

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(21) Číslo dokumentu:

2012-843

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.:

D01D 5/06 (2006.01)

D01F 9/00 (2006.01)

C08B 37/08 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **27.11.2012**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **05.02.2014**

(Věstník č. 6/2014)

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

(72) Původce:
Běťák Jiří, Dolní Újezd, CZ
Buffa Radovan, 06601 Humenné, SK
Němcová Miroslava, Choceň, CZ
Pitucha Tomáš, Bílá Třemešná, CZ
Kulhánek Jaromír, Pardubice, CZ
Matějková Ilona, Ústí nad Orlicí, CZ
Nováková Jana, Lanškroun, CZ
Vištejnová Lucie, Kralovice, CZ
Klein Pavel, Dolní Dobrouč, CZ
Kubíčková Gabriela, Vamberk, CZ
Broulíková Markéta, Česká Třebová, CZ
Felgrová Michaela, Ústí nad Orlicí, CZ
Velebný Vladimír, Žamberk, CZ

(74) Zástupce:
Ing. Lucie Lunzarová, Mendlovo nám. 1a, Brno,
60300

(54) Název přihlášky vynálezu:
**Nekonečná vlákna na bázi hyaluronanu,
selektivně oxidovaného v poloze 6 N-acetyl-
D-glukosaminové části, jejich příprava,
použití, nitě, stříže, příze, textilie a způsob
jejich úpravy**

(57) Anotace:
Předkládané řešení se týká přípravy textilně
zpracovatelných nekonečných mono a multifilamentů na
bázi aldehyd-modifikovaného hyaluronanu v poloze 6
jeho N-acetyl-D-glukosaminové části a jejich následné
povrchové úpravy pomocí nízkomolekulárních
dihydrázidů. Vlákna a následné textilie z nich připravené
vykazují časově proměnlivou dobu rozpustnosti ve
fyziologickém roztoku v závislosti na jejich povrchové
úpravě. Vlákna a textilie po povrchové úpravě mají
prodlouženou dobu přechodu v rovnoměrnou gelovou
vrstvu. Povrchovou modifikací vláknenných materiálů je
zachována plná biokompatibilita materiálů.

CZ 2012 - 843 A3

Nekonečná vlákna na bázi hyaluronanu selektivně oxidovaného v poloze 6 *N*-acetyl-D-glukosaminové části, jejich příprava, použití, nitě, stříže, přize, textilie a způsob jejich úpravy

Oblast techniky

- 5 Vynález se týká přípravy a následného textilního zpracování nekonečných vláken na bázi hyaluronanu selektivně oxidovaného v poloze 6 *N*-acetyl-D-glukosaminové části vykazující zlepšené zpracovatelské vlastnosti s ohledem na prodloužené doby transformace na biokompatibilní gel.

Stav techniky

- 10 Kyselina hyaluronová/hyaluronan patří do skupiny nesulfatovaných glykosaminoglykanů skládající se z opakujících se disacharidických jednotek *N*-acetyl-D-glukosaminu a D-glukuronové kyseliny. Jedná se o látku běžně se vyskytující v lidském organismu, převážně v tělních tekutinách zabezpečujících viskosuplementaci, či lubrikaci tkání (např. součást synoviální tekutiny, či očního
- 15 sklivce). V literatuře jsou popsány její pozitivní účinky při hojení ran, kdy při prvotních fázích hojení napomáhá ke granulaci hojící se tkáně. Z tohoto důvodu patří tato látka mezi vyhledávané součásti hojivých formulací. Pro kyselinu hyaluronovou je definována charakterická vazba k buněčným receptorům typu CD44, čehož lze využít např. při cílené regulaci buněk pomocí specifických léčiv navázaných na
- 20 hyaluronan. Z literatury je známé, že tato vazba hyaluronanu na receptor CD44 je podmíněna přítomností volné karboxylové skupiny na hyaluronanu.

- Kyselina hyaluronová je v těle rychle degradována pomocí enzymů selektivně štěpících glykosidické vazby, čímž dochází k postupnému poklesu molekulové hmotnosti až na jednotky sacharidických merů, které jsou dále v organismu
- 25 metabolizovány.

Kyselina hyaluronová je pro své lubrikační a hojivé účinky často využívána ve formě viskózního hydrogelu ke zvyšování bioakceptance medicínálních implantátů. Mazací gelové formy pro vnitřní aplikace mají ovšem určité nevýhody, např. plošná nerovnoměrnost distribuce gelu v místě aplikace.

Rovnoměrnost distribuce lze s úspěchem řešit aplikací plošné, či tubulární textilie, vytvořené z postupně gelujících vláken. Takovéto textilie, vytvořené z materiálu, který je předmětem patentové přihlášky, dosud nebyly v literatuře popsány. Oproti gelové formě představuje počáteční forma suché textilie značnou flexibilitní i mechanickou výhodou. Aplikovanou textilií je oproti roztíratelnému gelu možné při inzerci stříhově upravit přesně podle potřeby vnitřní rány, množství aplikovaného polymeru lze dále upravovat variabilní velikostí ok v rámci textilní vazby.

Z aplikačních důvodů je nezbytné, aby vlákna (textilie) při inzerci vykazovala na počátku určité antiadhezní vlastnosti, aby nedocházelo k okamžitému přilnutí k vlhké tkáni, které by lékaře omezovalo v možnosti následného urovnání, či přesunu textilie v rámci aplikačního místa. Z těchto důvodů je vyžadována určitá dostatečně dlouhá manipulační stabilita textilního materiálu.

Tvorba vláken a textilií z čisté kyseliny hyaluronové či její soli v její nativní podobě je popisována ve dvou patentových přihláškách WO2009/050389 a PV2010-1001.

V první zmiňované přihlášce (WO2009/050389) autoři popisují možnost přípravy vláken z kyseliny hyaluronové či její soli extruzí do koncentrované kyseliny octové s přípustným obsahem vody do 20 % (tj. 80% kyselina octová). Autoři druhé zmiňované patentové přihlášky PV2010-1001 připravují vlákna koagulací polymerního roztoku do směsi organické kyseliny a alkoholu (v nárokové části jsou uvedeny obsahy obou komponent v rozsahu 1-99 hm%, organické kyseliny jsou dále preferenčně vyspecifikovány v řadě k. mravenčí, k. octová a k. propionová).

