát směsi, přefiltrovaný přes 100 μm filtr. Avšak tyto úpravy neměly vliv na viabilitu, proto byla další vlákna testována pouze jako rozmixovaná suspenze.

15 Z výsledků viabilitních zkoušek vyplývá, že ani acylovaný hyaluronan ani připravená vlákna nijak signifikantně neovlivňují viabilitu buněk.

Příklad 30

Vlákna byla degradována za použití enzymů hyaluronidázy a esterázy. Ke 20 mg smotkům vláken v 750 μ l PBS bylo přidáno 20 U esterázy a 200 U hyaluronidázy. Vlákna s enzymy byla ponechána 72 hodin při teplotě 37 °C. Následně byla tato směs použita k ovlivnění buněk. Testované koncentrace byly dle koncentrace vláken, z níž byl připravený supernatant, 1000, 500 a 100 μ g/ml. Buněčná linie a postup testů viabilit je stejný jako v příkladu 25. Byla provedena 3 nezávislá opakování a data byla statisticky vyhodnocena Studentovým testem.

Z výsledků viability degradačních produktů vyplývá, že ani degradační produkty vláken nijak signifikantně neovlivňují viabilitu buněk.

Výsledky z testů viability degradačních produktů, kde:

označení	Vlákno dle příkladu	lázeň
a	3	Vodný roztok kyseliny citronové
b	8	Vodný roztok kyseliny vinné
c	12	Vodný roztok kyseliny mléčné
k	kontrola	Vlákno z nativního hyaluronanu

Příklad 31

Mechanicky byla vlákna testována v tahu, na jednosloupovém trhacím stoju Instron 3343, použitá hlava 100 N. Během zkoušky dochází nejprve k přednapnutí vlákna rychlostí 1 $\text{mm} \cdot \text{min}^{-1}$ až do síly 0,05 N. Po napnutí jsou síla i deformace automaticky vynulovány, následně proběhne zkouška, rychlostí 10 $\text{mm} \cdot \text{min}^{-1}$ až do přetrhu vlákna. Tahové zkoušky probíhaly při laboratorní teplotě a laboratorní relativní vlhkosti.

Pevnost a deformace při přetrhu byly brány z mediánu alespoň 5 platných měření. Vlákna dosahují pevnosti 3 až 10 $\text{cN} \cdot \text{dtex}^{-1}$ v závislosti na koncentraci acylovaného hyaluronanu a na stupni substituce acylovaného hyaluronanu, a také na míře dloužení. Deformace dosahuje hodnot 5 až 40 % v závislosti na výše uvedených parametrech. Uvedené hodnoty pevností a tažností v tabulkách jsou střední.

	připraveno dle	Mw HA [kDa]	p Ka	pevnost [cN/dtex]	tažnost [%]
Hydrofobizovaný HA	příkladu 1	253	-	-	-
kyselina mravenčí	příkladu 27	88	3,75	nebylo možné proměřit	

Kyselina octová	příkladu 26	167	4,76	0,56	16,13
Kyselina propionová	příkladu 25	193	4,88	0,30	11,00
kyselina askorbová	příkladu 10	120	4,1	0,94	21,07
Kyselina mléčná	příkladu 12	137	3,86	0,58	21,90
Kyselina jablečná	příkladu 11	130	3,46	0,75	25,83
Kyselina citronová	příkladu 5	106	3,15	0,78	20,53
Kyselina vinná	příkladu 8	95	3,01	0,49	16,49

Tabulka s hodnotami pevnosti a deformace vláken z palmitoylu hyaluronanu připravených obdobným způsobem jako v příkladu 12 a 13.

Lázeň	Dle příkladu	Koncentrace [%]	st. substituce [%]	Jemnost [tex]	Pevnost cN/dtex	Tažnost [%]
20 % vodný roztok mléčné	13	5,7	52	12,2	0,93	39
20 % vodný roztok mléčné	12	7	15	16,3	0,56	13
20 % vodný roztok mléčné	12	7,4	8	16,1	0,47	5
20 % vodný roztok mléčné	12	6	41	15	0,55	37
20 % vodný roztok mléčné	12	6	36	17	0,47	29
20 % vodný roztok mléčné	13	6,3	48	11,2	0,86	20
20 % vodný roztok mléčné	13	6,3	48	11	0,86	17

- 5 Z měření mechanických vlastností vláken a experimentálních zkoušek vyplývá, že vlákna jsou schopná textilního zpracování.

