



F10000947788



SUOMI-FINLAND

(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen(B) (11) KUULUTUSJULKAISU
UTLAGGNINGSSKRIFT

94778

C (45) Patentti myönnetty
Patent meddelat 25 10 1988

(51) Kv.1k.6 - Int.cl.6

D 01F 1/02, 13/00 // C 08B 37/08

(21) Patenttihakemus - Patentansökning	892710
(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag	02.06.89
(24) Alkupäivä - Löpdag	08.07.86
(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig	02.06.89
(44) Nähtäväksipanon ja kuul.julkaisun pvm. - Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad	14.07.95
(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet	
08.07.85 IT 48322/85 P	30.06.86 IT 48202/86 P

(71) Hakija - Sökande

1. Fidia S.p.A, Via Ponte della Fabbrica, 3/A, 35031 Abano Terme, Italy, (IT)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1. della Valle, Francesco, Via Cerato 14, Padova, Italy, (IT)
2. Romeo, Aurelio, Viale-Ippocrate 93, Roma, Italy, (IT)

(74) Asiamies - Ombud: Seppo Laine Oy

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Menetelmä hyaluronihappestereistä tai niiden suoloista koostuvien kalvojen tai kuitujen valmistamiseksi sekä ei-terapeuttisesti käytettävät hyaluronihappestereistä tai niiden suoloista valmistetut kuidut ja kalvot
Förfarande för framställning av membraner eller fibrer bestående av hyaluronsyraestrar eller deras salter samt av hyaluronsyraestrar eller deras salter framställda, icke-terapeutiskt användbara fibrer och membraner

(62) Jakamalla erotettu hakemuksesta - Avdelad från ansökan: 862878 (kuul.julk. - utl.skr. 94766)

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

Chemical Abstracts, vol. 80 (1974), 92658y, I.V. Vikha et al., Biokhimiya 1973, p. 1237-1242 (venäjänkiel.), Journal of Bacteriology, vol. 139, nro 3, syyskuu 1979, K.-E., Jäger et al. "Metyl ester of hyaluronate is unable to stimulate exolipase formation by serratia marcescens", p. 1065-1067, J. Biol. Chem., vol. 186 (1950), R.W. Jeanloz et al., "Studies on hyalceronic acid and related substances", p. 495-511

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Keksinnön kohteena on menetelmä hyaluronihappestereistä tai niiden suoloista koostuvien kalvojen ja kuitujen muodostamiseksi, jossa hyaluronihapon esteri liuotetaan orgaaniseen liuottimeen, liuos saatetaan kalvo- tai vastaavasti kuitumuotoon, minkä jälkeen orgaaninen liuotin poistetaan käsittelemällä sitä ensimmäisen liuottimeen liukenevalla sopivalla orgaanisella tai vesipitoisella liuottimella. Vaihtoehtoisesti liuotin poistetaan käsittelemällä sitä sähkövirralla tai sopivasti kuumennetulla inerttikaasulla. Keksinnön mukaiset tuotteet soveltuvat käytettäväksi etenkin kirurgisissa tuotteissa ja saniteettituotteissa.

Uppfinningen avser ett förfarande för framställning av folier eller fibrer av hyaluronsyrastrar eller salter därav, enligt vilket förfarande hyalurosyraestern löses i ett organiskt lösningsmedel, lösningen överförs i folie- respektive fiberform, varefter det organiska lösningsmedlet avlägsnas genom behandling med ett lämpligt organiskt eller vattenhaltigt lösningsmedel som löser sig en det första lösningsmedlet. Alternativt avlägsnas det organiska lösningsmedlet genom behandling med elström eller en lämpligt upphettad inertgas.

Produkterna som framställts enligt uppfinningen lämpar sig för användning framförallt i kirurgiska artiklar och i sanitetsprodukter.

Menetelmä hyaluronihappoestereistä tai niiden suoloista koostuvien kalvojen tai kuitujen valmistamiseksi sekä ei-terapeuttisesti käytettävät hyaluronihappoestereistä tai niiden suoloista valmistetut kuidut ja kalvot,

Keksinnön kohteena on patenttivaatimusten 1 ja 3 johdantojen mukaiset menetelmät hyaluronihappoestereistä tai niiden suoloista koostuvien kalvojen ja kuitujen valmistamiseksi. Keksinnön kohteena on myös patenttivaatimuksen 8 johdannon mukaiset, ei-terapeuttisesti käytettävät, hyaluronihappoestereistä tai niiden suoloista valmistetut kuidut ja kalvot, jotka soveltuvat saniteetti- ja kirurgiseen käyttöön.

Seuraavassa kuvataan esillä olevan keksinnön lisäksi hyaluronihappoesterien ja niiden suolojen valmistusta, ominaisuuksia ja käyttöä yleisemmin.

Käsitettä "hyaluronihappo" (seuraavassa myös lyhennettynä "HY") käytetään kirjallisuudessa määrittämään hapanta polysakkaridia, jolla on erilaisia molekyyllipainoja ja joka muodostuu D-glukoronihapon ja N-asetyyli-D-glukosamiinin tähteistä, joita esiintyy luonnollisesti sellulaarisissa pinnoissa, selkärakaisten sidekudosten emäksisissä solun ulkoisissa aineissa, nivelten synoviaalisessa nesteessä, silmän lasiaisnesteessä, ihmisen napanuoran kudoksessa ja kukon heltoissa.

Hyaluronihapolla on tärkeä merkitys biologisessa organismissa, ensinnäkin useiden kudosten, kuten ihon, jänteiden, lihasten ja rustojen solujen mekaanisena tukena ja tästä syystä solun sisäisen matriisin komponenttina. Mutta hyaluronihapolla on myös muita toimintoja biologisissa prosesseissa, kuten kudosten kostutus, voitelu, solumigraatio, solutoiminta ja erittely (ks. esimerkiksi A. Balazs et al., *Cosmetics & Toiletries*, No. 5/84, s. 8 - 17). Hyaluronihappo voidaan uuttaa yllä mainituista luonnollisista kudoksista, kuten kukon heltoista, tai myös määrättyistä bakteereista. Nykyisin hyaluronihappo voidaan valmistaa myös mikrobiologisilla menetelmillä. Uuttamalla

saadun koko hyaluronihapon molekyylipaino on 8 - 13 miljoonaa. Kuitenkin polysakkaridin molekyyliketjua voidaan hajottaa melko helposti erilaisten fysikaalisten ja kemiallisten tekijöiden vaikutuksessa, kuten mekaanisessa vaikutuksessa tai säteilytyksen, hydrolysointi-, hapetus- tai entsyymaattisten aineiden vaikutuksessa. Tästä syystä alkuperäisten uutteen tavallisissa puhdistusmenetelmissä saadaan hajotettuja fraktioita, joilla on alhaisempi molekyylipaino (ks. Balazs et al., ks. yllä). Hy-aluronihappoa, sen molekyylifraktiota ja vastaavia suoloja on käytetty lääkeaineina ja niiden käyttöä on ehdotettu myös kosmetiikassa (ks. esimerkiksi yllä mainittu artikkeli Balazs et al. ja FR-patentti 2 478 468).

Terapeuttisena aineena hyaluronihappoa ja sen suoloja on käytetty olennaisesti terapiassa artropatiaan, kuten veterinaarilääketieteessä hevosten artriitin hoitamiseksi [Acta Vet. Scand. 167, 379 (1976)]. Luonnollisten kudosten ja elinten apu- ja korvaavana terapeuttisena aineena hyaluronihappoa, sen molekyylifraktioita ja sen suoloja on käytetty oftalmisessa kirurgiassa (ks. esimerkiksi Salazs et al., Modern Problems in Ophthalmology, Vol. 10, 1970, s. 3 Strieff, S. Karger, Basel; Viscosurgery and the Use of Sodium Hyaluronate During Intraocular Lens Implantation, Paper presented at the International Congress and First Film Festival on Intraocular Implantation, Cannes, 1979; US-patentti 4 328 803 kirjallisuuden yhteenvedona HY:n käytöstä oftalmologiassa, ja US-patentti 4 141 973).

IT-patenttihakemuksessa 49 143A83, 11.10.1983, esitetään hyaluronihapon molekyylifraktio, jota voidaan käyttää esimerkiksi natriumsuolana, intraokulaarisiin ja intra-artikulaarisiin injektioihin, jotka soveltuvat korvaamaan silmän sisäiset nesteet, ja vastaavasti artropatiaterapiaan.

Hyaluronihappoa voidaan käyttää myös lisäaineena useissa polymeerisissä materiaaleissa, joita käytetään lääketieteellisissä ja kirurgisissa artikkeleissa, kuten polyuretaaneissa,

polyestereissä, polyolefiineissa, polyamideissa, polysiloksaaneissa, vinyyli- ja akryylipolymeereissä ja hiilikuiduissa, jolloin ne tekevät näistä materiaaleista biologisesti sopivia. Tässä tapauksessa HY:n tai sen jokin suola lisätään siten, että peitetään tällaisten materiaalien pinta sillä tai dispergoidaan se näihin tai käytetään näitä molempia yhdessä. Tällaisia materiaaleja voidaan käyttää valmistettaessa sanitäärisiä ja lääketieteellisiä artikkeleita, kuten sydänläppiä, intraokulaarisia linssejä, vaskulaarisia kiinnittimiä, tahdistimia ja vastaavia (ks. US-patentti 4 500 676).

Käsitettä "hyaluronihappo" käytetään yleisesti virheellisessä merkityksessä tarkoittaen, kuten yllä olevasta voidaan nähdä, kaikkia niitä polysakkarideja, joissa on erilaiset, vaihtelevan molekyylipainon omaavat D-glukuronihapon ja N-asetyyli-D-glukosamiinin tähteet. Polysakkarideissa voi jopa esiintyä näiden hajonneita fraktioita. Vaikka monikkomuoto "hyaluronihapot" näin ollen näyttäisi tarkoituksenmukaisemmalta, käytetään tämän hakemuksen puitteissa kuitenkin yksikkömuotoa, joka tarkoittaa hyaluronihappoa sen erilaisissa muodoissa mukaanlukien sen molekyylifraktiot. Lyhennettä "HY" käytetään usein myös kuvaamaan sen kollektiivista muotoa.

Mitä tulee hyaluronihapon estereihin, kirjallisuudessa on esitetty hyaluronihapon metyyliesteri, jolla on korkea molekyyliaino ja joka saadaan uuttamalla ihmisen napanuoria [Jeanloz et al., J. Biol. Chem. 186 (1950), 495 - 511 ja Jager et al., J. Bacteriology 1065 - 1067 (1979)]. Tämä esteri saadaan käsittelemällä vapaa hyaluronihappo diatsometaanilla eetteriliuoksessa ja siinä on esteröity olennaisesti kaikki karboksyyli-ryhmät. Edelleen HY:n oligomeerien metyylieste-
reitä, joissa on n. 5 - 15 disakkaridiyksikköä, on myös esitetty [ks. Biochem. J. (1977) 167, 711 - 716]. Samoin on esitetty hyaluronihapon metyyliesteri, joka on esteröity metyylialkoholilla osassa hydroksyylialkoholiryhmistä [Jeanloz et al., J. Biol. Chem. 194 (1952), 141 - 150 ja Jeanloz et al., Helvetica Chimica Acta 35 (1952), 262 - 271]. Näiden

esterien biologista aktiivisuutta ja siten niiden farmaseuttista käyttöä ei ole esitetty.

Kantahakemuksessa 862878 on esitetty hyaluronihapon uusia estereitä, jotka on muodostettu alifaattisista, aralifaattisista, sykloalifaattisista tai heterosyklisista alkoholeista ja joissa kaikki tai ainoastaan osa hapon karboksyyli-ryhmistä on esteröity. Näillä estereillä ja mainittujen osittaisten esterien suoloilla, jotka on valmistettu metalleista tai orgaanisista emäksistä ja jotka ovat biologisesti sopivia tai farmaseuttisesti käyttökelpoisia, on mielenkiintoisia ja arvokkaita bioplastisia ja farmaseuttisia ominaisuuksia ja niitä voidaan käyttää useilla aloilla, esimerkiksi kosmetiikassa, kirurgiassa ja lääketieteessä. Hyaluronihapon ollessa kyseessä, uusilla tuotteilla on kvalitatiivisesti samat tai samankaltaiset fysikaalis-kemialliset, farmakologiset ja terapeuttiset ominaisuudet. Ne ovat lisäksi huomattavasti vakaampia luonnollisia entsyymejä, kuten etenkin hyaluronidasia, vastaan, jotka entsyymit hajottavat polysakkaridimolekyyliä elimistössä. Uudet esterit ja osittaiset esterit säilyttävät tästä syystä yllä mainitut ominaisuutensa hyvin pitkiä ajanjaksoja.

Esillä olevassa keksinnössä käytetään kalvojen ja kuitujen valmistukseen erilaisia kantahakemuksessa 862878 mainittuja estereitä ja osittaisia estereitä.

Hyaluronihappoesterien ensimmäisen ryhmän muodostavat ne esterit, joita voidaan käyttää terapiassa samoin kuin muilla yllä mainituilla aloilla. Näissä itse hyaluronihapon ominaisuudet vallitsevat ja niitä voidaan käyttää hyväksi. Tällaiset esterit on johdettu yllä mainituista alkoholeista, joilla itsellään ei ole merkittävää farmakologista vaikutusta, kuten esimerkiksi alifaattisista tyydyttyneistä alkoholeista tai yksinkertaisista sykloalifaattisista alkoholeista.