Příprava vláken do výše uvedených srážecích lázní sice, jak autoři tvrdí, vede k tvorbě vláknenného produktu, nicméně z technologického hlediska lze užití lázní obsahujících výše zmíněné kyseliny bezesporu považovat za velmi problematické z hlediska extrémně intenzivního štiplavého zápachu, kdy páry zmíněných kyselin představují reálné bezpečnostní riziko pro operátory obsluhující zvlákňovací zařízení. Tento problém je nutné při výrobním procesu poměrně komplikovaně a nákladně řešit technologickými opatřeními. Již pouze podle screeningových literárních zdrojů (Wikipedia) je možné nalézt informace o toxických vlastnostech těchto látek na lidský organismus. Kyselina mravenčí je v těle metabolizována na methanol a jeho zvýšená koncentrace může způsobovat trvalé poškození očního nervu, dále pak je u této kyseliny popsáno možné chronické poškození ledvin. Kyselina octová se opět

*17. 11. 2010
K. Mravenčí*

vyznačuje intenzivním zápachem a vzhledem k její vysoké těkavosti, zvláště při vyšších koncentracích, též její páry způsobují těžké poleptání sliznic. Dále zmiňovaná kyselina propionová je obecně uznaným jaterním toxinem způsobujícím propionovou acidemii (Wikipedia).

- 5 Vláknna na bázi nativní kyseliny hyaluronové, popisovaná ve výše diskutovaných patentech, se vyznačují extrémně silnou afinitou k vodě, která způsobuje jejich rozpuštění řádově v jednotkách až desítkách sekund po expozici do vlhkého prostředí. Tato doba ovšem není prakticky dostatečná pro situace, kdy má lékař ve vlhkých rukavicích vlákenný materiál inzerovat na místo aplikace. Textilní materiály
10 vytvořené čistě z filamentů na výše uvedené bázi tedy nemají v chirurgické praxi z těchto důvodů přílišnou aplikační využitelnost.

Z tohoto důvodu je všeobecnou snahou příprava textilních materiálů na bázi síťované kyseliny hyaluronové, jejíž řetězce jsou vzájemně propojeny příčnými chemickými vazbami, či vazbami čistě fyzikální povahy (elektrostatické interakce, či hydrofobní interakce).
15

Na tomto základě je v literatuře popisována příprava vláken z řady chemicky modifikovaných hyaluronanů, která se ovšem snaží vlákno maximálně rozpustnostně stabilizovat, aby jeho rezidence ve formě nabobtnalého vlákna v místě interní tělní aplikace setrvalo co nejdéle.

- 20 V patentovém spisu *US2006/0281912 A1*, je popisováno zvláknování kyseliny hyaluronové modifikované pomocí cetyltrimethylamonia, vedoucí k zablokování karboxylové skupiny na glukuronové části hyaluronu, čímž dochází k situaci, že takto modifikovaný polymer pozbývá schopnosti stabilizace vodíkovými můstky a hlavní meziřetězcovou kohezní funkci, tj. soudržnost jednotlivých řetězců, přebírají nově
25 vytvořené hydrofobní interakce dlouhých (C16-cetyltrimethylamonium) alifatických boční řetězců. Tyto interakce jsou ovšem podstatně slabší než vodíkové můstky, což způsobuje termolabilitu takto modifikovaného derivátu hyaluronanu. Takto upravený hyaluronan je následně zvláknován metodou zvláknování z taveniny. Důležitou otázkou ovšem zůstává vliv blokace karboxylových skupin hyaluronanu na jeho
30 biologické vlastnosti, které jsou všeobecně přisuzovány právě těmto funkčním skupinám na hyaluronanu.

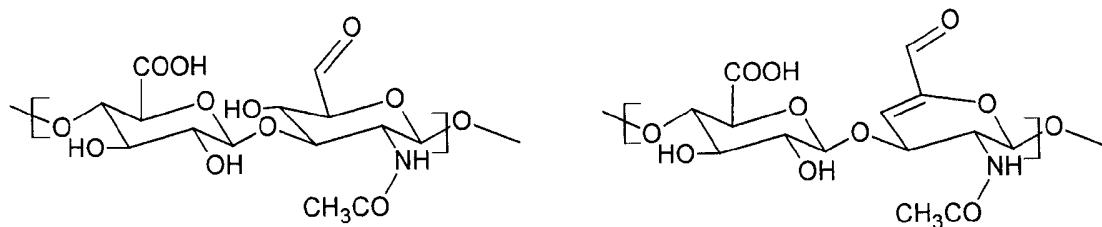
V přihláškách WO2010095049A1 a WO2010095056 A2 je dále popisována příprava vláken metodou mokrého zvlákňování dvojice různě modifikovaných hyaluronanů a následně vzájemně síťovaných pomocí tzv. „click“ reakcí. Takto zesíťovaná vlákna vykazují ve srovnání s vlákny z nativního hyaluronanu též značnou hydrolytickou odolnost. Popisované chemické zesíťování hyaluronanových řetězců probíhá mezi dvěma typy polymerních řetězců, které jsou funkcionalizovány skupinami (thiol, azid, alkin, alken a karbonyl). Reakce poté probíhá cykloadičním mechanismem za tvorby převážně pětičlenného kruhu. Proces síťování vláken je zde indukován zvýšením teploty. Vlákna vytvořená tímto procesem se opět vyznačují značnou hydrolytickou stabilitou, a nelze je tedy považovat za elementy tvořící v těle v místě inserce vláknenného materiálu hydrolyticky rozpustný tekutý lubrikující gel.

Hydrolytické stabilizace vláken může být dále dosahováno s využitím fotosíťovacích reakcí, které jsou popsány v patentové přihlášce WO2010061005. V tomto případě je zde využito methakrylovaného derivátu hyaluronanu, který po expozici UV záření vytvoří prostorovou polymerní síť. V tomto případě je ovšem použitý materiál diskutabilní z hlediska toxicity degradačních produktů, kdy methakrylátové štěpy, či špatně vyprané nezreagované methakryláty mohou způsobovat dráždivé reakce organismu. Methakrylátová rezidua, uvolněná v průběhu enzymatické degradace, která se zde zcela jistě uplatňuje, jsou popsána jako kancerogenní látky. Patent je ovšem přednostně zaměřen na tvorbu tužších a stabilních hydrogelových materiálů, nicméně forma vlákna je zmíněna v jednom z jeho patentových nároků.