Příklad 32

10 Vlákna z palmitoylu hyaluronanu (vlákna připravená obdobným způsobem jako je uvedeno v příkladu 12) byla seskána na skacím zařízení při otáčkách vřetene 1400 ot·min⁻¹ a rychlosti podávání monofilamentu 4 m·min⁻¹. Nitě z palmitoylu hyaluronanu jsou znázorněny na obr. 9.

Příklad 33

15 Vlákna, připravená obdobným způsobem jako v příkladu 12 byla textilně zpracována na provozním plochem zátěžném pletacím stroji Shima-Seiki s automatickou volbou

jehel do formy zátažné jednolící pleteniny (obrázek 10) a dále pak do formy zátažné oboulící pleteniny (obrázek 11).

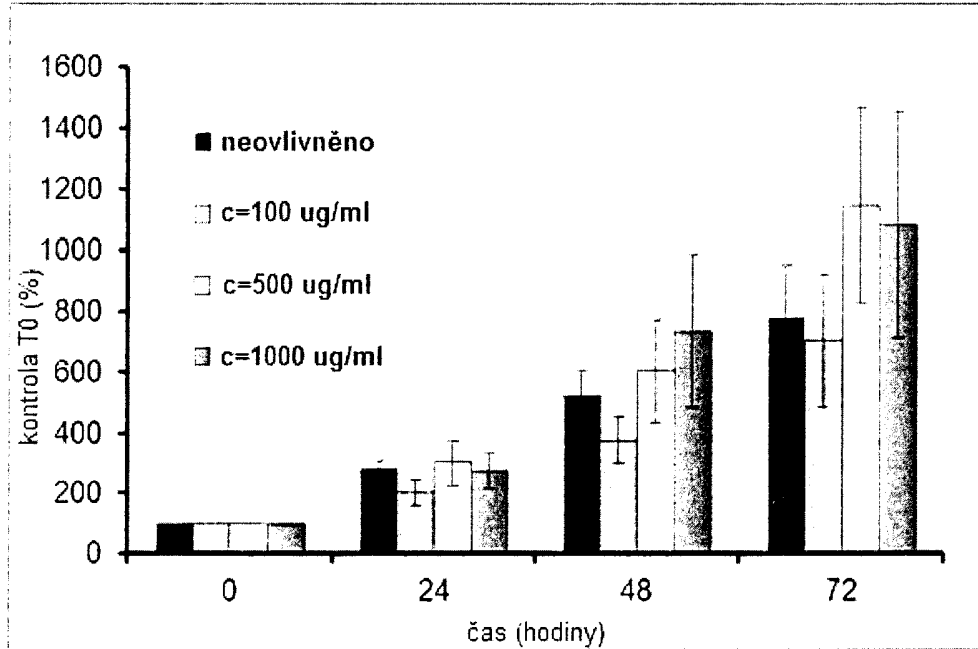
5 Vlákna, připravená obdobným způsobem jako v příkladu 12, byla textilně zpracována na provozním okrouhlém zátažném pletacím stroji Harry Lucas do formy okrouhlé pleteniny (obrázek 12).