Toisen esteriryhmän, joita estereitä myös voidaan käyttää

terapiassa, muodostuvat yhdisteistä, joissa alkoholikomponentin farmakologiset laadut ovat vallitsevia. S.o. HY:n esterit, jotka on muodostettu farmakologisesti aktiivisista alkoholeista, kuten steroidialkoholista, esim. kortisonityyppisistä alkoholeista, joilla on tulehdusten vastainen vaikutus. Näillä yhdisteillä on ominaisuuksia, jotka ovat kvalitatiivisesti samanlaisia kuin alkoholin ominaisuudet, mutta niillä on eritellympi vaikutusalue verrattuna jo tunnettuihin estereihin, jolloin ne varmistavat paremmin tasapainotetun, vakion ja säännöllisen farmakologisen vaikutuksen ja ne saavat tavallisesti aikaan selvän hidastetun vaikutuksen.

Kolmannen HY:n esterien ryhmän muodostavat sellaiset esterit, joilla on vaihtelevampi luonne kuin kahdella edellisellä esteriryhmällä. S.o. esterit, joissa osa HY:n karboksyyli-ryhmistä on esteröity farmakologisesti aktiivisella alkoholilla ja toinen osa farmakologisesti neutraalilla alkoholilla tai sellaisella, jonka aktiivisuus on mitätön. Esteröintikomponenttina käytettyjen näiden kahden erityyppisen alkoholin sopivan annosteluprosentin avulla on mahdollista saada estereitä, joilla on sama farmakologinen aktiivisuus kuin farmakologisesti aktiivisella alkoholilla ilman hyaluronihapon spesifistä aktiivisuutta, mutta joilla on yllä mainitut paremman stabiiliuden ja biologisen sopivuuden ominaisuudet halutun ja farmakologisesti aktiivisen alkoholin luonteenomaisen aktiivisuuden suhteen ja farmakologisesti inertin alkoholin esteriryhmien ansiosta.

Neljännän esterien ryhmän muodostavat ne, joilla on sekaluonne ja joissa esteriryhmät johtuvat kahdesta erilaisesta terapeuttisesti aktiivisesta aineesta. Tässä tapauksessa myös esterit voivat olla osittaisia tai kokonaisia, s.o. vain muutamat karboksyyli-ryhmät on esteröity kahdella erilaisella terapeuttisesti aktiivisella alkoholilla, esimerkiksi kortisonistereoidilla ja antibiootilla tai fenotiatsiinilla, kun taas karboksyyli-ryhmät voivat olla vapaita tai muodostettu suolaksi, esimerkiksi alkalimetalleilla, etenkin natriumilla, tai

kaikki karboksyyliiryhmät on esteröity yllä mainituilla alkoholeilla. On kuitenkin myös mahdollista valmistaa estereitä kolmen tai useamman alkoholikomponentin kanssa, kuten estereitä, joissa osa karboksyyliiryhmistä on esteröity terapeuttisesti aktiivisella alkoholilla, toinen osa toisella terapeuttisesti aktiivisella alkoholilla, kolmas osa terapeuttisesti inaktiivisella alkoholilla ja neljäs osa on muodostettu mahdollisesti suolaksi metallilla ja terapeuttisesti aktiivisella tai inaktiivisella emäksellä tai se käsittää vapaassa muodossa esiintyviä karboksyyliiryhmiä.

Yllä mainituissa estereissä, joissa muutamat karboksyylihaporyhmät pysyvät vapaina, nämä voidaan muodostaa suolaksi metallien tai orgaanisten emästen, kuten alkali- tai maa-alkalimetallien tai ammoniakkin tai typpipitoisten orgaanisten emästen kanssa.

Esillä oleva keksintö perustuu mm. siihen, että useimmat HY:n estereistä, päinvastoin kuin itse HY, omaavat määrätynasteisen liukenevuuden orgaanisissa liuottimissa. Tämä liukenevuus riippuu esteröityjen karboksyyliiryhmien prosenttimäärästä ja karboksyyliin liitetyn alkyyliryhmän tyypistä. Tästä syystä HY-yhdiste, jonka kaikki karboksyyliiryhmät on esteröity, omaa huoneenlämpötilassa hyvän liukenevuuden esimerkiksi dimetyylisulfoksidissa (HY:n bentsyyliesteri liukenee DMSO:ssa 200 mg/ml:n määränä). Useimmat HY:n kokonaisestereistä liukenevat heikosti veteen päinvastoin kuin HY ja etenkin sen suolat.

Edellä mainitut liukenevuusominaisuudet yhdessä erityisten ja merkittävien viskoelastisten ominaisuuksien kanssa mahdollistavat HY-esterien käytön saniteetti- ja lääketieteellisten valmisteiden valmistamiseksi, jotka eivät liukene suolaliuokseen ja joilla on erityinen haluttu muoto. Nämä materiaalit saadaan valmistamalla HY-esterin liuos orgaanisessa liuottimessa, muodostamalla erittäin viskoosi liuos halutun artikkelin muotoon ja uuttamalla orgaaninen liuotin toisella liuottimella, joka sekoittuu ensimmäisen kanssa, mutta jossa HY-este-

ri ei liukene.

Täsmällisemmin sanottuna keksinnön mukaiselle menetelmälle on pääasiallisesti tunnusomaista se, mikä on esitetty patenttivaatimuksen 1 ja vastaavasti patenttivaatimuksen 3 tunnusmerkkiosissa.

Keksinnön mukaisille tuotteille on puolestaan tunnusomaista se, mikä on esitetty patenttivaatimuksen 8 tunnusmerkkiosassa.

Tässä keksinnössä käytettävät hyaluronihapon esterit ovat kaikki uusia paitsi edellä mainittu hyaluronihapon metyyli-esteri, joka uutetaan ihmisen napanuorista, ja HY:n yllämainittujen oligomeerien metyyliesterit. Samoin uusia ovat tästä syystä hyaluronihapon osittaiset esterit, jotka on valmistettu metyylialkoholista, ja niiden metallisuolat tai orgaanisista emäksistä muodostetut suolat. Kuten jo kanta-hakemuksessa todetaan ovat yllä mainittujen kirjallisuudessa esitettyjen metyyliesterien biologiset ja farmakologiset aktiivisuudet tuntemattomia, samoin kuin niiden erinomaiset bioplastiset ominaisuudet ja erittäin hyvä stabiilius.

Hyaluronihapon karboksyyli-ryhmien esteröintikomponentteina käytettäviä alifaattisia alkoholeja ovat esimerkiksi sellaiset, joissa on korkeintaan 34 hiiliatomia, jotka voivat olla tyydyttyneitä tai tyydyttymättömiä ja jotka voivat olla mahdollisesti substituoituja muilla vapailla funktionaalisilla tai funktionaalisesti muunnetuilla ryhmillä, kuten amiini-, hydroksyyli-, aldehydi-, ketoni-, merkaptani- tai karboksyyli-ryhmillä tai ryhmillä, jotka on johdettu näistä, kuten hydrokarbyyli- tai di-hydrokarbyyliamiiniryhmillä (tästä lähtien käsitettä "hydrokarbyyli" käytetään tarkoittamaan sekä monovalenttisiä hiilivetyjen radikaaleja, kuten C_nH_{2n+1} -tyyppiä, että bivalenttisiä tai trivalenttisiä radikaaleja, kuten "alkyleenejä" C_nH_{2n} tai "alkylideenejä" C_nH_{2n}), eetteri- tai esteriryhmillä, asetaali- tai ketaaliryhmillä, tioeetteri- tai

tioesteriryhmillä ja esteröidyillä karboksyyli- tai karbamidiryhmillä ja karbamidilla, joka on substituoitu yhdellä tai useammalla hydrokarbyyliryhmällä, nitriiliryhmillä tai halogeeneilla.

Yllä mainituista, hydrokarbyyliradikaaleja sisältävistä ryhmistä etusijalla ovat alemmat alifaattiset radikaalit, kuten alkyylit, joissa on korkeintaan 6 hiiliatomia. Tällaiset alkoholit voi olla myös katkaistu hiiliatomiketjussa heteroatomeilla, kuten happi-, typpi- tai rikkiatomeilla. Etenkin käytetään alkoholeja, jotka on substituoitu yhdellä tai kahdella edellä mainitulla funktionaalisella ryhmällä.

Yllä mainitun ryhmän alkoholeja ovat sellaiset, joissa on korkeintaan 12 ja etenkin 6 hiiliatomia, ja joissa hydrokarbyyliatomit yllä mainituissa amiini-, eetteri-, esteri-, tioeetteri-, tioesteri-, asetaali-, ketaaliryhmissä merkitsevät alkyyliryhmiä, joissa on korkeintaan 4 hiiliatomia, ja myös esteröidyissä karboksyyli- tai substituoiduissa karbamidiryhmissä hydrokarbyyliryhmät ovat alkyylejä, joissa on sama määrä hiiliatomeja, ja joissa amiini- tai karbamidiryhmissä voi olla alkyleeniamiini- tai alkyleenikarbamidiryhmiä, joissa on korkeintaan 8 hiiliatomia. Näistä alkoholeista mainittakoon etenkin sellaiset, jotka ovat tyydyttyneitä ja substituomattomia, kuten metyyli-, etyyli-, propyyli- ja isopropyylialkoholit, n-butyylialkoholi, isobutyylialkoholi, tert.-butyylialkoholi, amyli-, pentyyli-, heksyyli-, oktyyli-, nonyyli- ja dodekyylialkoholit ja ennen kaikkea sellaiset, joissa on suora ketju, kuten n-oktyyli- ja dodekyylialkoholit. Tämän ryhmän substituoiduista alkoholeista mainittakoon bivalenttiset alkoholit, kuten etyleeniglykoli, propyleeniglykoli ja butyleeniglykoli, trivalenttiset alkoholit, kuten glyseroli, aldehydialkoholit, kuten tartronialkoholi, karboksyylialkoholit, kuten maitohapot, esimerkiksi glykolihappo, omenahappo, viinihapot, sitruunahappo, aminoalkoholit, kuten normaali aminoetanoli, aminopropanoli, normaali aminobutanoli ja niiden amiinifunktiossa dimetyloidut ja dietyloidut johdannaiset,

koliini, pyrrolidinyylietanoli, piperidinyylietanoli, piperat-sinyylietanoli ja vastaavat n-propyyli- ja n-butyylialkoholin johdannaiset, monotioetyleeniglykoli tai sen alkyyljohdannaiset, kuten merkaptaanifunktion etyylijohdannainen.

Korkeammista tyydyttyneistä alifaattisista alkoholeista tulisi mainita seuraavat: setyylialkoholi ja myristyylialkoholi, erittäin tärkeitä ovat korkeammat tyydyttymättömät, yhden tai kaksi kaksoissidosta sisältävät alkoholit, kuten etenkin sellaiset, jotka sisältyvät useihin eteerisiin öljyihin ja joilla on affiniteetti terpeenin suhteen, kuten sitronellooli, geranioli, neroli, nerolidoli, linalooli, farnesoli, fytoli. Tyydyttymättömistä alemmista alkoholeista mainittakoon sellaiset, joissa on vain yksi bentseenitähde ja joissa alifaattisessa ketjussa on korkeintaan 4 hiiliatomeja, joissa bentseenitähde voi olla substituoitu 1 - 3 metyyli- tai hydroksyyli-ryhmällä tai halogeeniatomeilla, etenkin kloorilla, bromilla ja jodilla, ja joissa alifaattinen ketju voi olla substituoitu yhdellä tai useammalla funktiolla, kuten vapaalla amiiniryhmällä tai mono- tai dimetyloidulla tai pyrrolidiini- tai piperidiiniryhmällä. Näistä alkoholeista mainittakoon etenkin bentsyylialkoholi ja fenetyylialkoholi.

Hyaluronihappoestereitä voidaan muodostaa myös sykloalifaattisista tai alifaattis-sykloalifaattisista alkoholeista, jotka voivat johtua mono- tai polysyklisistä hiilivedyistä, niissä on mieluummin korkeintaan 34 hiiliatomeja, ne voivat olla substituomattomia ja voivat sisältää yhden tai useamman substituentin, kuten jonkin yllä alifaattisten alkoholien yhteydessä mainitun. Syklisistä yksirenkaisista hiilivedyistä johtuvista alkoholeista mainittakoon etenkin sellaiset, joissa on korkeintaan 12 hiiliatomeja, renkaissa on mieluummin 5 - 7 hiiliatomeja, jotka voivat olla substituoituja esimerkiksi 1 - 3 alempialkyyliryhmällä, kuten metyyli-, etyyli-, propyyli- tai isopropyyli-ryhmällä. Tämän ryhmän erityisinä alkoholeina voidaan mainita seuraavat: sykloheksanoli, sykloheksaanidioli, 1,2,3-sykloheksaanitrioli ja 1,3,5-sykloheksaanitrioli (floro-

glusitoli), inositoli, ja alkoholit, jotka johtuvat p-metaanista, kuten karbomentoli, mentoli ja α -, β -terpineoli, 1-terpinoeli, 4-terpineoli ja piperitoli tai näiden alkoholien seos, joka tunnetaan "terpineolina", 1,4- ja 1,8-terpiini. Alkoholeista, jotka johtuvat hiilivedyistä, joissa on kondensoitu rengas, kuten tujaanista, pinaanista tai komfaanista, voidaan mainita seuraavat: tujanoli, sabinoli, pinohydraatti, D- ja L-borneoli ja D- ja L-isoborneoli.