Další skupinou patentů popisující tvorbu vláken z modifikovaného hyaluronanu jsou přihlášky WO 93/11803, WO 98/08876, US 5658582, US 2004/0192643 A1, které popisují zvlákňování hyaluronanu esterifikovaného na jeho karboxylové skupině. Vlákna jsou připravována metodou mokrého zvlákňování a opět se vyznačují dlouhodobější stabilitou, a nelze je tedy použít při inserci do těla jako textilie vedoucí k rovnoměrně distribuovanému postupně vznikajícímu viskóznímu gelu.

Vlákna připravována v rámci této předkládané patentové přihlášky jsou připravována z vodných roztoků hyaluronanu selektivně oxidovaného v poloze 6 na N-acetyl-D-glukosaminu. Finální chemické struktury takto specificky modifikovaného hyaluronanu jsou autory příslušných syntézních patentů WO 2011/069475, WO 2011/069474 a CZ PV 2012-537 popisovány tak, že při takto provedené selektivní

oxidaci vedoucí ke vzniku aldehydicke skupiny nedochází k narušení pyranozového sacharidického kruhu, čímž není významně ovlivněna lineární nadmolekulární struktura polysacharidového řetězce.



5

Schéma1: Struktura zvlákňovaného oxidovaného hyaluronanu v poloze 6 jeho *N*-acetyl-*D*-glukosaminové části (WO 2011/069474 , WO 2011/069475 a CZ PV 2012-537).

Zachování maximální přímosti polymerního řetězce zvlákňovaných polymerů je obecně považováno za výhodné pro tvorbu mechanicky pevných nekonečných vláken, protože umožňuje vyšší míru paralelního uspořádání jednotlivých makromolekulárních řetězců, což vede k celkové stabilizaci vlákna (Hladík, Textilní vlákna). Mechanické vlastnosti nekonečných monofilamentů jsou přitom kritické pro jejich následnou textilní zpracovatelnost.

V patentové přihlášce US2004/0101546A1 je zmiňována příprava hemostatických textilních materiálů, které jsou připravovány oxidací polysacharidické textilie reakcí s NaIO_4 za vzniku povrchových aldehydicke skupin (Schéma 2). V příkladech provedení je úprava popisována pouze na celulósových pleteninách a netkaných textiliích.

Na takto modifikované textilie je podle autorů možné dále chemicky navazovat nízkomolekulárními aminy (např. peptidy). Vzniklou nestabilní iminovou vazbu je následně možné redukovat pomocí borohydridu sodného, kyanoborohydridu sodného, či aminboranů. Popisovaný vynález ovšem nikterak neřeší problematiku tvorby nekonečných monofilamentových vláken, která by byla samostatně textilně zpracovatelná, a tedy poskytovala aldehydicke vazby (stabilizační acetalové vazby) v celém objemu vlákna, nikoliv pouze na jeho povrchu.

25

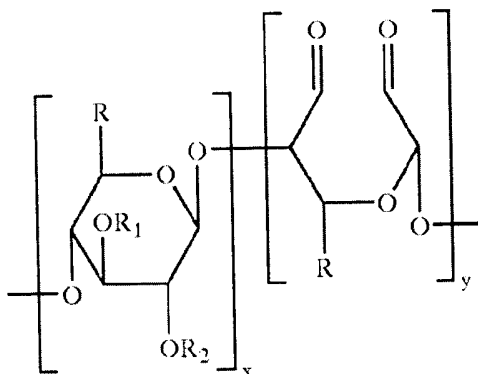


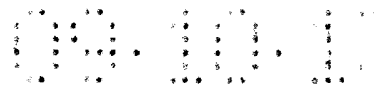
Schéma 2: Polysacharid oxidovaný na hyaluronan pomocí NaIO_4 , kdy dochází k rozrušení (nalomení) polysacharidického skeletu.

- 5 Součástí stavu techniky je dále využití aldehyd-modifikovaného hyaluronanu pro tvorbu prosítovaných hydrogelů pro tvorbu gelových scaffoldových systémů či nosičových systémů (EP1115433 B1, WO2010138074 A1, WO2009108100 A1).

Popis obdobné technologie tvorby nekonečných vláken, nití, pletených, či tkaných
 10 textilií na bázi hyaluronanu selektivně oxidovaného na aldehyd v poloze 6 N-acetyl-D-glukosaminové části, podle níže uvedené podstaty předkládaného vynálezu, nebyl v literatuře nalezen.

Podstata vynálezu

Podstata předkládaného vynálezu spočívá ve způsobu výroby nových textilně
 zpracovatelných nekonečných monofilamentů, sdružených multifilamentů, či
 15 multifilamentových nití a následně jejich textilně zpracovaných produktů na bázi selektivně oxidovaného hyaluronanu v poloze 6 na N-acetyl-D-glukosaminové části a jeho další povrchovou modifikací pomocí nízkomolekulárních dihydrazidů. Výhoda takto připravených vlákenných materiálů oproti výše uvedeným řešením stavu techniky je ta, že se vyznačují tím, že vlákna po inzerci do těla fungují jako
 20 gelotvorné elementy, kdy je ovšem jejich spontánní transformace na viskózní gel posunuta řádově od 30 min (neupravovaná vlákna) do 72 hodin (vlákna povrchově upravená). Následně dochází vlivem bobtnacích sil k porušení zesíťovaného povrchu vláken, obnažení nesíťovaného středu vlákna a jeho gelotvornému rozpadu.