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Způsob přípravy vláken na bázi hyaluronanu C₁₁–C₁₈-acylovaného na hydroxylových skupinách hyaluronanu, **vyznačující se tím, že** se připraví zvláknovací roztok obsahující acylovaný hyaluronan o koncentraci v rozmezí 0,01 % hmotn. až 15 % hmotn. ve směsi vody a propan-2-olu, kde obsah vody je v rozmezí 30 % obj. až 90 % obj. obsah propan-2-olu je 10 % obj. až 70 % obj., načež se zvláknovací roztok zavádí do koagulační lázně obsahující vodný roztok organické kyseliny nebo její soli alkalických kovů nebo kovů alkalických zemin, kde kyselina je vybrána ze skupiny zahrnující kyselinu mléčnou, vinnou, citronovou, jablečnou, askorbovou, šťavelovou nebo jejich kombinaci, za vzniku vláken, která se následně promyjí alkoholem a suší.
2. Způsob přípravy podle nároku 1, **vyznačující se tím, že** hyaluronan je acylovaný přednostně na primárním alkoholu N-acetyl-glukosaminu.
3. Způsob přípravy podle nároků 1 nebo 2, **vyznačující se tím, že** hyaluronan je vybrán ze skupiny zahrnující hyaluronany C₁₁–C₁₂-acylované se stupněm substituce 30 % a vyšším, C₁₃–C₁₅-acylované se stupněm substituce 20 % a vyšším, a C₁₆–C₁₈-acylované se stupněm substituce 5 % a vyšším.
4. Způsob přípravy podle kteréhokoli z předchozích nároků, **vyznačující se tím, že** hyaluronan je palmitoyl hyaluronan.
5. Způsob přípravy podle kteréhokoli z předchozích nároků, **vyznačující se tím, že** koncentrace vodného roztoku organické kyseliny v koagulační lázni je pro kyselinu mléčnou 0,5 % až 30 % hmotn., pro kyselinu vinnou 0,01 % až 57 % hmotn., pro kyselinu citronovou 0,5 % až 42 % hmotn., pro kyselinu jablečnou 0,5 % až 50 % hmotn., pro kyselinu askorbovou 0,5 % až 25 % hmotn., pro kyselinu šťavelovou 0,5 % až 60 % hmotn.
6. Způsob přípravy podle kteréhokoli z předchozích nároků, **vyznačující se tím, že** koagulační lázeň je tvořena nasyceným vodným roztokem organické kyseliny.
7. Způsob přípravy podle kteréhokoli z předchozích nároků, **vyznačující se tím, že** koagulační lázeň je tvořena nasyceným vodným roztokem kyseliny mléčné.