Estereissä käytettäviä alifaattis-sykloalifaattisia polysyklisiä alkoholeja ovat sterolit, koolihapot ja steroidit, kuten sukhormonit ja niiden synteettiset analogit, etenkin kortikosteroidit ja niiden johdannaiset. Tästä syystä on mahdollista käyttää seuraavia: kolesteroli, dihydrokolesteroli, epidihydrokolesteroli, koprostanoli, epikoprostanoli, sitosteroli, stigmasteroli, ergosteroli, koolihappo, deoksikoolihappo, litokoolihappo, estrioli, estradioli, ekileniini, ekiliini ja niiden alkylaattijohdannaiset, samoin kuin niiden 17-aseman etinyyli- tai propinyylijohtannaiset, kuten 17α -etinyyliestradioli tai 7α -metyyli- 17α -etinyyli-estradioli, pregnenoloni, pregnaanidioli, testosteroni ja sen johdannaiset, kuten 17α -metyylitestosteroni, 1,2-dehydrotestosteroni ja 17α -metyyli-1,2-dehydrotestosteroni, testosteronin ja 1,2-dihydrotestosteronin 17-aseman alkinylaattijohdannaiset, kuten 17α -etinyylitestosteroni, 17α -propinyylitestosteroni, norgestrel, hydroksiprogesteroni, kortikosteroni, deoksikortikosteroni, 19-nortestosteroni, 19-nor- 17α -metyylitestosteroni ja 19-nor- 17α -etinyylitestosteroni, antihormonit, kuten syproteroni, kortisoni, hydrokortisoni, prednisoni, prednisoloni, fluorkortisoni, deksametasoni, betametasoni, parametasoni, flumetasoni, flukinoloni, fluprednylideeni, klobetasoli, beklometasoni, aldosteroni, deoksikortikosteroni, alfaksoloni, alfadoloni, bolasteroni. Esterien esteröintikomponentteina voidaan käyttää seuraavia: kardioaktiivisten glukosidien geniinit (aglykonit), kuten digitoksigeniini ja gitoksigeniini, digoksigeniini, strofantidiini, tigogeniini ja saponiinit.

Muita käytettäviä alkoholeja ovat vitamiinit, kuten akseroftoli, vitamiinit D₂ ja D₃, aneuriini, laktoflaviini, askorbiinihappo, riboflaviini, tiamiini, pantoteenihappo.

Heterosyklisistä hapoista seuraavia voidaan pitää yllä mainittujen sykloalifaattisten tai alifaattis-sykloalifaattisten alkoholien johdannaisina, jos niiden lineaariset tai sykliset ketjut on katkaisu yhdellä tai useammalla, esimerkiksi 1 - 3 heteroatomilla, esimerkiksi ryhmillä -O-, -S-, -N- ja -NH- ja näissä voi olla yksi tai useampi tyydyttymätön sidos, esimerkiksi kaksoissidos, etenkin 1 - 3, jolloin ne sisältävät myös aromaattisen rakenteen omaavia heterosyklisiä yhdisteitä. Esimerkiksi mainittakoon seuraavat: furfuryylialkoholi, alkaloidit ja niiden johdannaiset, kuten atropiini, skopolamini, kinkoniini, 1a-kinkonidiini, kiniini, morfiini, kodeiini, nalorfiini, N-butyyliskopolammoniumbromidi, ajmaliini, fenyylietyyliamiinit, kuten efedriini, isoproterenoli, epinefriini, fenotiatsiinilääkeaineet, kuten ferfenatsiini, pipotiatsiini, karfenatsiini, homofenatsiini, asetofenatsiini, fluofenatsiini, N-hydroksietyyliiprometatsiinikloridi, tioksanteenilääkeaineet, kuten flupentiksoli ja klopentiksoli, antikonvulsiiviset aineet, kuten meprofendioli, antipsykoottiset aineet, kuten opipramoli, antiemeettiset aineet, kuten oksipendyyli, analgeettiset aineet, kuten karbetidiini ja fenoperidiini ja metadoli, hypnoottiset aineet, kuten etodroksitsiini, aneroottiset aineet, kuten bentsidroli ja difemetoksidiini, vähäpätöiset rauhoittavat aineet, kuten hydroksitsiini, lihaksia relaksoivat aineet, kuten kinnamedriini, difylliini, mefensiini, metokarbamoli, klorfenesiini, 2,2-dietyyli-1,3-propanidioli, kvaifenesiini, hydrosilamidi, koronaarivasodilataattori, kuten dipyridamoli ja oksifedriini, adrenergiset salpaajat, kuten propanololi, timololi, pindololi, bupranololi, atenololi, metoprololi, praktololi, antineoplastiset aineet, kuten 6-atsauridiini, sytarabiini, floksuridiini, antibiootit, kuten kloramfenikoli, tiamfenikoli, erytromysiini, oleandomysiini, linkomysiini, antiviraaliset aineet, kuten jodoksuridiini, periferaaliset vasodilataattorit, kuten iso-

nikotinyylialkoholi, karboanhydraasin inhibiittorit, kuten sulokarbilaatti, antiastmaattiset ja anti-inflammatoriset aineet, kuten tiaramidit, sulfamidit, kuten 2-p-sulfanilo-noetanoli.

Kuten yllä on esitetty, joissakin tapauksissa voivat olla mielenkiintoisia hyaluronihappoesterit, joissa esteriryhmät johtuvat kahdesta tai useammasta terapeuttisesti aktiivisesta hydroksyyliaineesta ja luonnollisesti voidaan saada kaikkia mahdollisia muunnelmia. Etenkin mielenkiintoisia ovat ne aineet, joissa on läsnä kaksi erityyppistä esteriryhmää, jotka johtuvat hydroksyyliuonteen omaavista lääkeaineista ja joissa jäljelle jäävät karboksyyliiryhmät ovat vapaita, jotka on muodostettu suolaksi metallien tai yhden tai useamman emäksen kanssa, jolloin mahdollisesti kaikki emäkset ovat itse terapeuttisesti aktiivisia, esimerkiksi niillä on sama tai samankaltainen aktiivisuus kuin esteröintikomponentilla. Etenkin on mahdollista saada hyaluronihappoestereitä, jotka johtuvat toisaalta anti-inflammatorisesta steroidista, kuten jostakin yllä mainitusta, ja toisaalta vitamiinista, alkaloidista tai antibiootista, kuten jostakin yllä mainitusta.

Hyaluronihapon esteröintiaste yllä mainituilla alkoholeilla riippuu ensisijassa saatavista eri käyttöalueiden erityisistä ominaisuuksista, esimerkiksi suuremmasta tai pienemmästä lipofiilisyydestä tai hydrofiilisyydestä määrättyjen kudosten, kuten ihon suhteen.

Normaalisti hyaluronihapon korkea-asteinen esteröinti aina sen täydelliseen esteröintiin asti lisää sen lipofiilistä luonnetta ja tästä syystä vähentää sen vesiliukoisuutta. Kantahakemuksessa mainittujen uusien esterien terapeuttista käyttöä varten on esimerkiksi erittäin tärkeää säätää esteröintiaste huolimatta lipofiilisyyden hyvästä ja lisääntyneestä tasosta hyaluronihappoon tai sen natriumsuolaan verrattuna riittävän hydroliukenevuuden, esimerkiksi 10 mg/ml:n liukenevuuden varmistamiseksi. Luonnollisesti tulee pitää mielessä saman

esteröintikomponentin molekyylikoon vaikutus, joka tavallisesti vaikuttaa vesiliukoisuuteen kääntäen verrannollisesti. Kuten jo mainittiin, hyaluronihapon karboksyyli-ryhmien esteröinnillä voi olla useita merkityksiä, jotka voivat olla käyttökelpoisia eri aloilla, esimerkiksi lääketieteessä, jolloin käytetään estereitä terapeuttisina aineina, tai kirurgiassa, jolloin niitä käytetään muovituotteina.

Mitä tulee samankaltaisiin terapeuttisesti aktiivisiin alkoholeihin hyaluronihappo toimii tästä syystä erittäin tehokkaana apuaineena, joka on täydellisesti yhteensopiva biologisen ympäristön kanssa. Yllä olevassa alkoholien luettelossa, joita alkoholeja voidaan käyttää hyaluronihappoesterien valmistukseen, on esitetty useita näistä farmakologisesti aktiivisista alkoholeista ja tästä syystä vastaavien esterien mahdolliset sovellukset ovat selviä, koska indikaatiot ovat samat kuin vapaille alkoholeille. Jälleen, kuten on jo mainittu, terapeuttisesti aktiivisten alkoholien kanssa muodostetuissa osittaisestereissä on mahdollista esteröidä osa tai kaikki hyaluronihappokomponentin jäljellä olevista karboksyyli-ryhmistä farmakologisesti inertillä alkoholilla, kuten tyydyttyneillä alempialifaattisilla alkoholeilla, kuten etyyli- tai isopropyylialkoholilla.

Sanitäärysten ja kirurgisten artikkelien valmistukseen käytetään mieluummin hyaluronihapon kokonais- tai osittaisestereitä, jotka on muodostettu farmakologisesti inerttien alkoholien, kuten tyydyttyneiden tai tyydyttymättömien alifaattisten alkoholien, esimerkiksi tämäntyyppisten substituomattomien, suoran ja haaroittuneiden, esimerkiksi 1 - 8 hiiliatomia sisältävien alkoholien, kuten erityisesti edellä mainittujen alkoholien kanssa. Erityisen mielenkiintoisia ovat ne tyydyttymättömät alkoholit, kuten sellaiset, joissa on yksi tai useampi kaksoissidos, kuten vinyyli- tai allyylialkoholit ja niiden kondensoidut johdannaiset, kuten etenkin polyvinyylialkoholit tai polyvalenttiset alkoholit, kuten glyseroli. Tässä tapauksessa on mahdollista käyttää aiotun tarkoituksen

mukaisesti sekaestereitä.

Hyaluronihappoestereitä voidaan myös valmistaa sykloalifaattisista alkoholeista, kuten syklopentaanin ja sykloheksaanin johdannaisista ja niiden johdannaisista, jotka on substituoitu alemmilla alkyyliryhmillä, kuten 1 - 4 hiiliatomia sisältävillä alkyyleillä, etenkin metyyliiryhmillä. Erityisen mielenkiintoisia ovat esterit, jotka on muodostettu sykloalifaattisten ja alifaattisten alkoholien, terpeenistä johdettujen sykloalifaattisten alkoholien, kuten yllä mainittujen kanssa ja terapeuttisesti aktiivisista alkoholeista johdettujen sykloalifaattisten alkoholien kanssa ja joita voidaan käyttää myös kosmetiikassa.

Osittaisestereissä esteröityjen ryhmien prosenttimäärä voi vaihdella suuresti käytön suhteen, johon tuote on tarkoitettu, ja ennen kaikkea yllä mainituilla eri käyttöaloilla tapahtuvan käytön suhteen.

Erittäin mielenkiintoisia ovat kuitenkin ne osittaisesterit, joissa vähintään 5 % ja korkeintaan 90 % kaikista HY:n karboksyyliiryhmistä on esteröity ja etenkin sellaiset, joissa esteröinti prosenttimäärä on 50 - 80 %.

Erityyppisten esteriryhmien määrän välinen suhde voi tietenkin myös vaihdella osittaissekaestereissä. Esimerkiksi kun on kaksi tällaista ryhmää, suhde on mieluummin 0:1:1 ja 1:0:1 ja sama koskee kokonaisestereitä. Terapeuttiseen käyttöön tarkoitettujen esterien kohdalla suhde on mieluummin 0,5:1 - 1:0,5. Tällaiset suhteet pätevät myös kokonaisesterien kohdalla ja osittaisestereissä ne on valittava ottaen huomioon yllä mainitut prosenttimäärät koskien esteröityjen ryhmien koko määrää.

Osittaisestereissä esteröimättömät karboksyyliiryhmät voidaan pitää vapaina tai ne voidaan muodostaa suolaksi. Tällaisten suolojen muodostukseen emäkset valitaan tuotteen käyttökriteerien mukaisesti. On mahdollista muodostaa epäorgaanisia

suoloja, jotka on johdettu alkalimetalleista, kuten kaliumista ja etenkin natriumista ja ammoniumista tai alkalimetallisuoloista, kuten kalsiumista tai magnesium- tai aluminiumsuoloista.

Etenkin mielenkiintoisia ovat suolat, jotka on muodostettu orgaanisten emästen, etenkin tyypeä sisältävien emästen ja tästä syystä alifaattisten, aryylialfaattisten, sykloalifaattisten tai heterosyklisten amiinien kanssa.

Nämä ammoniumsuolat voivat johtua terapeuttisesti sopivista, mutta inaktiivisista amiineista tai amiineista. Edellä mainituista on mainittava ennen kaikkea alifaattiset amiinit, kuten mono-, di- ja trialkyyli-amiinit, joiden alkyyliryhmissä on korkeintaan 18 hiiliatomeja, tai aralkyyliamiinit, joissa on sama määrä hiiliatomeja alifaattisessa osassa ja joissa aryyli merkitsee bentseeniryhmää, joka on mahdollisesti substituoitu 1 - 3 metyyli-ryhmällä tai halogeeniatomeilla tai hydroksyyli-ryhmillä. Suolojen muodostukseen tarkoitettujen biologisesti inaktiivisten emäksien voivat olla myös syklisiä, kuten monosyklisiä alkyleeniamiineja, joiden sykleissä on 4 - 6 hiiliatomeja ja jotka voi olla katkaistu heteroatomeilla, kuten typellä, hapella ja rikillä, kuten piperidiini tai morfoliini, ja jotka voivat olla substituoituja esimerkiksi amiini- tai hydroksyyli-funktiolla, kuten aminoetanoli, etyleenidiamiini, efedriini tai koliini.

On myös mahdollista muodostaa osittaisesterien kvaternaarisia ammoniumsuoloja, esimerkiksi tetra-alkyyliammoniumin suoloja, joissa on yllä mainittu määrä hiiliatomeja, ja etenkin sentyyppisiä suoloja, joissa neljännessä alkyyliryhmässä on 1 - 4 hiiliatomeja, esimerkiksi metyyli-ryhmässä.

Mitä tulee uusien HY:n esterien ja osittaisten esterien käyttöön lääkeaineina ja kosmeettisina aineina, viitattakoon kantahakemuksessa 862878 annettuun selvitykseen.

Uusia hyaluronihappoestereitä voidaan käyttää saniteetti- ja kirurgisisissa tuotteissa. Keksintö käsittää siten myös kaikki tuotteet, jotka ovat samanlaisia kuin ne hyaluronihappoon perustuvat tuotteet, jotka jo esiintyvät markkinoilla, mutta ne sisältävät hyaluroniesteriä tai sen suoloja vapaan hapon tai sen suolojen sijasta ja ne on tarkoitettu esimerkiksi kiinnittimiä tai oftalmisia linssejä varten.

