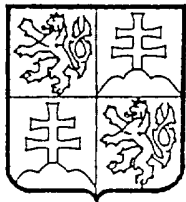


ČESKÁ A SLOVENSKÁ
FEDERATIVNÍ
REPUBLIKA
(19)



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

PATENTOVÝ SPIS 275 626

(11) Číslo dokumentu :

(21) Číslo přihlášky : 5180-89.Y

(22) Přihlášeno : 08 09 89

(30) Prioritní data :

(13) Druh dokumentu : B 6

(51) Int. Cl.³ :
A 61 K 31/715

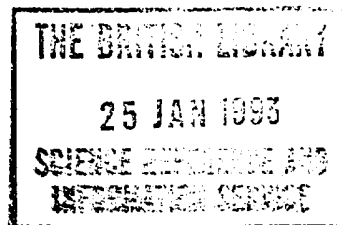
(40) Zveřejněno : 13 12 90

(47) Uděleno : 20 12 91

(24) Oznámeno udělení ve Věstníku : 18 03 92

(73) Majitel patentu : ÚSTAV EXPERIMENTÁLNEJ FARMAKOLÓGIE SAV,
BRATISLAVA

(72) Původce vynálezu : CHABREČEK PETER RNDr.CSc.,
ŠOLTÉS LADISLAV ing.CSc., BRATISLAVA,
NEDVĚD VÁCLAV ing., HOLÍČ,
BLÁŽEK ANTON akademik,
GUTTMANN MICHAL ing.JUDr.,
BENEŠ LUDĚK doc.RNDr.OrSc., BRATISLAVA



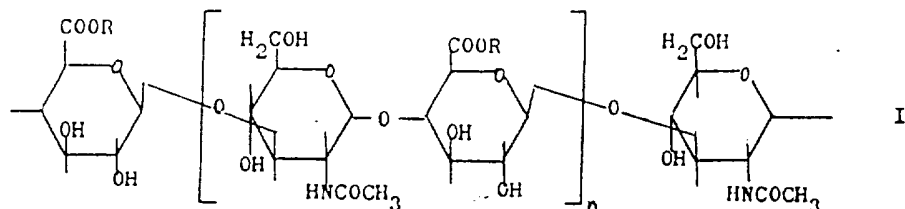
(54) Název vynálezu : Spůsob přípravy frakcí kyseliny hyaluronové
vej alebo jej solí

(57) Anotace :

Rieši spôsob prípravy frakcií kyseliny hyaluronovej (HA) alebo jej solí o definovanej molekulovej hmotnosti. Postup spočíva v tom, že na roztok HA alebo jej solí s výhodou o koncentrácii 0,01 až 1,00 % hmot. sa pôsobí ultrazvukom o frekvencii 16 až 450 kHz, po dobu 1 až 90 min. Pred a/alebo po pôsobení ultrazvuku sa roztok látky s výhodou nechá prechádzať cez vrstvu iontomeniča, s výhodou zo skupiny derivátov karboxymetylcelulózy. Charakterizácia distribúcie molekulových hmotností sa robí metódou HP GPC. Produkt nie je kontaminovaný cudzou látkou. Pôsobenie ultrazvuku je homogénne a okamžité. Postup umožňuje využitie v preparatívnom i v analytickom merítke.

Vynález sa týka spôsobu prípravy frakcií kyseliny hyalurónovej alebo jej solí o definovanej molekulovej hmotnosti.

Kyselina hyalurónová (HA) resp. jej soli všeobecného vzorca I



kde R je vodík, sodík, draslík alebo iný kation prípadne rôzne kationy, je polysacharid glykozaminoglykán s opakujúcimi sa jednotkami glukoronátu a N-acetylglukózami (Balazs E.A. US patent 4141973, 1979). Tieto látky sú endogénne polymérne produkty prítomné v spojivových tkanivách organizmov i mikroorganizmov. HA resp. jej soli je možné získať z tkaniva kohútich hrebienkov, z ľudskej pupočnej šnúry, zo sklovca alebo z priedušnice hovädzieho dobytku, alebo z baktérií *Streptococcus zooepidemicus*. Kyselina hyalurónová alebo jej soli izolované z ktoréhokoľvek zdroja sú štrukturálne identické, môžu však byť izolované s variabilným stupňom čistoty i polymerizačného stupňa.