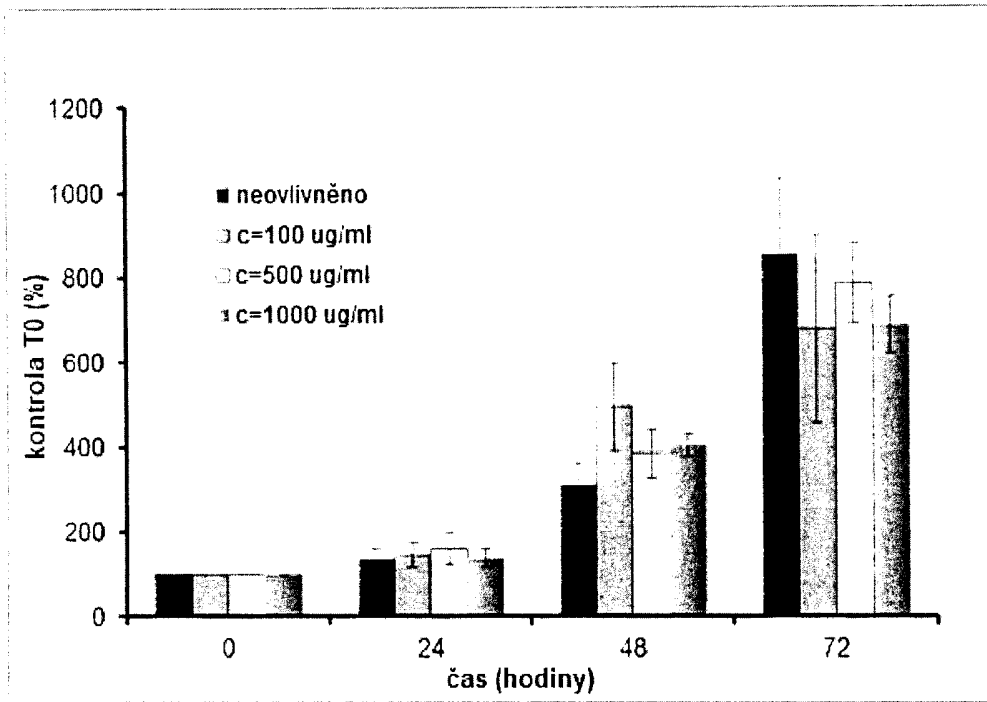


Obr. 1

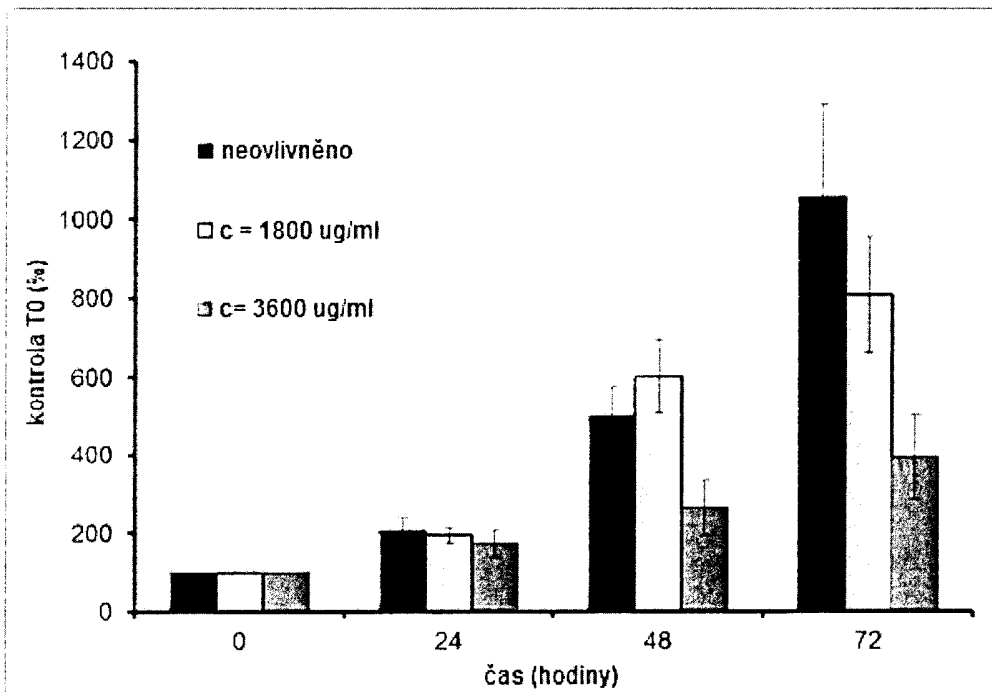


Obr. 2

5

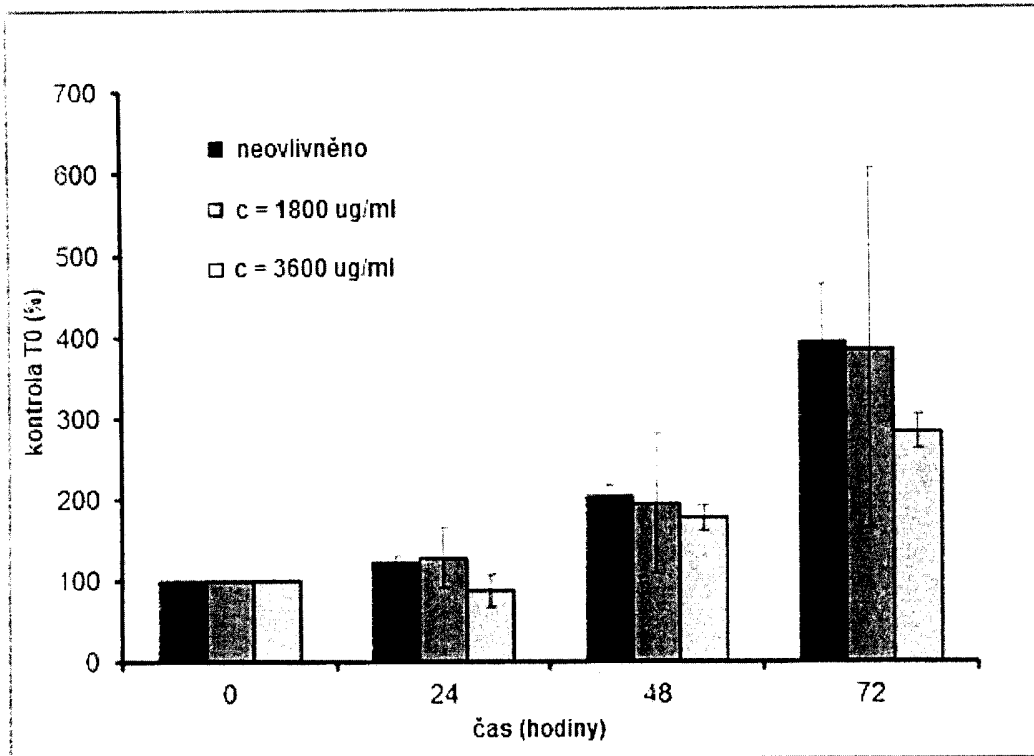


Obr. 3

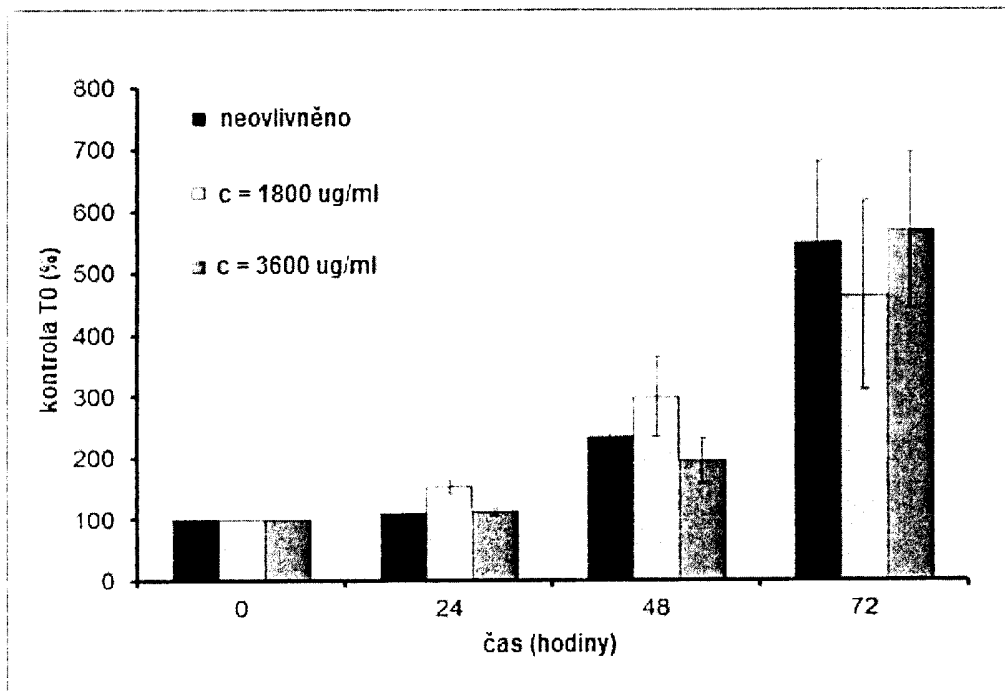