Vlákna z oxidovaného hyaluronanu, popisovaná v rámci této přihlášky vynálezu, jsou v celém svém objemu stabilizována acetalovými vazbami mezi aldehydickými a hydroxylovými skupinami polymerního řetězce. Acetalové vazby představují hydrolyticky nestabilní struktury, které jsou následně po zvlhčení postupně degradovány až do totální transformace vlákna v požadovanou lubrikující gelovou formu. Přesto tato vlákna vykazují podstatně delší nerozpustnost než v případě vláken z nativního hyaluronanu. Vlákna/textilie při ponoření do vody vydrží v kompaktním vlákenném tvaru po dobu minimálně 30 min a v tomto stavu je možné je např. v rámci této doby opětovně bez roztržení uchopit do pinzety. Tento fakt tedy představuje využitelný potenciál, kdy vlákna představují chemicky velmi podobný materiál nativnímu hyaluronanu. Vlákna i bez následné povrchové síťovací úpravy proto představují ve srovnání s vlákny z nativního hyaluronanu manipulačně vhodnější a též zcela biologicky akceptovatelný materiál. Při aplikaci může lékař s těmito vlákny, nitěmi, či textiliemi z nich vytvořenými, manipulovat i ve vlhkých rukavicích. Po cca 30 min tato vlákna přechází v lubrikující gel. Prodlouženou dobu transformace popisovaných nekonečných filamentů v biokompatibilní antiadhezní gel lze dále využít např. v rámci konstrukce kompozitních nití, či chirurgických textilií, kde je požadavek na následný vznik rovnoměrně distribuovaného gelu, zvyšující celkovou bioakceptovatelnost vnitřního textilního implantátu.

Konkrétně se tedy vynález týká přípravy vláken na bázi hyaluronanu selektivně oxidovaného v poloze 6 *N*-acetyl-D-glukosaminové části, kdy se nejprve připraví 4-6 %hmotn. vodný roztok oxidovaného hyaluronanu, který se extruduje do koagulační lázně obsahující 5 až 45 %hmotn. kyseliny mléčné, s výhodou 10 až 20%hmotn., min. 50%hmotn. nižšího alkoholu a 4-10%hmotn. vody za vzniku vlákna, které se následně promyje nižším alkoholem a suší. Nižším alkoholem pro promytí vlákna může být například ethanol, 1-propanol nebo izopropanol. Stejně tak i nižším alkoholem v koagulační lázni může být například ethanol, 1-propanol nebo izopropanol.

Dobu transformace popisovaných vláken v gel lze dále prodloužit aplikací povrchového zesíťování těchto vláken/nití či textilií jejich vložením do síťovacího roztoku, který je tvořen 70-80% alkoholem (methanol, ethanol, propan-1-ol, propan-2-ol), nízkomolekulárním dihydrazidem organické kyseliny a 20-30 % vody, jejíž přítomnost je nezbytná pro rozpuštění síťovacího dihydrazidu organické kyseliny, a to

na dobu od 10 minut do 24 hodin. Přítomností malého množství vody vlákno mírně bobtná, čímž je podpořena absorpce rozpuštěných dihydrazidů do svrchní kůry vlákna. Vlákná však musí být před aplikací stabilizační lázně suchá, aby mohla do sebe nasát síťovací lázeň s dihydrazidem. Příkladem nízkomolekulárního dihydrazidu organické kyseliny je s výhodou dihydrazid kyseliny sukcinové, adipové nebo pimelové v koncentracích od $5 \times 10^{-6} \text{M}$ do $0,01 \text{M}$, s výhodou ovšem při koncentraci $5 \times 10^{-3} \text{M}$ při teplotách mezi 20 až $50 \text{ }^\circ\text{C}$.

Vzhledem k tomu, že síťování vláken probíhá převážně na jejich povrchu, není možné přímo kalkulovat množství použitého síťovacího činidla, protože není zřejmé, kolik aldehydických skupin je přístupných reakci. Tento fakt je velmi důležitý pro efektivnost síťovacího procesu, protože při nadbytku dihydrazidu již neprobíhá síťovací reakce, ale naopak dochází ke zpětnému rozpadu zesítění. Z tohoto důvodu není optimální koncentrace síťovacího činidla nikterak na první pohled zřejmá a lze ji zjistit pouze experimentálně.

15

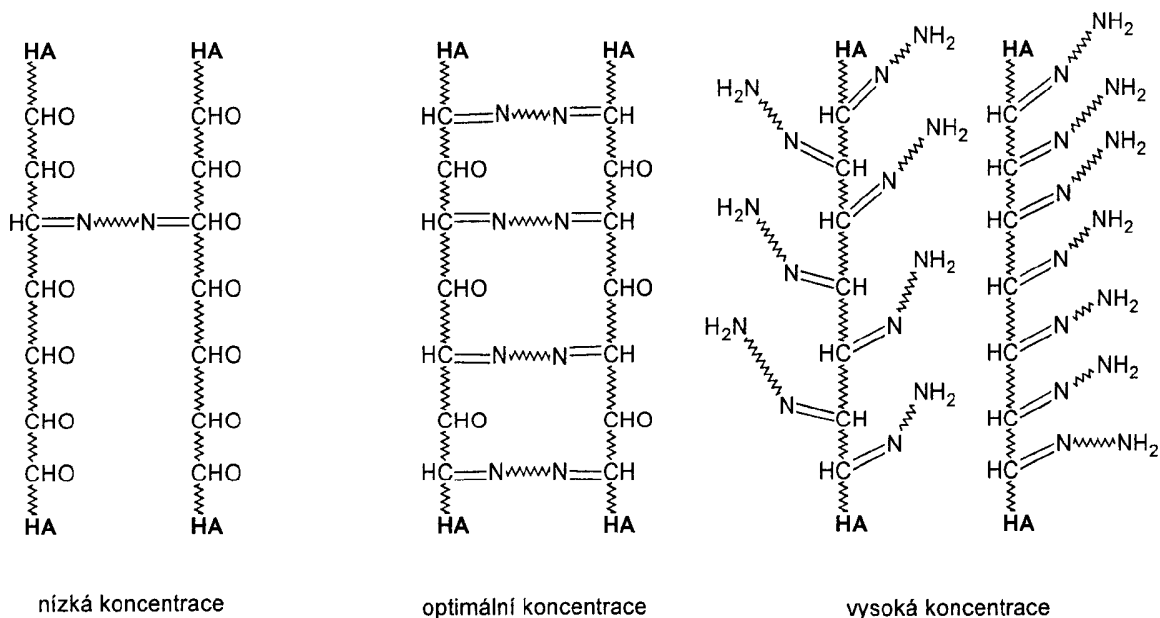


Schéma 3: Ilustrace optimální síťovací koncentrace aldehydických vláken

I přes tuto následnou úpravu za vzniku povrchové síťovací modifikace si vláknenné materiály zachovávají plnou biokompatibilitu a schopnost transformace v gel ve vlhkém fyziologickém prostředí krevní plazmy při tělní teplotě $37 \text{ }^\circ\text{C}$ v prodlouženém čase do 72 hodin.