Tämän keksinnön mukaan uudet kirurgiset ja sanitääriset tuotteet voidaan valmistaa hyaluronihapon estereistä, jotka on regeneroitu sellaisenaan sopivilla orgaanisilla liuottimilla, joista on mahdollista saada sopivien toimenpiteiden avulla kalvoja, ohuita levyjä tai lankoja, joita käytetään kirurgias- sa, ihon apuaineita tai korvaavia aineita ihon vakavissa vammoissa, kuten esimerkiksi palovammoissa, kirurgisissa operaatioissa käytettäviä sutuuroita. Keksintö koskee etenkin näitä käyttöaloja ja se käsittää tällaisten artikkelien valmistusmenetelmän, jossa muodostetaan hyaluroniesterin tai sen suolan liuos sopivassa orgaanisessa liuottimessa, kuten karboksyylihapon amidissa, etenkin alifaattisen hapon dialkyyliamidissa, joka sisältää 1 - 5 hiiliatomia ja joka johtuu 1 - 6 hiiliatomia sisältävistä alkyyli-ryhmistä, ja ennen kaikkea orgaanisesta sulfoksidista, s.o. dialkyylisulfoksidissa, jossa on korkeintaan 6 hiiliatomia sisältäviä alkyyli-ryhmiä, kuten etenkin dimetyylisulfoksidissa tai dietyylisulfoksidissa, ja jälleen mikä tärkeintä fluoratussa liuottimessa, jonka kiehumispiste on alhainen, kuten etenkin heksafluori-isopropanolis- sa. Keksintöön kuuluu tällaisten liuosten muuntaminen levy- tai lankamuotoon ja orgaanisen liuottimen poistaminen saatta- malla kosketuksiin toisen orgaanisen tai vesipitoisen liuotti- men kanssa, joka voidaan sekoittaa ensimmäisen liuottimen kanssa ja johon hyaluroniesteri ei liukene, etenkin alemman alifaattisen alkoholin, esimerkiksi etyylialkoholin kanssa (märkäkehräys) tai, jos on käytettävä liuotinta, jolla ei liian korkea kiehumispiste, hyaluronijohdannaisen valmistami- seksi, poistetaan tällainen liuotin kuivissa olosuhteissa kaasuvirralla, etenkin sopivasti kuumennetulla typpivirralla

(kuivakehräys). On myös mahdollista saada erinomaisia tuloksia kuiva-märkäkehräyksellä.

Hyaluronihappestereistä valmistettuja lankoja voidaan käyttää haavojen lääkintää ja kirurgiaa varten käytettävien harsokankaiden valmistukseen. Tällaisten harsokankaiden käyttö on erittäin edullista, koska ne soveltuvat biologisesti hyvin elimistöön, mikä on mahdollista niitä sisältävien entsyymien ansiosta. Nämä entsyymit hajottavat esterin hyaluronihapoksi ja vastaavaksi alkoholiksi ja siten yhdisteeksi, joka on jo olemassa elimistössä, ja vaarattomaksi yhdisteeksi, kuten alkoholiksi, jos käytetään hyaluroniesteriä, joka on johdettu farmakologisesti sopivasta alkoholista, kuten etyylialkoholista.

Nämä harsot ja myös edellä mainitut langat voidaan siitä syystä jättää elimistöön kirurgisen toimenpiteen jälkeen, koska ne absorboituvat hitaasti edellä mainitun hajaantumisen ansiosta.

Valmistettaessa yllä esitettyjä sanitäärisiä ja kirurgisia artikkeleita on mahdollista lisätä pehmennysaineita, jotka parantavat niiden mekaanisia ominaisuuksia, kuten lankojen yhteydessä niiden solmujen kestävyuden parantamiseksi. Nämä pehmennysaineet voivat olla esimerkiksi rasvahappojen alkalisuoloja, esimerkiksi natriumstearaattia tai natriumpalmitaattia, orgaanisten happojen estereitä, joissa on useita hiiliatomeja jne.

Eräs toinen uusien esterien lääketieteessä ja kirurgiassa esiintyvä sovellutus koskee erilaisten kiinteiden kiinnittimien, kuten levyjen, kiekkojen jne. valmistusta, jotka korvaavat jo käytössä olevat metallisessa muodossa tai syntetisistä materiaalista valmistetussa muodossa esiintyvät kiinnittimet, jotka on tarkoitettu poistettaviksi määrätyn ajan kuluttua. Eläinten pollageenista, joka on proteenityyppinen, valmistetut valmisteet aiheuttavat usein ei-toivottuja sivu-

vaikutuksia, kuten tulehdusta tai hylkimistä. Eläinten, ei ihmisten, hyaluronihapon ollessa kyseessä tätä vaaraa ei ole olemassa, koska erilaisten eläinlajien polysakkaridien välillä ei ole yhteensopimattomuutta.

Eräs toinen sovellutus koskee pehmeiden kudosten vaurioiden korjaamista. Turvallisen ja tehokkaan biomateriaalin tarve, jolla voidaan korvata puuttuva tai vaurioitunut pehmeä kudos, on tiedetty pitkään. Useita alloplastisia materiaaleja, kuten parafiinia, Teflon-tahnaa, silikoni- ja boorikollageenia on tähän asti käytetty menetetyn pehmeän kudoksen korvaamiseksi. Kuitenkin näihin materiaaleihin liittyy pysyviä ei-toivottuja muutoksia iholla, jolloin ne siirtyvät istutuspaikasta ja aiheuttavat haitallisia käsittelyreaktioita. Siten lääketieteessä esiintyy edelleen monipuolisen biomateriaalin tarve. Hyaluronihappoestereitä voidaan käyttää turvallisesti ja tehokkaasti pehmeän kudoksen vaurioiden, kuten aknearpien, leikkauksen jälkeen esiintyvien surkastumien, huulihalkioiden ja iän aiheuttamien ryppyjen korjaamiseksi.

Osa uusien esterien lääketieteen ja kirurgian sovellutuksista koskee paisuvia materiaaleja, etenkin sienien muodossa olevia, haavojen ja erilaisten vammojen lääkintää varten.

Biologisen aktiivisuuden tutkimuksetEntsyymistabiilius ja hapen läpipäästökykyAineet

Tämän keksinnön mukaan aikaansaatavien kalvojen ja kuitujen arvokkaat ominaisuudet, jotka osittain on jo esitetty, luovat perustan niiden teknisille eduille suhteessa tunnetun tekniikan tuotteisiin. Näitä ominaisuuksia selostetaan kuitenkin seuraavassa lähemmin entsyymistabiiliutta ja kalvojen hapen läpäisevyyttä koskevilla koetuloksilla, jotka on saatu seuraavista yhdisteistä:

HYAFF₂ hyaluronihappo, joka on esteröity 100 %:sesti metanolilla,

HYAFF₇ hyaluronihappo, joka on esteröity 100 %:sesti etanolilla,

HYAFF₈ hyaluronihappo, joka on esteröity 100 %:sesti isopropanolilla,

HYAFF₉ hyaluronihappo, joka on esteröity 100 %:sesti n-propanolilla,

HYAFF₁₁ hyaluronihappo, joka on esteröity 100 %:sesti bentyylialkoholilla,

HYAAF₂₀ hyaluronihappo, joka on esteröity 100 %:sesti β-fenylietyylialkoholilla,

HYAFF₂₂ hyaluronihappo, joka on esteröity 100 %:sesti isopentyylialkoholilla.

Kalvot voidaan valmistaa esimerkissä 39 esitetyllä tavalla.

HYAFF-kalvojen entsyymistabiiliusStabiilius seerumiesterasin suhteen

Jokainen kalvo (n. 20 mg) sijoitettiin polyeteenikapseliin yhdessä kanin seerumin (5 ml) kanssa ja pidettiin vakiossa lämpötilassa (37°C).

Arviointiparametrinä oli aika (tunteina), joka tarvittiin kalvon liukenemiseksi. Tulokset on esitetty taulukossa 6.

Stabiilius hyaluronidaasin suhteen

Jokainen kalvo (n. 20 mg) sijoitettiin polyeteenikapseliin yhdessä pH 5-puskurin (asetaatti 0,1M, NaCl 0,15M) tai pH 7-puskurin kanssa (fosfaatti 0,1M, NaCl 0,15M), joka sisälsi 100 U entsyymiä (kivesten hyaluronidaasia, Miles-erä 8062, aktiivisuus 342 turbidometrissä yksikköä/mg) kussakin ml:ssa ja pidettiin vakiossa lämpötilassa (37°C). Arviointiparametrinä oli kalvon liukenemiseen tarvittava aika (tunteina). Tulokset on esitetty taulukossa 6.

Taulukko 6

HYAFF-johdannaisten kalvojen stabiilius seerumiesteraasin (37°C) ja hyaluronidaasin (37°C, pH 5 ja pH 7,2) läsnäollessa

Yhdisteet		Stabiilius (h)	
		pH 5	pH 7,2
Seerumiesteraasi		Hyaluronidaasi	
		pH 5	pH 7,2
HYAFF ₂	72	120	120
HYAFF ₉	120	168	168
HYAFF ₇	90	150	150
HYAFF ₁₁	60	140	140
HYAFF ₂₀	130	180	180
HYAFF ₂₂	130	175	175

HYAFF-johdannaisten kalvojen läpipäästökyky hapen suhteen

Jokainen kalvo sijoitettiin säiliöön, jossa oli kaksi osastoa, jotka oli erotettu itse kalvolla. Toinen osasta (tilavuus = 1, 2 cm³) täytettiin osittain kaasusta vapautetulla vedellä (PO₂ = 45 mm Hg 23°C:ssa), toiseen johdettiin O₂:n ja CO₂:n virtaus (95 % ja vastaavasti 5 %), joka pidettiin vakiona (1 kupla/sek.). Koko järjestelmä eristettiin tyypellä.

Määrättyinä aikoina (15, 30, 60, 90, 120, 240 min.) poistettiin sopiva määrä vettä ($1,2 \text{ cm}^3$) ja määritettiin O_2 :n osittainen paine Gas System analyser 1302-laitteella (Instrumentation Laboratories). Kyllästymispaine (550 mg Hg) otettiin vertailuksi ja laskettiin edellä esitetyissä koeolosuhteissa puhaltamalla O_2 -atmosfääriä.

Testit suoritettiin vertaamalla läpipäästämätöntä kalvoa ja silastista (Lepetit:n luettelo, n:o 500-1). Tulokset on esitetty taulukossa 7.

TAULUKKO 7

HYAFF-sarjan kalvojen O₂-läpäisevyys

YHDISTEET	O ₂ -paine (mm Hg 23°C:ssa)					
	0 min.	15 min.	30 min.	60 min.	90 min.	120 min. 240 min.
Läpäisemätön kalvo	45	90	90	90	90	90
Silastic	45	340	406	422	422	430
HYAFF2	45	226	285	300	348	390
HYAFF9	45	250	303	320	371	420
HYAFF7	45	241	298	315	330	386
HYAFF11	45	260	310	328	350	400
HYAFF20	45	215	256	317	337	375
HYAFF22	45	249	288	310	352	370

Keksinnössä käytettävien uusien esterien ja osittaisten esterien biologisten ominaisuuksien osalta viitattakoon kantahakemuksessa 862878 annettuun yksityiskohtaiseen selvitykseen.

HY-esterien valmistusmenetelmä

Menetelmä A

Hyaluronihapon esterit voidaan valmistaa sinänsä tunnetuilla karboksyylihapojen esteröintimenetelmillä, esimerkiksi käsitlemällä vapaa hyaluronihappo halutuilla alkoholeilla katalysoivien aineiden, kuten vahvojen epäorgaanisten happojen tai happotyypisten ioninvaihtimien läsnäollessa, tai eetteröintiaineella, joka pystyy liittämään halutun alkoholitähteen, epäorgaanisten tai orgaanisten emästen läsnäollessa. Eetteröintiaineina on mahdollista käyttää kirjallisuudesta tunnettuja aineita, kuten etenkin erilaisten epäorgaanisten happojen tai orgaanisten sulfonihappojen, kuten vetyhappoja estereitä, s.o. hydrokarbyylihalogenideja, kuten metyyli- tai etyylijodidia, tai neutraaleja sulfaatteja tai hydrokarbyylihappoja, alfiitteja, karbonaatteja, silikaatteja, fosfiitteja tai hydrokarbyylisulfonaatteja, kuten metyylibentseeniä tai p-tolueenisulfonaattia tai metyyli- tai etyylikloorisulfonaattia. Reaktio voi tapahtua sopivassa liuottimessa, esimerkiksi alkoholissa, mieluummin sellaisessa, joka vastaa karboksyyli-ryhmään liitettävää alkyyliryhmää. Reaktio voidaan suorittaa myös ei-polaarisissa liuottimissa, kuten ketoneissa, eettereissä, kuten dioksaanissa, tai aproottisissa liuottimissa, kuten dimetyylisulfoksidissa. Emäksenä voidaan käyttää esimerkiksi alkali- tai maa-alkalimetallin tai magnesiumin hydraattia tai hopeaoksidia tai emäksistä suolaa tai jotakin näistä metalleista, kuten karbonaattia ja epäorgaanisista emäksistä tertiääristä atsotisoitua emästä, kuten pyridiiniä tai kollidiiniä. Emäksen sijasta on mahdollista käyttää myös emästyypistä ioninvaihdinta.

Eräässä toisessa esteröintimenetelmässä käytetään metalli-

suoloja tai orgaanisten atsotisoitujen emästen kanssa muodostettuja suoloja, esimerkiksi ammonium- tai ammoniumsubstituoituja suoloja. Mieluummin käytetään alkali- tai maa-alkalimetallien suoloja, mutta voidaan käyttää myös muita metallisuoloja. Esteröintiaineet ovat myös tässä tapauksessa samat kuin yllä mainitut ja sama koskee myös liuottimia. Mieluummin käytetään aproottisia liuottimia, esimerkiksi dimetyylisulfoksidia ja dimetyyliformamidia.