Obr. 4

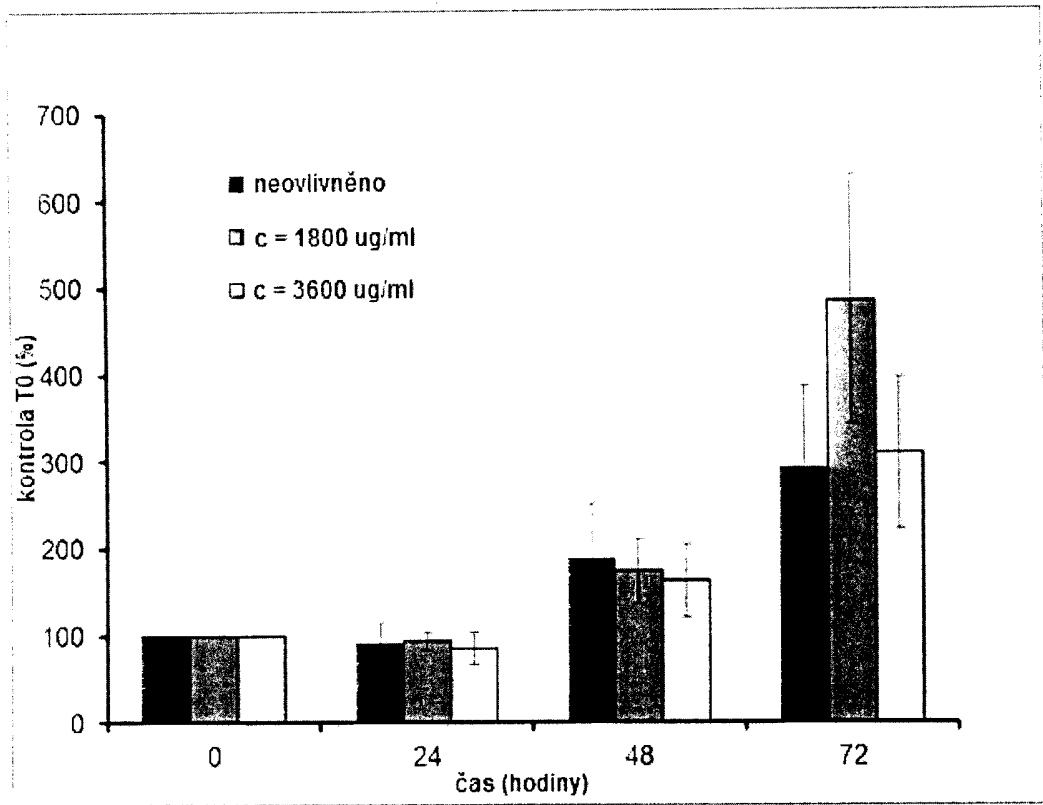
5



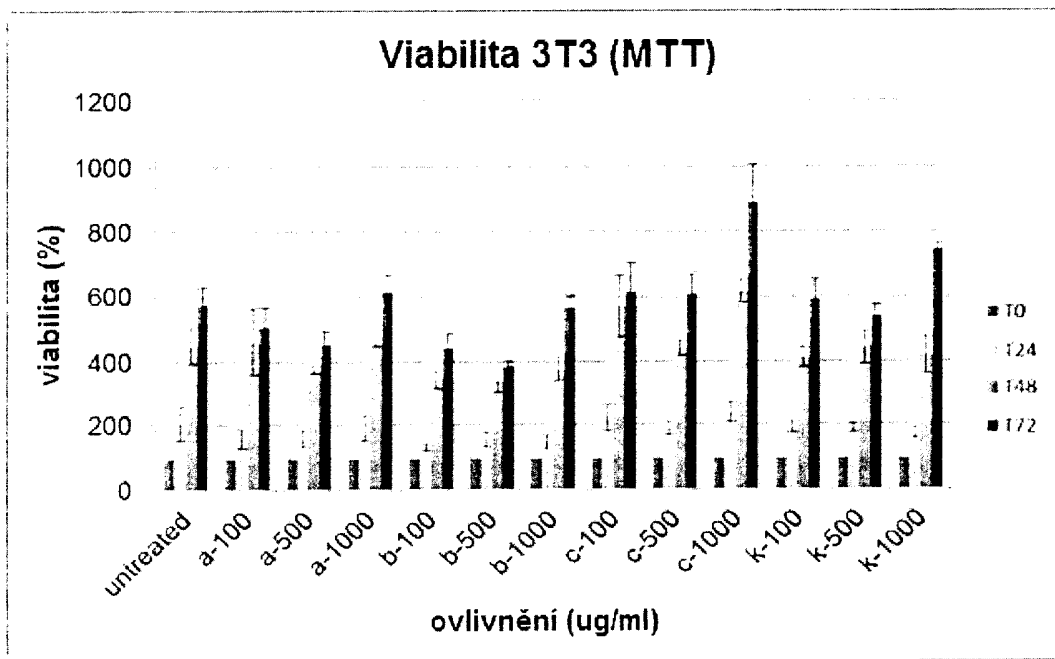
Obr. 5



Obr. 6



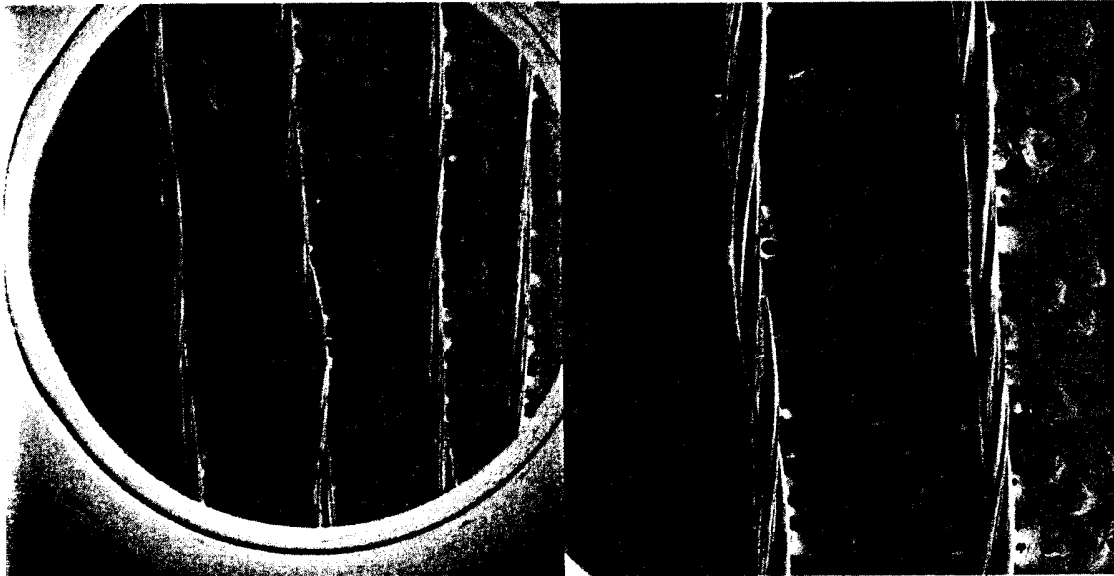