20



Tyto aspekty významného prodloužení stability vláken poskytují aplikační výhodu oproti gelotvorným vláknům z nativního hyaluronanu, připravovaných podle patentových přihlášek WO2009/050389 a PV2010-1001, u kterých rozpad přichází řádově v desítkách sekund, a to již pouze při kontaktu s mokrou chirurgickou rukavicí, na kterou mají tendenci se zachytávat a rychle degradovat. Vlákná na bázi selektivně oxidovaného hyaluronanu v poloze 6 *N*-acetyl-D-glukosaminové části, popisované v této patentové přihlášce lze v počátečním stádiu aplikace považovat za gelotvorné materiály se sníženou adhezní schopností.

Další významný aspekt a inovativní postup navržený v rámci této patentové přihlášky se týká podstatného zefektivnění, zlevnění a snížení bezpečnostních rizik zvláknovací technologie, která je popisována v diskusi k výše uvedeným relevantním patentům WO2009/050389 a PV2010-1001.

Při tvorbě nekonečných vláken popisovaných v této patentové přihlášce metodou gelové extruze (gel spinning) do koagulační lázně je s výhodou použito směsi nižšího alkoholu a kyseliny mléčné, která se vyznačuje velmi nízkou těkavostí, čímž dochází k eliminaci intenzivního zápachu při zvláknování dle technologií zmiňovaných ve výše uvedených patentech. Je zde zároveň minimalizováno riziko akutního i chronického negativního zdravotního dopadu na operátory zvláknovacího zařízení. Na rozdíl od kyselin uvedených ve výše uvedených patentových přihláškách je kyselina mléčná považována za zdravotně zcela neproblematickou látku, která je běžně přítomna ve svalových tkáních a naopak je kvůli popsáným antiseptickým účinkům aktivně přimíchávána do rozličných kosmetických produktů. Kyselina mléčná/laktát je též běžně ve své polymerní formě využívána v medicíně jako součást polymerních degradabilních implantátů na bázi polylaktátů (PLA), či jejich kopolymerů s kyselinou glykolovou (PLGA). Z těchto důvodů i její případná rezidua v připravených vláknech/nitích či textiliích, které jsou v oblasti zájmu této patentové přihlášky, nejsou zcela nežádoucí.

Využití kyseliny mléčné oproti ostatním kyselinám, zmiňovaných ve dvou výše uvedených patentech, není zcela triviálním řešením, které by bylo analogicky odvoditelné. Oproti ostatním v patentech zmiňovaným kyselinám se totiž jedná v čistém stavu o pevnou krystalickou látku a při rozpouštění na 80% vodný roztok, ve kterém se standardně dodává, představuje podstatně viskóznější kapalinu než

v případě ostatních zmiňovaných kyselin, které jsou všechny vybrány z kategorie kapalných látek. Z výše uvedených důvodů (odlišný skupenský stav čisté látky) nelze využití kyseliny mléčné považovat za řešení, které je zcela nasnadě. A již vůbec nelze uvažovat fakt, že by mohla být oproti všem výše zmiňovaným kyselinám použita z těchto důvodů jako samostatné srážecí činidlo.

Účinným koagulačním činidlem pro tvorbu textilně zpracovatelných vláken na bázi zmiňovaného derivátu (oxidovaného hyaluronanu v poloze 6 N-acetyl-D-glukosaminové části) se stává pouze v rámci koncentrační oblasti v ternární směsi alkohol, k. mléčná a voda, kdy obsah alkoholu je ve směsi zastoupen min. 50 hm.-%. Optimalizačním výzkumem bylo stanoveno, že mechanicky pevná vlákna jsou tvořena pouze v určitém koncentračním rozmezí srážecí lázně obsahující k. mléčnou s jejím obsahem v lázni s výhodou v rozsahu od 5 do 45 hm.-%, doplněnou přísadkou nižšího alkoholu (ethanol, propan-1-ol, propan-2-ol). Obsah vody v lázni může být v rozmezí 4-10 %. Pouze v tomto koncentračním rozsahu složení koagulační lázně lze dosáhnout mechanicky pevného kontinuálně odtahovatelného vlákna z koagulační lázně. Z nutnosti experimentálně nalézt funkční složení koagulační lázně na bázi kyseliny mléčné je proto patrné, že se v případě použití lázně na bázi kyseliny mléčné nejedná o triviální řešení, jak je tomu u obou zmiňovaných relevantních patentů WO2009/050389 a PV2010-1001, kdy lze vlákna z hyaluronanu tvořit i v čisté kyselině (mravenčí, octová a propionová), které se svou viskozitou pohybují podstatně níže. Jak již ovšem bylo zmiňováno, páry těchto kyselin jsou značně zdravotně rizikové a zároveň mají vyšší korozivní účinky, což představuje zvýšené nároky na použité materiály koagulační vany.

Při nižším obsahu kyseliny mléčné v koagulační lázni vykazují vlákna vyšší křehkost, která je způsobena totální dehydratací tvořeného vlákna. Naopak při vyšší koncentraci kyseliny mléčné ve srážecí směsi se lázeň stává neúčinnou z důvodu její příliš vysoké viskozity.

Vlákna mohou být rovněž podrobena termickému zatěžování v teplotním rozsahu 75 až 85 °C po dobu alespoň 12 hodin, načež se vlákno nechá vychladnout při laboratorní teplotě a poté se podrobí působení alkoholického roztoku organických diamino sloučenin, např. 1,6-diaminohexanu, pro stabilizaci vlákna vůči hydrolýze. Ve vláknech po termické modifikaci vznikne jiný typ aldehydické skupiny (viz výše,

struktura 2 schéma 1). Vzniklá dvojná vazba je v konjugaci s aldehydickou skupinou, což umožňuje pevnější vázání široké škály amino linkerů v porovnání s termicky nemodifikovaným vláknem. Výsledkem je vyšší hydrolytická stabilita vzniklého síťování.