Tämän menetelmän tai jonkin muun myöhemmin esitettävän menetelmän mukaisesti saaduissa estereissä osittaisesterien vapaat karboksyyliryhmät voi olla muodostettu suolaksi haluttaessa sinänsä tunnetulla tavalla.

Menetelmä B:

Hyaluronihappoesterit voidaan kuitenkin valmistaa edullisesti erään toisen menetelmän mukaisesti, jota voidaan yleisesti soveltaa valmistettaessa karboksyyliryhmiä sisältävien happamien polysakkaridien karboksyyliestereitä. Tässä menetelmässä käsitellään karboksyyliryhmiä sisältävän happaman polysakkaridin kvaternäärinen ammoniumsuola eetteröintiaineella, mieluummin aproottisessa orgaanisessa liuottimessa. Lähtöaineena käytettävänä happamina polysakkarideina on mahdollista käyttää esimerkiksi hyaluronihapon sijasta muita happamia eläin- tai kasvisperäisiä polysakkarideja ja niiden synteettisesti muunnettuja johdannaisia, kun hapanta hemiselluloosaa, jota saadaan määrättyjen kasvien alkaliutteista ja ksylaanin saostamisen jälkeen, jonka disakkaridikomponentit muodostuvat D-glukuronihaposta ja D-ksylopyranoosista (ks. "The Carbohydrates", W. Pigman, s. 668 - 669 - R.L. Whistler, W.M. Corbett)~ pektiinejä ja happamia polysakkarideja, jotka saadaan niistä, s.o. galakturonaania, happamia polysakkarideja, jotka saadaan kumikasvista (neste), kuten arabikumista, tragantista, ja lopuksi happamia polysakkarideja, jotka on johdettu merilevästä, kuten agaria ja karrageeniä. Lähtöaineena on tietenkin myös mahdollista käyttää molekyylifraktioita, joita saadaan

hajottamalla kaikista yllä mainituista polysakkarideista.

Orgaanisina liuottimina käytetään mieluummin aproottisia liuottimia, kuten dialkyylisulfoksidgeja, dialkyylikarboksamideja, kuten etenkin alempialkyylidialkyylisulfoksidgeja, etenkin dimetyylisulfoksidia, ja alempialifaattisten happojen alempialkyylidialkyyliamideja, kuten dimetyyli- tai dietyyli-formamidia tai dimetyyli- tai dietyyliasetamidia.

Voidaan kuitenkin käyttää myös muita liuottimia, jotka eivät aina ole aproottisia, kuten alkoholeja, eettereitä, ketoneja, estereitä, etenkin alifaattisia tai heterosyklisiä alkoholeja ja ketoneja, joilla on alhainen kiehumispiste, kuten heksafluori-isopropanolia, trifluorietanolia ja N-metyylipyrrolidonia.

Reaktio suoritetaan mieluummin n. 0 - 100 °C:n, etenkin n. 25 - 75 °C:n lämpötilassa, esimerkiksi n. 30 °C:ssa.

Esteröinti suoritetaan mieluummin lisäämällä asteittain esteröintiainetta yllä mainittuun ammoniumsuolaa, joka on josakin yllä mainitussa liuottimessa, esimerkiksi dimetyylisulfoksidissa.

Alkylointiaineena on mahdollista käyttää yllä mainittuja aineita, etenkin hydrokarbyylihalogeeneja, esimerkiksi alkyylilihalogeeneja. Lähtöaineena käytettävänä kvaternäärisinä ammoniumsuoloina käytetään mieluummin alempia ammoniumtetraalkylaatteja, joiden alkyyliryhmissä on mieluummin 1 - 6 hiiliatomia. Useimmiten käytetään tetrabutyyliammoniumin hyaluronaattia. Nämä kvaternääriset ammoniumsuolat on mahdollista valmistaa saattamalla happaman polysakkaridin metallinen suola, mieluummin jokin yllä mainittu suola, etenkin natrium- tai kaliumsuola reagoimaan vesipitoisessa liuoksessa kvaternäärisen ammoniumemäksen kanssa suolaksi muodostetun sulfonihartsin kanssa.

Happaman polysakkaridin tetra-alkyyliammoniumsuola voidaan saada jäädytyskuivattamalla eluaatti. Happamien polysakkaridien tetra-alkyyliammoniumsuolat, joita käytetään uuden menetelmän lähtöyhdisteinä ja jotka on johdettu alempialkyyleistä, etenkin 1 - 6 hiiliatomia sisältävistä alkyyleistä, ovat uusia ja muodostavat tämän keksinnön vielä erään kohteen. Yllättävästi tällaiset suolat ovat osoittautuneet liukeneviksi yllä mainituissa orgaanisissa liuottimissa ja tästä syystä yllä mainitun menetelmän B mukainen happaman polysakkaridin esteröinti on erityisen helppo ja se tuottaa runsaita saantoja. Tästä syystä käytettäessä tämäntyyppistä menetelmää voidaan helposti annostella happaman polysakkaridin karboksyyli-ryhmät, jotka on esteröitävä.

Uusi menetelmä B soveltuu erityisen hyvin hyaluroniesterien valmistukseen. Etenkin tästä syystä uuden menetelmän lähtöyhdisteinä käytettävät hyaluronihapon kvaternääriset ammoniumsuolat, etenkin ne, jotka on johdettu alempialkyyleistä ja erityisesti 1 - 6 hiiliatomia sisältävistä alkyyleistä, ovat uusia ja muodostavat tämän keksinnön erään erityisen kohteen.

Eräässä edellä esitetyn menetelmän muunnelmassa happaman polysakkaridin kalium- tai natriumsuola, joka on suspendoitu sopivaa liuokseen, kuten dimetyylisulfoksidein, saatetaan reagoimaan sopivan alkylointiaineen kanssa kvaternäärisen ammoniumsuolan, kuten tetrabutyyliammoniumjodidin katalyyttisten määrien läsnäollessa.

Uusien esterien valmistamiseksi on mahdollista käyttää mitä tahansa alkuperää olevia hyaluronihappoja, kuten esimerkiksi happoja, jotka on uutettu yllä mainituista luonnollisista lähtömateriaaleista, esimerkiksi kukon heltoista. Tällaisten happojen valmistusta on esitetty kirjallisuudessa: mieluummin käytetään puhdistettuja hyaluronihappoja. Keksinnön mukaisesti käytetään etenkin hyaluronihappoja, jotka sisältävät integraalisten happojen molekyylifraktioita, jotka on saatu suoraan uuttamalla orgaanisia materiaaleja ja joiden molekyylipainot

vaihtelevat n. 90 - 80 %:sta (MP = 11,7 - 10,4 miljoonaa) 0,2 %:iin (MP = 30.000) kokonaishapon molekyylipainosta, joka on 13 miljoonaa, sopivimmin niiden molekyylipaino on 5 - 0,2 %. Tällaiset fraktiot voidaan saada useilla kirjallisuudessa esitetyillä menetelmillä, kuten hydrolysoimalla, hapettamalla, entsyymaattisilla tai fysikaalisilla menetelmillä, kuten mekaanisilla tai säteilytysmenetelmillä. Primordiaalisia uutetta muodostuu tästä syystä usein näiden samojen puhdistusmenetelmien kuluessa (esim. ks. Balazs et al., "Cosmetics & Toiletries"). Saatujen molekyylifraktioiden erottaminen ja puhdistaminen suoritetaan tunnetuilla menetelmillä, esimerkiksi molekyylisuodatuksen avulla.

Eräs puhdistetun HY:n fraktio on esimerkiksi se, joka tunnetaan nimellä "ei-inflammatorinen NIF-NaHA-natriumhyaluronaatti" (Balazs, "Healon" - A guide to its use in Ophthalmic Surgery D. Miller & R. Stegman, eds. John Wiley & Sons N.Y. 81983: s. 5).

Erityisen tärkeitä esterien lähtöaineita ovat kaksi puhdistettavaa hyaluronihaposta saatavaa fraktiota, esimerkiksi kukon heltoista saadut, jotka tunnetaan nimillä hyalastiini ja hyalektiini. Hyalastiinifraktion keskimääräinen molekyylipaino on n. 50.000 - 100.000, kun taas hyalektiini-fraktion molekyylipaino on n. 500.000 - 730.000. Näiden kahden fraktion yhdistetty fraktio on myös eristetty ja sen keskimääräinen molekyylipaino on n. 250.000 - 350.000. Tämä yhdistetty fraktio voidaan saada 80 %:n saannolla koko erityisestä lähtöaineesta saatavasta hyaluronihaposta, kun taas hyalektiini voidaan saada 30 %:n saannolla ja hyalastiini-fraktio voidaan saada 50 %:n saannolla lähtöaineena käytetystä HY:stä. Näiden fraktioiden valmistusta on esitetty esimerkeissä A - C.

HY:n suolaksimuodostaminen yllä olevien metallien kanssa lähtöaineiden valmistamiseksi yllä esitettyä erityistä esterointimenetelmää varten suoritetaan sinänsä tunnetulla tavalla, esimerkiksi saattamalla HY reagoimaan lasketun emäsmäärän,

esimerkiksi alkalihydraatin tai tällaisten metallien emäksisten suolojen, kuten karbonaattien tai bikarbonaattien kanssa.

Osittaisestereissä on mahdollista muodostaa suolaksi kaikki jäljellä olevat karboksyyliiryhmät tai vain osa niistä, annostamalla emäsmäärät siten, että saadaan haluttu suolanmuodostuksen stökiometrinen aste. Suolanmuodostuksen oikean asteen avulla on mahdollista saada estereitä, joilla on eri dissosiaatiovakioiden laaja ala ja jotka tästä syystä antavat halutun pH-arvon, liuoksessa tai "in situ" terapeuttisen käytön aikana.

Uusista tuotteista erityisen tärkeitä ovat yllä esitetyt esterit ja niiden suolat sekä seuraavissa havainnollistavissa esimerkeissä esitetyt.

Uusien esterien ja niiden suolojen valmistusmenetelmien muunnelmat, joissa menetelmä katkaistaan jossakin vaiheessa tai aloitetaan väliyhdisteestä, minkä jälkeen suoritetaan puuttuvat vaiheet tai joissa lähtötuotteet valmistetaan in situ.

Keksintöä havainnollistetaan seuraavilla esimerkeillä.

Valmistusesimerkit

Seuraavat esimerkit A - C selittävät hyaluronihappojen fraktioiden valmistusmenetelmiä.

Esimerkki A: Menetelmä sellaisten hyalastiini- ja hyalektiini-fraktioiden seoksen valmistamiseksi, jolla ei ole inflammatorista aktiivisuutta

Tuoreita tai jäädytettyjä kukon helttoja (3000 g) hienonnetaan lihamyllyssä ja sitten ne homogenoidaan varovasti mekaanisessa homogenointilaitteessa. Näin saatu tahna käsitellään sitten

⋮

ruostumattomasta teräksestä valmistetussa säiliössä (AISI 316) tai lasissa 10 tilavuusosalla vedetöntä asetonia. Seosta sekoitetaan sitten 6 tunnin ajan 50 rpm:n nopeudella. Annetaan erottua 12 tunnin aikana, minkä jälkeen asetoni poistetaan uuttamalla. Asetonin uuttaminen toistetaan, kunnes poistettu asetoni saavuttaa oikean kosteusasteen (Karl-Fischer-menetelmä). Seos lingotaan sitten ja tyhjökuivatetaan sopivassa lämpötilassa 5 - 8 tunnin kuluessa. Näin saadaan noin 500 - 600 g kuivaa kukon helttojen jauhetta.

300 g kuivaa jauhetta käsitellään entsymaattisesti papaiinilla (0,2 g) vesipitoisissa olosuhteissa ja puskuroidaan fosfaattipuskurilla kysteiinihydrokloridin sopivan määrän läsnäollessa. Saatua seosta sekoitetaan 24 tunnin ajan 60 rpm:n nopeudella pitäen samalla lämpötila 60 - 65 °C:ssa. Sitten se jäädytetään 25 °C:ssa ja lisätään Celite®:ä (60 g) ja sekoitetaan edelleen tunnin ajan. Näin saatu seos suodatetaan, kunnes saadaan kirkas neste. Kirkas neste alistetaan molekyyliultra-suodatukseen käyttämällä kalvoja, joiden molekyyliulkuraja on 30.000, niiden molekyylien pitämiseksi kalvolla, joiden molekyylipaino on suurempi kuin 30.000.

Tuote ultrasuodatetaan 5:stä 6:een alkuperäistä tilavuusosaa lisäämällä jatkuvasti tislattua vettä tuotteeseen ultrasuodatuksen aikana. Veden lisäys lopetetaan ja ultrasuodatusta jatketaan, kunnes määrä on pienentynyt kolmannekseen alkuperäisestä määrästä.