Obr. 7



Obr. 8

PV 2012-841

5/7

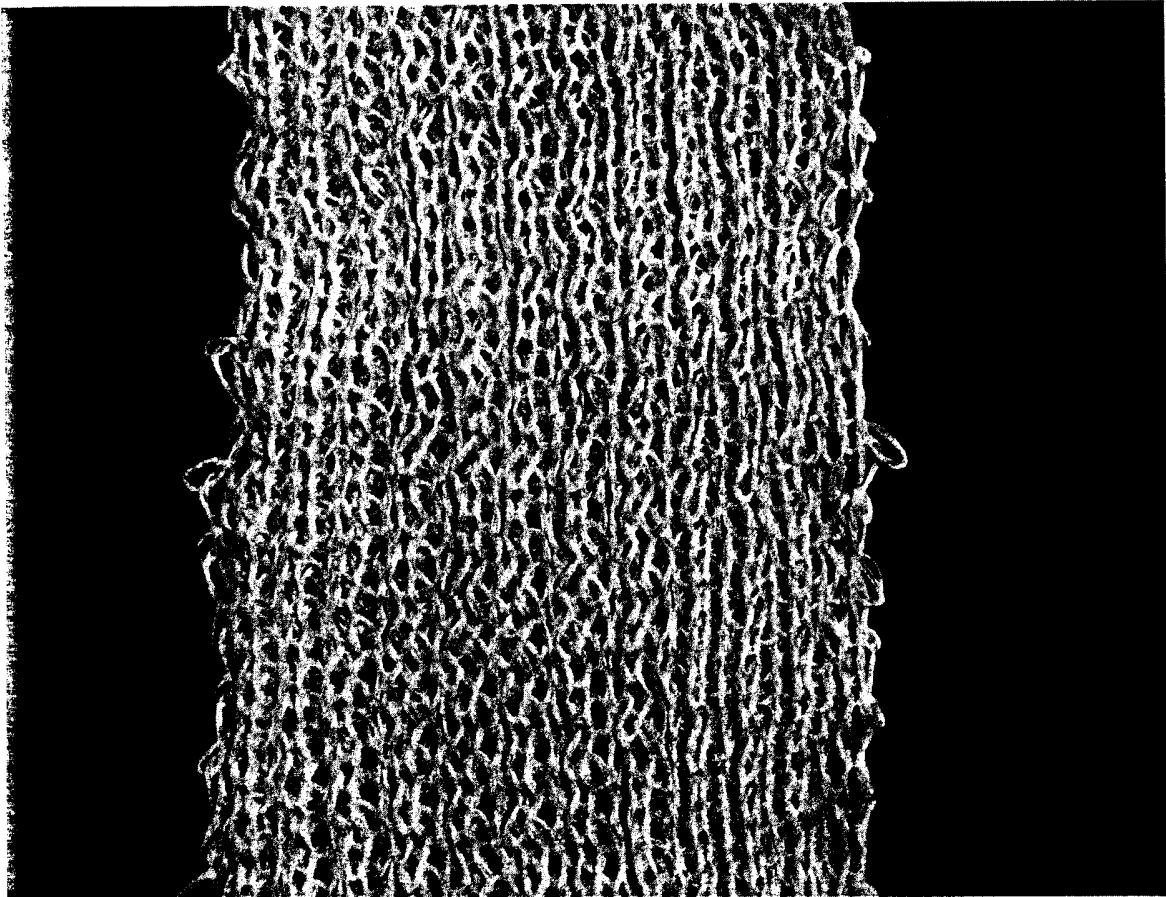


SEM HV: 5.00 kV WD: 3.6877 mm VEGA\\ TESCAN SEM HV: 5.00 kV WD: 3.4265 mm VEGA\\ TESCAN
SEM MAG: 26 x Det: SE Detector 2 mm SEM MAG: 44 x Det: SE Detector 1 mm
Date(m/d/y): 11/15/11 SM: FIELD Digital Microscopy Imaging Date(m/d/y): 11/15/11 SM: FIELD Digital Microscopy Imaging