- 5 Dále se vynález týká vláken na bázi hyaluronanu selektivně oxidovaného v poloze 6 *N*-acetyl-D-glukosaminové části, která mohou být případně povrchově zesíťovaná. Nekonečné monofilamenty (vlákna) připravená způsobem podle vynálezu se vyznačují geometrickou stabilitou ve formě kompaktního vlákna ve vodě v řádu desítek minut za následné tvorby viskózního biokompatibilního a biodegradabilního
- 10 hydrogelu. Dále se vyznačují dostatečnou mechanickou pevností a flexibilitou pro jejich sdružování do podoby kábílků (nekroucených multifilamentů) ze dvou nebo více filamentů, či zakroucení do formy nití (kroucených multifilamentů) ze dvou nebo více vláken. Dále lze vlákna použít pro výrobu přízí, stříže, tkaných, pletených nebo netkaných textilií.
- 15 Vynález se také týká nití tvořených výše uvedenými vlákny, jakož i nití tvořených alespoň jedním vláknem podle vynálezu a alespoň jedním vláknem z jiného biodegradovatelného materiálu, užívaného v rámci chirurgických medicínálních aplikací např. (poly(2-hydroxyethylmethakrylát, poly(*N*-vinylpyrrolidon, poly(methyl methakrylát, poly(vinylalkohol, polyakrylová kyselina, poly(ethylen-co-vinylacetát,
- 20 poly(ethylenglykol), poly(methakrylová kyselina), polylaktáty, polyglykolidy, poly(laktid-co-glykolidy), polyanhydridy, polyorthoestery, polykaprolakton, polyhydroxyalkanoáty, chitosan, kolagen, či jejich kombinace). V neposlední řadě se vynález týká i vlákenné stříže a příze z ní vyrobené, na bázi vláken podle vynálezu. Z těchto vláken, nití (kroucených multifilamentů), kábílků (nekroucených
- 25 multifilamentů), příze či stříže, případně i v kombinaci s jinými vlákennými biodegradovatelnými materiály, pak lze vyrobit tkané, pletené a netkané textilie, které mohou být ve formě plošné nebo tubulární textilie nebo 3D scaffoldu.
- Mimoto se vynález týká i způsobu úpravy vláken, nití, vlákenných stříží, přízí a tkaných, pletených a netkaných textilií podle vynálezu, kde se na ně působí vodním
- 30 roztokem 70 až 80% alkoholu obsahujícím nízkomolekulární hydrazid organické kyseliny, který je v roztoku přítomen v koncentraci $5 \times 10^{-6} \text{M}$ do 0,01M, po dobu od 10 minut do 24 hodin při teplotě 20 až 50 °C. Nízkomolekulární dihydrazid organické

kyseliny může být opět vybrán ze skupiny zahrnující dihydrazid kyseliny sukcinové, dihydrazid kyseliny adipové nebo dihydrazid kyseliny pimelové.

Přehled obrázků na výkresech

Obr. 1 znázorňuje trhové síly opakované přípravy vláken.

5 **Obr. 2** znázorňuje trhové deformace opakované přípravy vláken.

Obr. 3 znázorňuje jemnosti opakované přípravy vláken.

Obr. 4 znázorňuje viabilitní test vláknenných materiálů z hyaluronanu selektivně oxidovaného na aldehyd v poloze 6 *N*-acetyl-D-glukosaminové části.

10 **Obr. 5** znázorňuje ověření netoxicity degradačních produktů povrchově upravených vláken pomocí dihydrazidů (ADH –dihydrazid kyseliny adipové, PMADH –dihydrazid kyseliny pimelové a SAD – dihydrazid kyseliny sukcinové), „Enzym 100, 500 a 1000“ označuje blankový roztok bez vlákna při koncentraci enzymu hyaluronidázy v koncentracích 100, 500 a 1000 $\mu\text{g/ml}$.

15 **Obr. 6** tabulka obsahuje informace o rozpustnosti povrchově upravených vláken pomocí dihydrazid adipátu v různých médiích. Rozpustnost (rozbobtnávání vláken) v daném médiu je vyznačena na škále od 0-4, kdy 4 značí zcela rozpuštěné vlákno – ztráta vizuálního kontaktu.

20 **Obr. 7** znázorňuje nekonečné monofilamenty, zakroucenou nit z 5 nekonečných monofilamentů hyaluronanu selektivně oxidovaného na aldehyd v poloze 6 *N*-acetyl-D-glukosaminové části.

Obr. 8 znázorňuje mechanické vlastnosti připravené nitě z 5 nekonečných monofilamentů hyaluronanu selektivně oxidovaného na aldehyd v poloze 6 *N*-acetyl-D-glukosaminové části.

25 **Obr. 9** znázorňuje NMR záznam povrchově zesíťovaného aldehydického hyaluronanu pomocí roztoku dihydrazid adipátu. Materiál po reakci vykazuje sníženou rozpustnost ve vodě.

30 **Obr.10** znázorňuje NMR záznam termicky upravených vláken z hyaluronanu oxidovaného v poloze 6 *N*-acetyl-D-glukosaminové, jejichž termickým namáháním dochází ke konverzi aldehydických skupin za tvorby α,β -nenasyceného aldehydu, vykazující podstatně stabilnější vazbu se sloučenami obsahující amino vazbu.

Obr. 11 znázorňuje zátažnou pleteninu z multifilamentových nití na bázi hyaluronanu selektivně oxidovaného na aldehyd v poloze 6 *N*-acetylglukosaminové části.

Obr. 12 znázorňuje kombinovanou osnovní pleteninu; útek je tvořen multifilamentovou nití na bázi hyaluronanu selektivně oxidovaného na aldehyd v poloze 6 N-acetyl-D-glukosaminové části, osnova PES.

Obr. 13 znázorňuje tubulární zátažnou pleteninu z multifilamentové nitě na bázi hyaluronanu selektivně oxidovaného na aldehyd v poloze 6 N-acetyl-D-glukosaminové části.

Obr. 14 znázorňuje osnovní pleteninu z multifilamentové kompozitní nitě obsahující vlákna na bázi hyaluronanu selektivně oxidovaného na aldehyd v poloze 6 N-acetyl-D-glukosaminové části a vlákna PLLA.

Obr. 15 znázorňuje tkaninu v plátňové vazbě z multifilamentové nitě na bázi hyaluronanu selektivně oxidovaného na aldehyd v poloze 6 N-acetyl-D-glukosaminové části.