Jäljelle jäävä neste pidetään 0,1 molaarisena lisäämällä natriumkloridia ja lämpötila saatetaan 50 °C:seen. Sekoittaen 60 rpm:n nopeudella lisätään 45 g setyyliipyridiniumkloridia. Liuosta sekoitetaan 60 minuutin ajan ja sitten lisätään 50 g Celite®:ä. Sekoittaen seoksen lämpötila saatetaan 25 °C:seen ja muodostunut sakka kerätään linkoamalla. Saatua sakka suspendoidaan 0,01 M natriumkloridissa olevaan liuokseen (5 l), joka sisältää 0,05 % setyyliipyridiniumkloridia. Muodostunutta suspensiota sekoitetaan 60 minuutin ajan 50 °C:ssa, lämpötila

saatetaan sitten 25 °C:seen ja sakka lingotaan. Pesu toistetaan 3 kertaa, minkä jälkeen sakka kerätään säiliöön, jossa on 3 litraa 0,05 M natriumkloridin liuosta, joka sisältää 0,05 % setyyliipyridiniumkloridia. Sekoitetaan 60 rpm:n nopeudella 60 minuutin ajan ja lämpötila pidetään vakiosti 25 °C:ssa kahden tunnin ajan. Supernatantti poistetaan linkoamalla. Tämä toimenpide toistetaan useita kertoja 0,1 M natriumkloridin liuoksilla, jotka sisältävät 0,05 % setyyliipyridiniumkloridia. Seos lingotaan ja supernatantti heitetään pois. Sakka dispergoidaan 0,30 M natriumkloridin liuokseen, joka sisältää 0,05 % setyyliipyridiniumkloridia (3 litraa). Seosta sekoitetaan ja kerätään sekä sakka että kirkas liuos. Uuttaminen toistetaan vielä 3 kertaa sakalla käyttämällä kulloinkin 0,5 l samaa vesipitoista liuosta.

Lopuksi sakkajäännös poistetaan ja kirkkaat nesteet sijoitetaan yhdessä yhteen ainoaan säiliöön. Nesteen lämpötila saatetaan 50 °C:seen sekoittaen koko ajan. Neste tehdään sitten 0,23 molaariseksi natriumkloridilla. Lisätään 1 g setyyliipyridiniumkloridia ja nestettä sekoitetaan 12 tunnin ajan.

Seos jäädytetään 25 °C:seen ja sitten se suodatetaan ensin Celite®-pakkauksen päällä ja sitten suodattimen läpi. Sitten se alistetaan jälleen molekyyliultrasuodatukseen kalvolla, jonka molekyylisulkuraja on 30.000, ultrasuodattamalla kolme alkuperäistä tilavuusosaa lisäämällä 0,33 M natriumkloridin liuosta. Natriumkloridiliuoksen lisäys keskeytetään ja määrää vähennetään neljännekseen alkuperäisestä määrästä. Näin konzentroitunut liuos saostetaan sekoittaen (60 rpm) 25 °C:ssa 3 tilavuusosalla etanolia (95 %). Sakka kerätään linkoamalla ja supernatantti heitetään pois. Sakka liuotetaan 1 litraan natriumkloridin 0,1 M liuosta ja saostus toistetaan 3 tilavuusosalla etanolia (95 %).

Sakka kerätään ja pestään ensin 75 %:sella etanolilla (3 kertaa), sitten absoluuttisella etanolilla (3 kertaa) ja lopuksi absoluuttisella asetonilla (3 kertaa).

Näin saadun tuotteen (hyalestiini- + hyalektiinifraktiot keskimääräinen molekyylipaino on 250.000 - 350.000.

HY:n saanto on 0,6 paino- % alkuperäisestä tuoreesta kudoksesta.

Esimerkki B: Menetelmä hyalastiinifraktion valmistamiseksi esimerkissä A esitetyllä menetelmällä valmistetusta seoksesta

Esimerkissä A esitetyllä menetelmällä valmistettu seos liuotetaan kahdesti tislattuun, apyrogeniseen veteen, 10 ml tuotetta 1 ml vettä kohden. Saatu liuos alistetaan molekyylisuodatukseen suodatinkalvojen läpi, joiden molekyylisulkuraja on 200.000, minkä jälkeen konsentroidaan kalvolla lisäämättä vettä. Kalvojen läpi tapahtuvan ultrasuodatuksen aikana, joiden kalvojen molekyylisulkuraja on 200.000, molekyylit, joiden molekyylipaino on yli 200.000, eivät pääse läpi, kun taas pienemmät molekyylit kulkevat kalvon läpi yhdessä veden kanssa. Suodatuksen aikana vettä ei lisätä, niin että tilavuus pienenee ja tästä syystä niiden molekyylien konsentraatio, joiden molekyylipaino on yli 200.000, kasvaa. Tuotetta ultrasuodatetaan, kunnes tilavuus kalvon yläosassa on vähentynyt 10 %:iin alkuperäisestä tilavuudesta. Kaksi tilavuusosaa apyrogenistä, kahdesti tislattua vettä lisätään ja liuos ultrasuodatetaan sitten jälleen, kunnes tilavuus on pienentynyt kolmannekseen. Tämä toistetaan vielä kaksi kertaa. Kalvon läpi kulkenut liuos saatetaan 0,1 molaariseksi natriumkloridilla ja sitten se saostetaan 4 tilavuusosalla 95 %:sta etanolilla. Sakka pestään 3 kertaa etanolilla (75 %) ja sitten se tyhjökuivatetaan.

Näin saadun tuotteen (hyalastiinifraktion) keskimääräinen molekyylipaino on 50.000 - 100.000. HY:n saanto on 0,4 paino- % alkuperäisestä tuoreesta kudoksesta.

Esimerkki C: Menetelmä hyalektiinifraktion valmistamiseksi

Konsentroitunut liuos, joka kerättiin säiliöön esimerkissä B ultrasuodatuskalvon yläosassa, jonka molekyylisulkuraja oli 200.000, laimennetaan vedellä, kunnes saadaan liuos, joka sisältää 5 mg/ml hyaluronihappoa määritettynä kvantitatiivisella analyysillä, joka perustuu glukuronihapon annostukseen.

Liuos saatetaan 0,1 molaariseksi natriumkloridissa ja sitten se saostetaan 4 tilavuusosalla etanolia (95 %). Sakka pestään 3 kertaa etanolilla (75 %) ja sitten se tyhjökuivatetaan.

Näin saadun tuotteen (hyalektiinifraktion) keskimääräinen molekyylipaino on 500.000 - 730.000. Tämä vastaa hyaluronihapon fraktiota, jonka määritelty molekyyliketjun pituus on n. 2.500 - 3.500 sakkariidisykettä, jotka ovat erittäin puhtaita. HY:n saanto on 0,2 paino- % alkuperäisestä tuoreesta kudoksesta.

Esimerkki D: Hyaluronihapon (HY) tetrabutyyliammoniumsuolan valmistus

4,02 g HY-natriumsuolaa (10 mooliekv.) liuotetaan 400 ml:aan tislattua H₂O:ta. Liuos eluoidaan sitten 4 °C:ssa termostaattisessa pylväässä, joka sisältää 15 ml sulfonihartsia (Dowex 50 x 8) tetrabutyyliammoniumin muodossa. Natriumista vapaa eluaatti jäädytetään heti ja jäädytyskuivatetaan. Saanto: 6,18 g.

Esimerkki 1: Hyaluronihapon (HY) (osittaisen) propyyliesterin valmistus

- 50 % esteröityä karboksyyliiryhmiä
- 50 % suolaksi muodostettuja karboksyyliiryhmiä (Na)

12,4 g HY-tetrabutyyliammoniumsuolaa, jonka molekyylipaino on 170.000, joka vastaa 20 mooliekvivalenttia monomeeristä yksik-

köä, liuotetaan 620 ml:aan dimetyylisulfoksidia 25 °C:ssa, lisätään 1,8 g (10,6 mooliekv.) propyylijodidia ja muodostunut liuos pidetään 30 °C:n lämpötilassa 12 tunnin ajan.

Lisätään liuos, joka sisältää 62 ml vettä ja 9 g natriumkloridia ja muodostunut seos kaadetaan hitaasti 3.500 ml:aan asetonia sekoittaen jatkuvasti. Muodostuu sakka, joka suodatetaan ja pestään kolme kertaa 500 ml:lla asetonin ja veden 5:1-seosta ja kolme kertaa asetonilla ja lopuksi se tyhjökuivatetaan kahdeksan tunnin kuluessa 30 °C:ssa.

Tuote liuotetaan sitten 550 ml:aan vettä, joka sisältää 1 % natriumkloridia, ja liuos kaadetaan hitaasti 3.000 ml:aan asetonia jatkuvasti sekoittaen. Muodostuu sakka, joka suodatetaan ja pestään kaksi kertaa 500 ml:lla asetoni/vesi-seosta (5:1) ja kolme kertaa 500 ml:lla asetonia ja lopuksi se tyhjökuivatetaan 24 tunnin kuluessa 30 °C:ssa. Saadaan 7,9 g otsikossa esitetty osittaista propyyliesteriyhdistettä. Esteriryhmien kvantitatiivinen määrittäminen suoritetaan käyttämällä menetelmää, jonka R.H. Cundiff ja P.C. Markunas ovat esittäneet [Anal. Chem. 33, 1028 - 1030 (1961)].

Esimerkki 2: Hyaluronihapon (HY) (osittaisen) isopropyyliesterin valmistamiseksi - 50 % esteröityjä karboksyyliiryhmiä, 50 % suolaksi muodostettuja karboksyyliiryhmiä (Na)

12,4 g HY-tetrabutyyliammoniumsuolaa, jonka molekyylipaino on 160.000, mikä vastaa 20 mooliekvivalenttia monomeeristä yksikköä, liuotetaan 620 ml:aan dimetyylisulfoksidia 25 °C:ssa, lisätään 1,8 g (10,6 mooliekv.) isopropyylijodidia ja muodostunut seos pidetään 12 tunnin ajan 30 °C:ssa.

Lisätään liuos, joka sisältää 62 ml vettä ja 9 g natriumkloridia ja muodostunut seos kaadetaan hitaasti 3.500 ml:aan asetonia sekoittaen jatkuvasti. Muodostuu sakka, joka suodatetaan ja pestään kolme kertaa 500 ml:lla asetoni/vettä (5:1) ja kolme kertaa asetonilla ja lopuksi sitä tyhjökuivatetaan

kahdeksan tunnin ajan 30 °C:ssa.

Tuote liuotetaan sitten 550 ml:aan vettä, joka sisältää 1 % natriumkloridia, ja liuos kaadetaan hitaasti 3.000 ml:aan asetonia jatkuvasti sekoittaen. Muodostuu sakka, joka suodatetaan ja pestään kaksi kertaa 500 ml:lla asetoni/vettä (5:1) ja kolme kertaa 500 ml:lla asetonia ja lopuksi sitä tyhjökuivatetaan 24 tunnin ajan 30 °C:ssa. Saadaan 7,8 g otsikossa esitettyä osittaista isopropyyliesteriyhdistettä. Esteriryhmien kvantitatiivinen määrittäminen suoritetaan R.H. Cundiffin ja P.C. Markunasin menetelmän mukaisesti [Anal. Chem. 33, 1028 - 1030 (1961)].

Esimerkki 3: Hyaluronihapon (HY) (osittaisen) etyyliesterin valmistus - 75 % esteröityjä karboksyyliiryhmiä, 25 % suolaksi muodostettuja karboksyyliiryhmiä (Na)

12,4 g HY-tetrabutyyliammoniumsuolaa, jonka molekyylipaino on 250.000 ja joka vastaa 20 mooliekvivalenttia monomeeristä yksikköä, liuotetaan 620 ml:aan dimetyylisulfoksidia 25 °C:ssa, lisätään 2,5 g (15,9 mooliekv.) etyylijodidia ja muodostunut seos pidetään 12 tunnin ajan 30 °C:ssa.

Lisätään liuos, jossa on 62 ml vettä ja 9 g natriumkloridia ja muodostunut seos kaadetaan hitaasti 3.500 ml:aan asetonia sekoittaen jatkuvasti. Muodostuu sakka, joka suodatetaan ja pestään kolme kertaa 500 ml:lla asetoni/vettä (5:1) ja kolme kertaa asetonilla ja lopuksi sitä tyhjökuivatetaan kahdeksan tunnin ajan 30 °C:ssa.

Tuote liuotetaan sitten 550 ml:aan vettä, joka sisältää 1 % natriumkloridia ja liuos kaadetaan hitaasti 3.000 ml:aan asetonia jatkuvasti sekoittaen. Muodostuu sakka, joka suodatetaan ja pestään kaksi kertaa 500 ml:lla asetoni/vettä (5:1) ja kolme kertaa 500 ml:lla asetonia ja lopuksi sitä tyhjökuivatetaan 24 tunnin ajan 30 °C:ssa. Saadaan 7,9 g otsikossa esitettyä osittaista etyyliesteriyhdistettä. Esteriryhmien

kvantitatiivinen määrittely suoritetaan R.H. Cundiffin ja P.C. Markunasin menetelmän mukaisesti [Anal. Chem. 33, 1028 - 1030 (1961)].

Esimerkki 4: Hyaluronihapon (HY) (osittaisen) metyyliesterin valmistus - 75 % esteröityjä karboksyyliiryhmiä, 25 % suolaksi muodostettu karboksyyliiryhmiä (Na)

12,4 g HY-tetrabutyyliammoniumsuolaa, jonka molekyylipaino on 80.000, mikä vastaa 20 mooliekvivalenttia monomeeristä yksikköä, liuotetaan 620 ml:aan dimetyylisulfoksidia 25 °C:ssa, lisätään 2,26 g (15,9 mooliekv.) metyylijodidia ja muodostunut seos pidetään 12 tunnin ajan 30 °C:ssa.

Lisätään liuos, joka sisältää 62 ml vettä ja 9 g natriumkloridia ja muodostunut seos kaadetaan hitaasti 3.500 ml:aan asetonia sekoittaen jatkuvasti. Muodostuu sakka, joka suodatetaan ja pestään kolme kertaa 500 ml:lla asetoni/vettä (5:1) ja kolme kertaa asetonilla ja lopuksi sitä tyhjökuivatetaan 8 tunnin ajan 30 °C:ssa.