Jedným z rozhodujúcich faktorov úspešného použitia izolovanej kyseliny hyalurónovej v humánnej medicíne je popri jej nízkej toxicite a tolerabilite organizmu človeka (neboli pozorované žiadne vedľajšie účinky imunitné, zápalové ani alergické) významná i molekulová hmotnosť biopolyméru. V očnej chirurgii, reumatológii a i. sú požadované vzorky s molekulovou hmotnosťou rádovo 5×10^6 daltonov (Holmberg A.S., Philipson B.T.: *Ophthalmology* 91, 53-59, 1984; Pape L.G., Balazs E.A.: *Ophthalmology* 86, 109, 1979; Miller D., Stegmann R.: *Ophthalmology* 86, 109, 1979; Healon^R (sodium hyaluronate) Technical Information and Clinical Experience, Pharmacia, Sweden 1985). Naopak pre aplikácie v kozmetike, dermatológii, prípadne v niektorých veterinárnych indikáciách sú potrebné biopolyméry s molekulovou hmotnosťou rádovo 10^5 daltonov i menej (Van Brunt J.: *Biotechnology* 4, 780-782, 1986).

Bezpečné použitie HA a jej solí v klinickej i veterinárnej medicíne, ako i v iných humánných aplikáciách vyžaduje použitie definovaných frakcií a teda kontrolu molekulovej hmotnosti resp. kontrolu distribúcie molekulových hmotností. Pre charakterizáciu distribúcie mol. hmotností, ako aj pre stanovenie priemerov molekulových hmotností polymérov sa dnes vo svete najfrekvencovanejšie používa metóda vysokoučinnnej gélovej permeačnej chromatografie (HP GPC).

Metóda HP GPC nie je absolútnou fyzikálno-chemickou metódou, a preto dané experimentálne zariadenie je potrebné kalibrovať definovanými frakciami kyseliny hyalurónovej resp. jej solí. Izolovanie frakcií HA alebo jej solí z biologického materiálu je samozrejme možné, avšak získané frakcie sú do rôznej miery kontaminované a v praxi prakticky nepoužiteľné. Jedným z možných riešení je zvoliť ako zdroj východiskovej HA alebo jej solí definované živočíšne tkanivo, kde reprodukovateľným biotechnologickým postupom sa získa biopolymér o definovanej čistote, z ktorého sa potom depolymerizáciou získajú vhodné frakcie.

V súčasnosti ako jeden z najprogresívnejších zdrojov HA je tkanivo kohútich hrebienkov. Z týchto je HA izolovaná postupom podľa patentov a autorských osvedčení (Balazs E.A.: US Patent 414 1973, 1979; čs. autorské osvedčenie č. 267 079) o definovanej biologickej čistote. Týmto postupom získaná kyselina hyalurónová má veľmi vysokú molekulovú hmotnosť - rádovo 1 až 5×10^6 daltonov (Beatty N.B., Tew W.P., Mello R.J.: *Analyt. Biochem.* 147, 387-395, 1985; Dark W.A.: *Am. Lab./Fairfield Comm.* 20/8A/, 22, 1988; Bothner H., Waaler T., Wik O.: *Int. J. Biol. Macromol.* 10, 287-291, 1988).

Pre prípravu frakcií HA alebo jej solí z tohto biopolyméru boli v analytickom merítku publikované v zásade dva postupy: fyzikálno-chemický a biologický (enzymatický).