Příklady provedení vynálezu

Všechny molekulové hmotnosti (MW) uváděné v této přihlášce vynálezu jsou hmotnostně střední molekulové hmotnosti, není-li uvedeno jinak.

Příklad 1: Příprava monofilamentu do směsi 80% propan-2-ol, 16% kyselina mléčná, 4% voda

2,5 g oxidovaného hyaluronanu v poloze 6 na N-acetyl-D-glukosaminové části o MW 476 kDa bylo rozpuštěno v demineralizované vodě po dobu 16 hodin při laboratorní teplotě tak, že vznikl 5% čirý homogenní viskózní roztok. Rostok byl přenesen do extruzního válce a zbaven bublin.

Extruzní válec s pístem byl vložen do přesného lineárního dávkovače a byla nastavena hodnota extruzní rychlosti 200 $\mu\text{l}/\text{min}$. Rostok byl extrudován přes zvlákňovací monotrysku o výstupním průměru 500 μm do koagulačního roztoku obsahující 16 % kyseliny mléčné, 80 % propan-2-ol a 4 % vody. Vzniklé vlákno bylo kontinuálně navíjeno v čistém izopropanolu po dobu 4 hodin při RT. Zde docházelo k dodatečnému tuhnutí vlákna, které bylo následně sušeno za sníženého tlaku 25 mBar (2,5 kPa) po dobu 8 hodin na 60 °C.

Připravené nekonečné monofilamenty se vyznačovaly trhovou pevností 0,88 N (Obr.1) a trhovou deformací 9,01 % (Obr.2). Jemnost filamentů byla naměřena

6,2 Tex (Obr.3). Vlákno po vložení do vody se zcela rozpustilo (ztráta vizuálního kontaktu) přibližně v čase 40 min.

Příklad 2: Příprava monofilamentu do směsi 80% ethanol, 16% kyselina mléčná, 4% voda

- 5 1,5 g oxidovaného hyaluronanu v poloze 6 na *N*-acetyl-D-glukosaminové části o MW 662 kDa bylo rozpuštěno v demineralizované vodě po dobu 12 hodin při laboratorní teplotě tak, že vznikl 4% čirý homogenní viskózní roztok. Gelový roztok byl centrifugačně zbaven bublin. Extruzní válec s pístem byl vložen do přesného lineárního dávkovače a byla nastavena hodnota extruzní rychlosti 200 μ l/min. Rostok
- 10 byl extrudován přes zvlákňovací monotrysku o výstupním průměru 500 μ m do koagulačního roztoku obsahující 16 % kyseliny mléčné, 80 % denaturovaného ethanolu a 4 % vody. Vzniklé vlákno bylo kontinuálně navíjeno v denaturovaném ethanolu (denaturováno 10% propan-2-olem) po dobu 4 hodin a následně sušeno za sníženého tlaku 25 mBar (2,5 kPa) po dobu 8 hodin na 60 °C.
- 15 Přípravené nekonečné monofilamenty se vyznačovaly trhovou pevností 0,82 N a zvýšenou trhovou deformací 13,75 %. Jemnost filamentů byla naměřena 6,31 Tex. Reziduální obsahy procesních činidel: Kyselina mléčná 0,2 %, ethanol 0,015 %, propan-2-ol 0,08 %. Vlákno po vložení do vody se zcela rozpustilo (ztráta vizuálního kontaktu) v čase 43 min.

20

Příklad 3: Příprava monofilamentu do směsi 60% propan-2-ol, 32% kyselina mléčná, 8% voda

- 0,8 g oxidovaného hyaluronanu v poloze 6 na *N*-acetyl-D-glukosaminové části o MW 631 kDa bylo rozpuštěno v demineralizované vodě po dobu 12 hodin při
- 25 laboratorní teplotě tak, že vznikl 5% čirý homogenní viskózní roztok. Gelový roztok byl centrifugačně zbaven bublin. Extruzní válec s pístem byl vložen do přesného lineárního dávkovače a byla nastavena hodnota extruzní rychlosti 200 μ l/min. Rostok byl extrudován přes zvlákňovací monotrysku o výstupním průměru 500 μ m do koagulačního roztoku obsahující 32% kyseliny mléčné, 60 % propan-2-olu a 8 %
- 30 vody. Vzniklé vlákno bylo kontinuálně navíjeno v propan-2-olu po dobu 4 hodin a následně sušeno za sníženého tlaku 25 mBar (2,5 kPa) po dobu 8 hodin na 60 °C.

Připravené nekonečné monofilamenty se vyznačovaly trhovou pevností 0,79 N a trhovou deformací 10,21 %.

Příklad 4: Viabilitní test vláken bez povrchové úpravy

Připravená vlákna z aldehydického hyaluronanu byla rozpuštěna v kultivačním médiu (Dulbecco's Modified Eagle's Medium s 10% fetal bovine serum, penicilin/streptomycin (100U/ml/100µg/ml), a vzniklé roztoky byly přidány k buňkám 3T3 nasazených v 96-jamkovém panelu o hustotě 3000 b/j. Viabilita byla stanovena MTT testem po 24-72 h. Při tomto testu bylo Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT) rozpuštěno v koncentraci 5 mg/ml v kultivačním médiu a bylo přidáno 20 µl roztoku MTT do jamky. Inkubace byla provedena po dobu 2,5 h. Následně bylo médium odsáto a do jamek bylo napipetováno 220 µl solubilizačního roztoku, který během 30 minutové inkubace rozpustil metabolizovaný formazan. Následně byla změřena absorbance na VERSAmax microplate reader při 570 a 690 nm. Bylo provedeno 5 nezávislých opakování. Na data byl aplikován Studentův – t test pro dva vzorky, $p \leq 0.05$ byla považována za signifikantní.

Ve všech případech bylo prokázáno, že materiál testovaných vláken nesnižuje viabilitu buněk (Obr. 4).

Příklad 5: Povrchová úprava vlákna pomocí dihydrazidu kyseliny adipové, sukcinové a pimelové

30 mg (cca 5 m) vlákna z oxidovaného hyaluronanu bylo vloženo do velké Petriho misky obsahující reakční lázeň tvořenou 70% ethanolem a rozpuštěný dihydrazid kyseliny adipové v koncentraci $5 \cdot 10^{-3} M$. Reakční směs s vlákny byla ponechána po dobu 2 hodin při laboratorní teplotě. Následně byla vlákna vyprána v 80% ethanolu a ponechána sušit při 40 °C po dobu 20 min.