Tuote liuotetaan sitten 550 ml:aan vettä, joka sisältää 1 % natriumkloridia, ja liuos kaadetaan hitaasti 3.000 ml:aan asetonia jatkuvasti sekoittaen. Muodostuu sakka, joka suodatetaan ja pestään kaksi kertaa 500 ml:lla asetoni/vettä (5:1) ja kolme kertaa 500 ml:lla asetonia ja lopuksi sitä tyhjökuivatetaan 24 tunnin ajan 30 °C:ssa. Saadaan 7,8 g otsikossa esitettyä osittaista metyyliesteriyhdistettä. Esteriryhmien kvantitatiivinen määrittely suoritetaan käyttämällä R.H. Cundiffin ja P.C. Markunasin menetelmää [Anal. Chem. 33, 1028 - 1030 (1961)].

Esimerkki 5: Hyaluronihapon (HY) metyyliesterin valmistus

12,4 g HY-tetrabutyyliammoniumsuolaa, jonka molekyylipaino on 120.000, mikä vastaa 20 mooliekvivalenttia monomeeristä yksikköä, liuotetaan 620 ml:aan dimetyylisulfoksidia 25 °C:ssa,

lisätään 3 g (21,2 mooliekv.) metyylijodidia ja liuos pidetään 12 tunnin ajan 30 °C:ssa.

Muodostunut seos kaadetaan hitaasti 3.500 ml:aan etyyliasettaattia sekoittaen jatkuvasti. Muodostuu sakka, joka suodatetaan ja pestään 4 kertaa 500 ml:lla etyyliasettaattia ja lopuksi sitä tyhjökuivatetaan 20 tunnin ajan 30 °C:ssa.

Saadaan 8 g otsikossa esitettyä metyyliesterituotetta. Esteriryhmien kvantitatiivinen määrittäminen suoritetaan R.H. Cundiffin ja P.C. Markunasin menetelmän mukaisesti [Anal. Chem. 33, 1028 - 1030 (1961)].

Esimerkki 6: Hyaluronihapon (HY) etyyliesterin valmistus

12,4 g HY-tetrabutyyliammoniumsuolaa, jonka molekyylipaino on 85.000, mikä vastaa 20 mooliekvivalenttia monomeeristä yksikköä, liuotetaan 620 ml:aan dimetyylisulfoksidia 25 °C:ssa, lisätään 3,3 g (21,2 mooliekv.) etyylijodidia ja liuos pidetään 12 tunnin ajan 30 °C:ssa.

Muodostunut seos kaadetaan hitaasti 3.500 ml:aan etyyliasettaattia sekoittaen jatkuvasti. Muodostuu sakka, joka suodatetaan ja pestään 4 kertaa 500 ml:lla etyyliasettaattia ja lopuksi sitä tyhjökuivatetaan 24 tunnin ajan 30 °C:ssa.

Saadaan 8 g otsikossa esitettyä etyyliesterituotetta. Esteriryhmien kvantitatiivinen määrittäminen suoritetaan R.H. Cundiffin ja P.C. Markunasin menetelmän mukaisesti [Anal. Chem. 33, 1028 - 1030 (1961)].

Esimerkki 7: Hyaluronihapon (HY) propyyliesterin valmistus

12,4 g HY-tetrabutyyliammoniumsuolaa, jonka molekyylipaino on 170.000, mikä vastaa 20 mooliekvivalenttia monomeeristä yksikköä, liuotetaan 620 ml:aan dimetyylisulfoksidia 25 °C:ssa, lisätään 3,26 g (21,2 mooliekv.) propyylijodidia ja liuos

pidetään 12 tunnin ajan 30 °C:ssa.

Muodostunut seos kaadetaan hitaasti 3.500 ml:aan etyyliasettaattia sekoittaen jatkuvasti. Muodostuu sakka, joka suodatetaan ja pestään 4 kertaa 500 ml:lla etyyliasettaattia ja lopuksi sitä tyhjökuivatetaan 24 tunnin ajan 30 °C:ssa.

Saadaan 8,3 g otsikossa esitettyä propyyliesterituotetta. Esteriryhmien kvantitatiivinen määrittäminen suoritetaan käyttämällä R.H. Cundiffin ja P.C. Markunasin menetelmää [Anal. Chem. 33, 1028 - 1030 (1961)].

Esimerkki 8: Hyaluronihapon (HY) (osittaisen) butyyliesterin valmistus - 50 % esteröityjä karboksyyliiryhmiä, 50 % suolaksi muodostettuja karboksyyliiryhmiä (Na)

12,4 g HY-tetrabutyyliammoniumsuolaa, jonka molekyylipaino on 620.000, mikä vastaa 20 mooliekvivalenttia monomeeristä yksikköä, liuotetaan 620 ml:aan dimetyylisulfoksidia 25 °C:ssa, lisätään 1,95 g (10,6 mooliekv.) n-butyylijodidia ja muodostunut liuos pidetään 12 tunnin ajan 30 °C:ssa.

Lisätään liuos, joka sisältää 62 ml vettä ja 9 g natriumkloridia ja muodostunut seos kaadetaan hitaasti 3.500 ml:aan asetonia sekoittaen jatkuvasti. Muodostuu sakka, joka suodatetaan ja pestään kolme kertaa 500 ml:lla asetonin ja veden 5:1-seosta ja kolme kertaa asetonilla ja lopuksi sitä tyhjökuivatetaan 8 tunnin ajan 30 °C:ssa.

Tuote liuotetaan sitten 550 ml:aan vettä, joka sisältää 1 % natriumkloridia, ja liuos kaadetaan hitaasti 3.000 ml:aan asetonia jatkuvasti sekoittaen. Muodostuu sakka, joka suodatetaan ja pestään kaksi kertaa 500 ml:lla asetonin/vesi-seosta (5:1) ja kolme kertaa 500 ml:lla asetonia ja lopuksi sitä tyhjökuivatetaan 24 tunnin ajan 30 °C:ssa. Saadaan 8 g otsikossa esitettyä osittaista butyyliesteriyhdistettä. Esteriryhmien kvantitatiivinen määrittäminen suoritetaan käyttämällä

menetelmää, jonka R.H. Cundiff ja P.C. Markunas ovat esittäneet [Anal. Chem. 33, 1028 - 1030 (1961)].

Esimerkki 9: Hyaluronihapon (HY) (osittaisen) etoksikarbonyylimetyyliesterin valmistus - 75 % esteröityjä karboksyyli-ryhmiä, 25 % suolaksi muodostettuja karboksyyli-ryhmiä (Na)

12,4 g HY-tetrabutyyliammoniumsuolaa, jonka molekyylipaino on 180.000, mikä vastaa 20 mooliekvivalenttia monomeeristä yksikköä, liuotetaan 620 ml:aan dimetyylisulfoksidia 25 °C:ssa, lisätään 2 g tetrabutyyliammoniumjodidia ja 1,84 g (15 mooliekv.) etyyliklooriasetaattia ja muodostunut liuos pidetään 24 tunnin ajan 30 °C:ssa.

Lisätään liuos, joka sisältää 62 ml vettä ja 9 g natriumkloridia ja muodostunut seos kaadetaan hitaasti 3.500 ml:aan asetonia sekoittaen jatkuvasti. Muodostuu sakka, joka suodatetaan ja pestään kolme kertaa 500 ml:lla asetoni/vettä (5:1) ja kolme kertaa asetonilla ja lopuksi sitä tyhjökuivatetaan kahdeksan tunnin ajan 30 °C:ssa.

Tuote liuotetaan sitten 550 ml:aan vettä, joka sisältää 1 % natriumkloridia, ja liuos kaadetaan hitaasti 3.000 ml:aan asetonia jatkuvasti sekoittaen. Muodostuu sakka, joka suodatetaan ja pestään kaksi kertaa 500 ml:lla asetoni/vettä (5:1) ja kolme kertaa 500 ml:lla di-asetonia ja lopuksi sitä tyhjökuivatetaan 24 tunnin ajan 30 °C:ssa. Saadaan 10 g otsikossa esitettyä osittaista etoksikarbonyylimetyyliesteriä. Esteriryhmien kvantitatiivinen määrittäminen suoritetaan R.H. Cundiffin ja P.C. Markunasin menetelmän mukaisesti [Anal. Chem. 33, 1028 - 1030 (1961)].

Esimerkki 10: Hyaluronihapon (HY) n-pentyyliesterin valmistus

12,4 g HY-tetrabutyyliammoniumsuolaa, jonka molekyylipaino on 620.000, mikä vastaa 20 mooliekvivalenttia monomeeristä yksikköä, liuotetaan 620 ml:aan dimetyylisulfoksidia 25 °C:ssa,

lisätään 3,8 g (25 mooliekv.) n-pentyylibromidia ja 0,2 g tetrabutyyliammoniumjodidia ja liuos pidetään 12 tunnin ajan 30 °C:ssa.

Muodostunut seos kaadetaan hitaasti 3.500 ml:aan etyyliasettaattia sekoittaen jatkuvasti. Muodostuu sakka, joka suodatetaan ja pestään 4 kertaa 500 ml:lla etyyliasettaattia ja lopuksi sitä tyhjökuivatetaan 24 tunnin ajan 30 °C:ssa.

Saadaan 8,7 g otsikossa esitettyä n-pentyyliesterituotetta. Esteriryhmien kvantitatiivinen määrittäminen suoritetaan julkaisun Siggia S. ja Hann J.G. "Quantitative organic analysis via functional groups", s. 169-172, 4. painos John Wiley & Sons, mukaisesti.

Esimerkki 11: Hyaluronihapon (HY) isopentyyliesterin valmistus

12,4 g HY-tetrabutyyliammoniumsuolaa, jonka molekyylipaino on 170.000, mikä vastaa 20 mooliekvivalenttia monomeeristä yksikköä, liuotetaan 620 ml:aan dimetyylisulfoksidia 25 °C:ssa, lisätään 3,8 g (25 mooliekv.) isopentyylibromidia ja 0,2 g tetrabutyyliammoniumjodidia ja liuos pidetään 12 tunnin ajan 30 °C:ssa.

Muodostunut seos kaadetaan hitaasti 3.500 ml:aan etyyliasettaattia sekoittaen jatkuvasti. Muodostuu sakka, joka suodatetaan ja pestään 4 kertaa 500 ml:lla etyyliasettaattia ja lopuksi sitä tyhjökuivatetaan 24 tunnin ajan 30 °C:ssa.

Saadaan 8,6 g otsikossa esitettyä isopentyyliesterituotetta. Esteriryhmien kvantitatiivinen määrittäminen suoritetaan julkaisun Siggia S. ja Hanna J.G. "Quantitative organic analysis via functional groups", s. 169 - 172, 4. painos, John Wiley & Sons, mukaisesti.

Esimerkki 12: Hyaluronihapon (HY) bentsyyliesterin valmistus

12,4 g HY-tetrabutyyliammoniumsuolaa, jonka molekyylipaino on 170.000, mikä vastaa 20 mooliekvivalenttia monomeeristä yksikköä, liuotetaan 620 ml:aan dimetyylisulfoksidia 25 °C:ssa, lisätään 4,5 g (25 mooliekv.) isopentyylibromidia ja 0,2 g tetrabutyyliammoniumjodidia ja liuos pidetään 12 tunnin ajan 30 °C:ssa.

Muodostunut seos kaadetaan hitaasti 3.500 ml:aan etyyliasettaattia sekoittaen jatkuvasti. Muodostuu sakka, joka suodatetaan ja pestään 4 kertaa 500 ml:lla etyyliasettaattia ja lopuksi sitä tyhjökuivatetaan 24 tunnin ajan 30 °C:ssa.

Saadaan 8,6 g otsikossa esitettyä isopentyyliesteriä. Esteriryhmien kvantitatiivinen määrittäminen suoritetaan julkaisun Siggia S. ja Hanna J.G. "Quantitative organic analysis via functional groups", s. 169 - 172, 4. painos, John Wiley & Sons, mukaisesti.

Esimerkki 13: Hyaluronihapon (HY) β -fenyylietyyliesterin valmistus

12,4 g HY-tetrabutyyliammoniumsuolaa, jonka molekyylipaino on 125.000, mikä vastaa 20 mooliekvivalenttia monomeeristä yksikköä, liuotetaan 620 ml:aan dimetyylisulfoksidia 25 °C:ssa, lisätään 4,6 g (25 mooliekv.) 2-bromietyylibentseeniä ja 185 mg tetrabutyyliammoniumjodidia ja liuos pidetään 12 tunnin ajan 30 °C:ssa.

Muodostunut seos kaadetaan hitaasti 3.500 ml:aan etyyliasettaattia sekoittaen jatkuvasti. Muodostuu sakka, joka suodatetaan ja pestään 4 kertaa 500 ml:lla etyyliasettaattia ja lopuksi sitä tyhjökuivatetaan 20 tunnin ajan 30 °C:ssa.

Saadaan 9,1 g otsikossa esitettyä β -fenyylietyyliesteriä.

Esteriryhmien kvantitatiivinen määrittely suoritetaan julkaisun Siggia S. ja Hanna J.G. "Quantitative organic analysis via functional groups", s. 168 - 172, 4. painos, John Wileys & Sons, mukaisesti.

Esimerkki 14: Hyaluronihapon (HY) bentsyyliesterin valmistus

3 g HY:n kaliumsuolaa, jonka molekyylipaino on 162.000, suspendoidaan 200 ml:aan dimetyylisulfoksidia ja lisätään 120 mg tetrabutyyliammoniumjodidia ja 2,4 g bentsyylibromidia.

Suspensiota sekoitetaan 48 tunnin ajan 30 °C:ssa. Muodostunut seos kaadetaan hitaasti 1.000 ml:aan etyyliasetaattia sekoittaen jatkuvasti. Muodostuu sakka, joka suodatetaan ja pestään 4 kertaa 500 ml:lla etyyliasetaattia ja lopuksi sitä tyhjäkuivatetaan 24 tunnin ajan 30 °C:ssa.

Saadaan 3,1 g otsikossa esitettyä bentsyyliesterituotetta. Esteriryhmien kvantitatiivinen määrittely suoritetaan julkaisun Siggia S. ja Hanna J.G. "Quantitative organic analysis via functional groups", s. 169 - 172, 4. painos, John Wiley & Sons, mukaisesti.