Enzymatický postup (Beatty N.B., Tew W.P., Mello R.J.: *Analyt. Biochem.* 147, 387-395, 1985; Turner R.I., Lin P., Cowman M.K.: *Arch. Biochem. Biophys.* 265/2/, 484-495, 1988; Iwata S.: *Folia Ophthalmol. Jpn.* 38, 927-935, 1987) je pre prípravu frakcií kyseliny hyaluronovej s nižšími molekulovými hmotnosťami v zásade použiteľný, ovšem limitujúcim faktorom je separáciu vzniknutých frakcií biopolyméru od použitého enzýmu-hyaluronidázy.

Fyzikálno-chemické postupy obchádzajú potrebu separačno-purifikačných postupov výsledného biopolyméru od použitého enzýmu pri biologickom postupe tým spôsobom, že fyzikálno-chemický agens nezvyšuje komplexitu výslednej vzorky. Na depolymerizáciu HA a jej solí boli použité rôzne fyzikálno-chemické agensy:

1. Pôsobenie zvýšenej teploty v autokláve (Beatty N.B., Tew W.P., Mello R.J.: *Analyt. Biochem.* 147, 387-395, 1985; Bother M., Waaler T., Wik O.: *Int. J. Biol. Macromol.* 10, 287-291, 1988).
2. Ožiarovanie UV svetlom alebo tokom elektrónov (Balazs E.A., Laurent T.C., Howe A.F., Varga L.: *Radiat. Res.* 11, 149, 1958; Balazs E.A., Davies J.V., Philips G.O., Young M.D.: *Radiat. Res.* 31, 243, 1967).
3. Kyslá alebo alkalická hydrolýza (Cleland R.L.: *Biopolymers* 23, 647, 1984; Cleland R.L.: *Arch. Biochem. Biophys.* 180, 57-68, 1977).
4. Účinky voľných radikálov (Wong S.F., Halliwell B., Richmond R., Skowronek W.R.: *J. Inorg. Biochem.* 14, 127, 1981; Lál M.: *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 92, 105, 1985).

Úspešné použitie horeuvedených postupov je však značne limitované vzhľadom na fakt nehomogenity kineticky riadených reakcií (ako je napr. prestup tepla vzorkou pri termickej degradácii alebo difúzia radikálov pri depolymerizačných účinkoch radikálov), ktorá je zvlášť výrazná, popri analytických postupoch, najmä v aplikáciách v semipreparatívnom a preparatívnom merítku.

Uvedené nevýhody všetkých doteraz navrhovaných a používaných postupov odstraňuje spôsob prípravy frakcií HA alebo jej solí s definovanou molekulovou hmotnosťou podľa vynálezu, ktorého podstatou je, že sa na roztok kyseliny hyaluronovej alebo jej solí, s výhodou o koncentrácii 0,01 až 1,00 % hmot. pôsobí ultrazvukom o frekvencii 16 až 450 kHz, po dobu 1 až 90 minút. Pred a/alebo po pôsobení ultrazvuku sa roztok látky aspoň jedenkrát prečistí prechodom cez vrstvu iontomeniča, s výhodou zo skupiny derivátov karboxymetylcelulózy, prednostne pred pôsobením ultrazvuku.

Výhodou použitia ultrazvuku je, že sa vzorka biopolyméru nekontaminuje ďalším chemickým, prípadne biochemickým činidlom. Účinok vysoko energetického elektromagnetického žiarenia nie je limitovaný efektívnymi kinetickými faktormi, pôsobenie ultrazvuku je homogénne a okamžité, čo umožňuje jeho využitie ako v analytickom, tak aj v preparatívnom merítku. Reakcia depolymerizácie kyseliny hyaluronovej alebo jej solí ultrazvukom je energeticky, prístrojovo a materiálne málo náročná, čistá a jednoduchá.

Ďalej uvedené príklady ozrejmujú navrhovaný postup, pričom nijako neobmedzujú rozsah ochrany, na ktoré sa navrhovaný vynález má vzťahovať.