Obr. 9

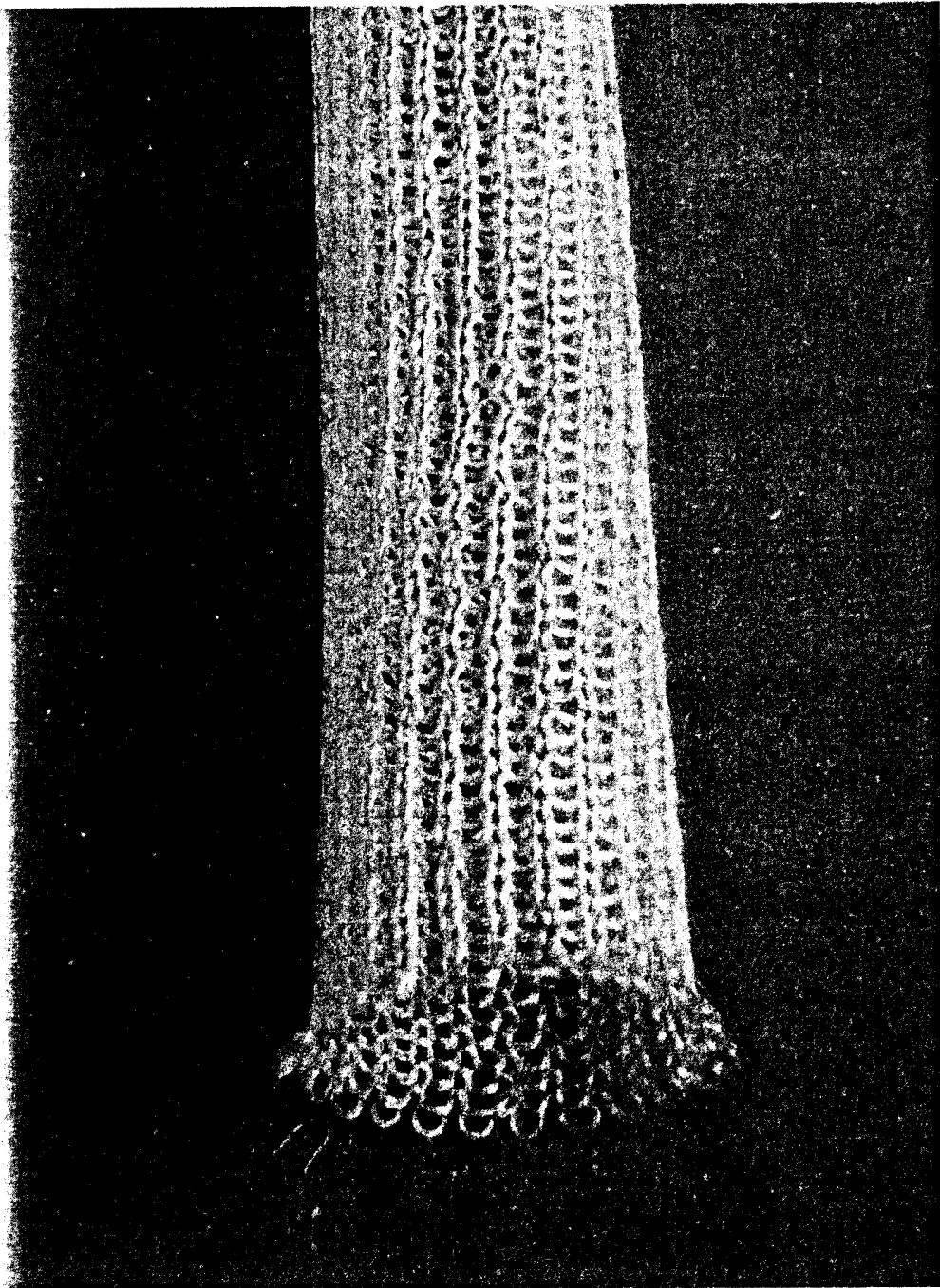


Obr. 10



Obr. 11

7/7



Obr. 12