Esimerkki 15: Hyaluronihapon (HY) (osittaispropyyli)esterin valmistus - 85 % esteröityjä karboksyyliiryhmiä, 15 % suolaksi muodostettuja karboksyyliiryhmiä (Na)

12,4 g HY-tetrabutyyliammoniumsuolaa, jonka molekyylipaino on 165.000, mikä vastaa 20 mooliekvivalenttia monomeeristä yksikköä, liuotetaan 620 ml:aan dimetyylisulfoksidia 25 °C:ssa, lisätään 2,9 g (17 mooliekv.) propyylijodidia ja saatu liuos pidetään 12 tunnin ajan 30 °C:ssa.

Lisätään liuos, joka sisältää 62 ml vettä ja 9 g natriumkloridia ja muodostunut seos kaadetaan hitaasti 3.500 ml:aan asetonia sekoittaen jatkuvasti. Muodostuu sakka, joka suodatetaan ja pestään kolme kertaa 500 ml:lla asetoni/vettä (5:1)

ja kolme kertaa asetonilla ja lopuksi sitä tyhjökuivatetaan kahdeksan tunnin ajan 30 °C:ssa.

Tuote liuotetaan sitten 550 ml:aan vettä, joka sisältää 1 % natriumkloridia, ja liuos kaadetaan hitaasti 3.000 ml:aan asetonia jatkuvasti sekoittaen. Muodostuu sakka, joka suodattetaan ja pestään kaksi kertaa 500 ml:lla asetoni/vettä (5:1) ja kolme kertaa 500 ml:lla asetonia ja lopuksi sitä tyhjökuivatetaan 24 tunnin ajan 30 °C:ssa. Saadaan 8 g otsikossa esitettyä osittaista propyyliesteriä. Esteriryhmien kvantitatiivinen määrittäminen suoritetaan R.H. Cundiffin ja P.C. Markunasin menetelmän mukaisesti [Anal. Chem. 33, 1028 1030 (1961)].

Esimerkki 16: Hyaluronihapon estereitä sisältävien kalvojen valmistus

Liuos valmistetaan HY:n n-propyyliesteristä (MP 130.000) dimetyylisulfoksidissa 180 mg/ml:n konsentraatiossa.

Kerrostuslaitteella levitetään ohut kerros liuosta lasilevyille; paksuuden on oltava 10 kertaa suurempi kuin kalvon lopullinen paksuus. Lasilevy upotetaan etanoliin, joka absorboi dimetyylisulfoksidin, mutta ei liuota HY-esteriä, joka muuttuu kiinteäksi. Kalvo irrotetaan lasilevyiltä, pestään jälleen etanolilla, sitten vedellä ja jälleen etanolilla.

Näin saatu levyä kuivatetaan puristimessa 48 tunnin ajan 30 °C:ssa.

Esimerkki 17: Hyaluronihapon estereitä sisältävien lankojen eli kuitujen valmistus

Valmistetaan liuos dimetyylisulfoksidissa HY:n bentsyyliesteristä (MP 165.000) 200 mg/ml:n konsentraatiossa. Näin saatu liuos puristetaan pumpun avulla langanvalmistuskoneen läpi, jossa on 0,5 mm:n reikiä.

Langanvalmistuskone upotetaan etanoli/dimetyylisulfoksiidiin (80:20, tämä konsentraatio pidetään vakiona lisäämällä jatkuvasti etanolia). Kun liuos on liuennut dimetyylisulfoksidissa tällä tavalla, se pyrkii irrottamaan suurimman osan dimetyylisulfoksidista ja lanka jähmettyy.

Lanka venytetään, kun se vielä sisältää dimetyylisulfoksidia, sitten se venytetään uudestaan ja pestään etanolilla. Lanka kuivataan typpivirrassa.

Patenttivaatimukset:

1. Menetelmä hyaluronihappoestereistä tai niiden suoloista koostuvien kalvojen tai kuitujen muodostamiseksi, t u n n e t t u siitä, että hyaluronihapon täydellinen tai osittainen esteri, joka on muodostettu alifaattisen tai aralifaattisen sarjan alkoholeista, liuotetaan orgaaniseen liuottimeen, liuos saatetaan kalvo- tai vastaavasti kuitumuotoon, minkä jälkeen orgaaninen liuotin poistetaan käsittelemällä sitä sopivalla ensimmäiseen liuottimeen liukenevalla orgaanisella tai vesipitoisella liuottimella.
2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että liuottimena käytetään dimetyylisulfoksidia.
3. Menetelmä hyaluronihappoestereistä tai niiden suoloista koostuvien kalvojen tai kuitujen muodostamiseksi, t u n n e t t u siitä, että hyaluronihapon täydellinen tai osittainen esteri, joka on muodostettu alifaattisen tai aralifaattisen sarjan alkoholeista liuotetaan orgaaniseen liuottimeen, liuos saatetaan kalvo- tai vastaavasti kuitumuotoon minkä jälkeen orgaaninen liuotin poistetaan käsittelemällä sitä sähkövirralla tai sopivasti kuumennetulla inertti-kaasulla.
4. Patenttivaatimuksen 3 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että liuottimena käytetään heksafluori-isopropanolia.
5. Jonkin patenttivaatimuksen 1 - 4 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että kalvot tai kuidut valmistetaan alifaattisen sarjan estereistä, joissa alifaattisen sarjan alkoholeilla on korkeintaan 12 hiiliatomia ja ovat substituomattomia tai substituoituja yhdellä tai kahdella funktionaalisella ryhmällä, joka on amino-, hydroksi-, merkapto-, aldehydi-, keto-, karboksi-, vetykarbyyli- tai divetykarbyyliaminoryhmä, eetteri-, esteri-, tioeetteri-, asetaali-,

ketaali-, karbalkoksi-, karbamidi- tai substituoitu karbamidiryhmä, jolloin vetykarbyyliradikaaleissa yhdellä tai kahdella alkyyliryhmällä on näissä funktionaalisesti modifioituissa ryhmissä korkeintaan 6 hiiliatomia, ja jolloin tällaisten alifaattisen sarjan alkoholien hiiliatomiketjussa voi olla heteroatomeja, jotka ovat happea, rikkiä tai typpeä.

6. Jonkin patenttivaatimuksen 1 - 4 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että kalvot tai kuidut valmistetaan aralifaattisen sarjan estereistä, joissa aralifaattisen sarjan alkoholeilla on korkeintaan yksi bentseenitähde ja alifaattisessa ketjussa on korkeintaan 4 hiiliatomia ja bentseenitähteessä voi substituentteina olla 1 - 3 metyyli- tai hydroksiryhmää tai halogeeniatomeja, ja alifaattisessa ketjussa voi substituentteina olla yksi tai kaksi funktionaalista ryhmää, jotka ovat vapaita aminoryhmiä, mono- tai dietyyliryhmiä tai pyrrolidiini- tai piperidiiniryhmiä.

7. Jonkin edellisen patenttivaatimuksen mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että kalvojen tai kuitujen valmistukseen käytetään yhtä tai useampaa seuraavista aineista:

hyaluronihapon osittainen propyyliesteri, jossa 50 % karboksyyliiryhmistä on esteröitynyt ja 50 % karboksyyliiryhmistä on natriumsuolan muodossa,

hyaluronihapon osittainen isopropyyliesteri, jossa 50 % karboksyyliiryhmistä on esteröitynyt ja 50 % karboksyyliiryhmistä on natriumsuolan muodossa,

hyaluronihapon osittainen propyyliesteri, jossa 85 % karboksyyliiryhmistä on esteröitynyt ja 15 % karboksyyliiryhmistä on natriumsuolan muodossa,

hyaluronihapon osittainen etyyliesteri, jossa 75 % karboksyyliiryhmistä on esteröitynyt ja 25 % karboksyyliiryhmistä on natriumsuolan muodossa,

hyaluronihapon osittainen metyyliesteri, jossa 75 % karboksyyliiryhmistä on esteröitynyt ja 25 % karboksyyliiryhmistä on natriumsuolan muodossa,

hyaluronihapon täydellinen metyyliesteri,

hyaluronihapon täydellinen etyyliesteri,

hyaluronihapon täydellinen propyyliesteri,

hyaluronihapon osittainen butyyliesteri, jossa 50 % karboksyyliiryhmistä on esteröitynyt ja 50 % karboksyyliiryhmistä on natriumsuolan muodossa,

hyaluronihapon osittainen etoksikarbonyylimetyyliesteri, jossa 75 % karboksyyliiryhmistä on esteröitynyt ja 25 % karboksyyliiryhmistä on natriumsuolan muodossa,

hyaluronihapon täydellinen pentyyliesteri,

hyaluronihapon täydellinen isopentyyliesteri,

hyaluronihapon täydellinen bentseeniesteri,

hyaluronihapon täydellinen fenyylietyyliesteri,

8. Saniteetti- ja kirurgiseen käyttöön soveltuvat, ei-terapeutteisesti käytettävät kalvot tai kuidut, tunnetut siitä, että ne sisältävät alifaattisen tai aralifaattisen sarjan alkoholeista muodostettuja hyaluronihapon täydellisiä tai osittaisia estereitä tai näiden estereiden epäorgaanisten tai orgaanisten happojen kanssa muodostamia suoloja.

Patentkrav:

1. Förfarande för framställning av folier eller fibrer bestående av hyaluronsyraestrar eller salter därav, k ä n n e t e c k n a t av att en fullständig eller partiell ester av hyaluronsyra och alkoholer av den alifatiska eller den aralifatiska serien löses i ett organiskt lösningsmedel och lösningen bringas i folie- respektive fiberform, och sedan avlägsnas det organiska lösningsmedlet genom behandling med ett annat lämpligt organiskt eller vattenhaltigt lösningsmedel, som är lösligt i det första lösningsmedlet.
2. Förfarande enligt patentkrav 1, k ä n n e t e c k n a t av att såsom lösningsmedel används dimetylsulfoxid.
3. Förfarande för framställning av folier eller fibrer bestående av hyaluronsyraestrar eller salter därav, k ä n n e t e c k n a t av att en fullständig eller partiell ester av hyaluronsyra och alkoholer av den alifatiska eller aralifatiska serien löses i ett organiskt lösningsmedel, lösningen bringas i folie- respektive fiberform, och sedan avlägsnas det organiska lösningsmedlet genom behandling med elström eller en lämpligt upphettad inert gas.
4. Förfarande enligt patentkrav 3, k ä n n e t e c k n a t av att såsom lösningsmedel används hexafluorisopropanol.
5. Förfarande enligt något av patentkraven 1 - 4, k ä n n e t e c k n a t av att folierna eller fibrerna framställs av estrar av den alifatiska serien, varvid alkoholerna av den alifatiska serien uppvisar högst 12 kolatomer och de är osubstituerade eller substituerade med en eller två funktionella grupper, vilka är valda bland en grupp som består av amino-, hydroxi-, merkapto-, aldehyd-, keto-, karboxi-, vätekarbyl- och divätekarbylaminogrupper, eter-, ester-, tioeter-, tioester-, acetal-, ketal-, karbalkoxi-, karbamid- och substituerade karbamidgrupper, varvid vätekarbylradika-

lerna har en eller två alkylgrupper som i dessa funktionellt modifierade grupper uppvisar högst 6 kolatomer och varvid kolatomkedjan i dylika alkoholer av den alifatiska serien kan uppvisa heteroatomer, som är syre, svavel eller kväve.

6. Förfarande enligt något av patentkraven 1 - 4, k ä n n e t e c k n a t av att folierna eller fibrerna framställs av estrar av den aralifatiska serien, varvid alkoholerna av den aralifatiska serien har minst en bensenrest och den alifatiska kedjan har högst 4 kolatomer och bensenresten såsom substituent uppvisar 1 - 3 metyl- eller hydroxigrupper eller halogenatomer och den alifatiska kedjan såsom substituent kan ha en eller två funktionella grupper, vilka är valda bland en grupp bestående av fria aminogrunder, mono- eller dietylgrupper eller pyrrolidin- eller piperidingrunder.

7. Förfarande enligt något av de föregående patentkraven, k ä n n e t e c k n a t av att för framställning av folierna eller fibrerna används ett eller flera av följande ämnen:

hyaluronsyrans partiella propylester, vars karboxylgrupper till 50 % är i esterform och till 50 % i formen av ett natriumsalt,

hyaluronsyrans partiella isopropylester, vars karboxylgrupper till 50 % är i esterform och till 50 % i formen av ett natriumsalt,

hyaluronsyrans partiella propylester, vars karboxylgrupper till 85 % är i esterform och till 15 % i formen av ett natriumsalt,

hyaluronsyrans partiella etylester, vars karboxylgrupper till 75 % är i esterform och till 25 % i formen av ett natriumsalt,

hyaluronsyrans partiella metylester, vars karboxylgrupper

till 75 % är i esterform och till 25 % i formen av ett natriumsalt,

hyaluronsyrans fullständiga metylester,

hyaluronsyrans fullständiga etylester,

hyaluronsyrans fullständiga propylester,

hyaluronsyrans partiella butylester, vars karboxylgrupper till 50 % är i esterform och till 50 % i formen av ett natriumsalt,

hyaluronsyrans partiella etoxikarbonylmetyler, vars karboxylgrupper till 75 % är i esterform och till 25 % i formen av ett natriumsalt,

hyaluronsyrans fullständiga pentylester,

hyaluronsyrans fullständiga isopentylester,

hyaluronsyrans fullständiga bensenester,

hyaluronsyrans fullständiga fenyletyler,

8. För sanitets- och kirurgiskt bruk avsedda folier och fibrer, vilka är ämnade för icke-terapeutisk användning, k ä n n e t e c k n a d e av att de innehåller fullständiga eller partiella estrar bildade av hyaluronsyra och alkoholer av den alifatiska eller den aralifatiska serien eller salter av dessa estrar bildade av oorganiska eller organiska syror.