Príklad 1

Do 1 ml 0,05 % hmot. roztoku horečnato-sodnej soli kyseliny hyaluronovej v 0,1 M vodnom NaNO_3 , predčisteného na separačnej minikolónke s vrstvou karboxymetylcelulózy, sa ponorila ultrazvuková sonda s frekvenciou 20 kHz a energiou 100 W po dobu 5 min. Pôsobením ultrazvuku klesla molekulová hmotnosť hyaluronátu sodného z pôvodných $\bar{M}_p = 1,26 \times 10^6$ Dana $6,67 \times 10^5$ Da. Molekulové hmotnosti biopolymérov boli stanovené metódou vysokoúčinnnej gélovej permeačnej chromatografie (HP GPC) na dvoch kolónach, naplnených sorbentom hydroxy-

etylmetakrylátom (Separon HEMA-S 1000 a Separon HEMA-S 300), zapojených v sérii. Mobilnú fázu tvoril 0,1 M vodný roztok dusičnanu sodného NaNO_3 a na detekciu bol použitý refrakto-metrický detektor.

Príklad 2

Do 1 ml 0,05 % hmot. roztoku horečnato-sodnej soli kyseliny hyalurónovej v 0,1 M vodnom NaNO_3 , predčisteného na separačnej minikolónke s vrstvou karboxymetylcelulózy, sa ponorila ultrazvuková sonda s frekvenciou 40 kHz a energiou 150 W po dobu 75 min. Pôsobením ultrazvuku poklesla molekulová hmotnosť hyaluronátu sodného z pôvodných $\bar{M}_p = 1,13 \times 10^6$ Da na $2,16 \times 10^5$ Da. Molekulové hmotnosti hyaluronátu sodného sa stanovili uvedenou metódou HP GPC.

Príklad 3

Na 10 ml 0,5 % hmot. roztoku sodnej soli kyseliny hyalurónovej v 0,1 M vodnom NaNO_3 , predčisteného na separačnej minikolónke s vrstvou karboxymetylcelulózy, sa pôsobilo ultrazvukom s frekvenciou 150 kHz a energiou 400 W po dobu 24 min. Pôsobením ultrazvuku na uzatvorenej vzorku sa zmenila molekulová hmotnosť hyaluronátu sodného z $2,05 \times 10^6$ Da na $5,66 \times 10^5$ Da. Molekulové hmotnosti biopolymérov sa stanovili uvedenou HP GPC metódou.

Príklad 4

Do 1 ml 1,0 % hmot. roztoku kyseliny hyaluronovej v 0,1 M vodnom NaNO_3 , predčisteného na separačnej minikolónke s vrstvou karboxymetylcelulózy, sa ponorila ultrazvuková sonda s frekvenciou 20 kHz a energiou 150 W po dobu 15 min. Pôsobením ultrazvuku poklesla mol. hmotnosť kyseliny hyalurónovej z hodnoty $\bar{M}_p = 1,49 \times 10^6$ Da na hodnotu $3,32 \times 10^5$ Da. Molekulové hmotnosti HA boli merané uvedenou HP GPC metódou.

Používané ultrazvukové zariadenia majú výkon v rozsahu 40 až 400 W, pričom s výhodou sa používa zariadenie o výkone okolo 150 W.

.. P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Spôsob prípravy frakcií kyseliny hyalurónovej alebo jej solí o definovanej molekulovej hmotnosti, vyznačujúci sa tým, že sa na roztok kyseliny hyalurónovej alebo jej solí pôsobí ultrazvukom o frekvencii 16 až 450 kHz, po dobu 1 až 90 min.
2. Spôsob prípravy podľa bodu 1, vyznačujúci sa tým, že pred a/alebo po pôsobení ultrazvuku sa roztok látky aspoň jedenkrát nechá prechádzať cez vrstvu iontomeniča, s výhodou zo skupiny derivátov karboxymetylcelulózy.
3. Spôsob prípravy podľa bodu 1, vyznačujúci sa tým, že sa použije roztok kyseliny hyalurónovej alebo jej solí o koncentrácii 0,01 až 1,00 % hmot.