U vláken byl proveden rozpustnostní test v demineralizované vodě, kde vlákno mírně nabobtnalo, dále pak již vykazovalo stabilitu po dobu min. 1 týdne. Test v PBS naopak prokázal nestabilitu vlákna, kdy došlo k jeho totálnímu rozpuštění do 24 hod. Tento fakt naznačuje vytvoření pouze povrchově zesíťované vrstvy, která není dostatečně odolná vůči bobtnacím procesům v jádře vlákna, způsobeným vlivem zvýšené iontové síly roztoku pufru.



Obdobné chování vlákna vykazovala i v případě použití dihydrazidů kyseliny sukcinové a piminelové. Povrchová reakce za vzniku hydrazonových struktur vazeb byla potvrzena pomocí NMR (Obr. 8). Tvorbu zesíťované struktury dále prokázal test nerozpustnosti povrchově upraveného materiálu expozicí do vody.

5 **Příklad 6: Termická úprava vlákna na bázi oxidovaného hyaluronanu v poloze 6 N-acetyl-D-glukosaminové části – eliminace vody – vznik α,β -nenasyceného aldehydu**

0,5 g připravených filamentů o průměru 120 μm bylo v suchém stavu na Petriho misce vloženo do horkovzdušné sušárny, kde byla vlákna exponována po dobu 18 hodin teplotě 80°C. Následně byla vlákna ponechána zchladnout při pokojové teplotě. U vláken byla provedena NMR strukturní analýza, která potvrdila, že vlivem termické expozice došlo k eliminační reakci a vzniku konjugované dvojné vazby mezi skeletárními uhlíky C4 a C5 (viz schéma 1b). Záznam NMR analýzy Obr.10. Vlákno bylo následně modifikováno v roztoku 1,6-diaminohexanu po dobu 8 h. Po vysušení bylo vloženo do demineralizované vody. Oproti neupravované kontrole byla potvrzena zvýšená hydrolytická odolnost po dobu min. 12 h.

Příklad 7: Testování toxicity degradačních produktů

Ke vzorkům zesíťovaných vláken pomocí dihydrazidů kyseliny sukcinové, adipové a piminelové o navážkách vláken, tvořících celkovou koncentraci 20 mg/ml, byl přidán acetátový pufr (500 μl) s obsahem 250 U bovinní testikulární hyaluronidázy. Inkubace při 37 °C probíhala 96 hodin. 500 μl degradačních produktů bylo naředěno do 20 ml kultivačního média (Dulbecco's Modified Eagle's Medium s 10% fetal bovine serum, penicilin/streptomycin (100U/ml/100 μg /ml), následně byla tato směs použita k ovlivnění buněk linie 3T3. Testované koncentrace byly dle koncentrace vláken, z níž byl připravený supernatant, 1000, 500 a 100 μg /ml. Experimentálně bylo prokázáno, že degradační produkty povrchově upravených vláken pomocí dihydrazidů nejsou toxické vůči testovaným buňkám (Obr. 5).

Příklad 8: Tvorba multifilamentové nitě z nekonečných monofilamentů

Na zakrucovací zařízení bylo vloženo 5 monofilamentů z hyaluronanu oxidovaného v poloze 6 N-acetylglukosaminové části o jemnosti 6-7 Tex. Vlákna byla před zakroucením vlhkostně klimatizována na přibližně 60 % v exsikátoru nad nasyceným



vodným roztokem NaBr. Zvýšením vlhkosti vláken došlo k jejich zvýšené flexibilitě, a tedy odolnosti vůči přetrhu v průběhu zakrucování. Parametry zakrucování byly nastaveny (rychlost dodávky 4 m/min, rychlost vřetene 1400 m/min, hmotnost běžce 60 mg). Vlákná byla zakrucena do formy zakrucené niti o průměru 350 μm . U niti
5 byly změřeny její mechanické vlastnosti. (Obr.8).

Příklad 9: Tvorba směsné multifilamentové nitě z filamentů na bázi oxidovaného hyaluronanu (67%) a filamentů z PLLA (33%).

Na zakrucovací zařízení byly vloženy 2 monofilamenty z hyaluronanu oxidovaného v poloze 6 N-acetylglukosaminové části o jemnosti 8 tex a 1 filament z PLLA o
10 jemnosti 6,5 tex. Vlákná byla před zakrucením 24 hod klimatizována při vlhkosti 45-50%. Při této vlhkosti vlákná získávají vyšší flexibilitu, a tedy i odolnost vůči přetrhu v průběhu zakrucování. Parametry zakrucování byly nastaveny následovně: rychlost podávání 5 m/min, otáčky vřetene 1500 ot/min, hmotnost běžce 50 mg. Vlákná byla
zakrucena do formy nitě o průměru 130-170 μm . Nit vykazovala tyto mechanické
15 charakteristiky: pevnost $2,3 \pm 0,2$ N, tažnost $16,5 \pm 1,7\%$ a pevnost v uzlu $1,2 \pm 0,3$ N.

Příklad 10: Zátěžná pletenina z vláken na bázi oxidovaného hyaluronanu v poloze 6 N- acetyl-D- glukosaminové části

Nitě připravené obdobným způsobem jako v příkladu 8 byly na prstencovém stroji zakruceny do podoby trojmo skané nitě. Nit byla potom zpracována na okrouhlém
20 pletacím stroji Harry Lucas o průměru $1 \frac{1}{2}$ a dělení jehel 5G do podoby tubulární pleteniny (obrázek 13). Výsledná jedolící zátěžná pletenina vykazovala plošnou hmotnost 110 g/m^2 , hustotu řádků 5 oček/cm a hustotu sloupků 3,5 očka/cm. (Obr. 10).

Příklad 11: Osnovní pletenina ze směsových nití z filamentů na bázi z oxidovaného hyaluronanu a monofilů z PLA.

Nitě připravené obdobným způsobem jako v příkladu 9 byly na prstencovém stroji zakruceny do podoby dvojmo skané nitě. Na bubnovém snovadle pak byla
připravena osnova, která pak byla převinuta na osnovní vál. Osnovní vál byl umístěn na osnovní pletací stroj (galonový stávek) značky Rius s karabinovými jehlami
30 s dělením 11G. Osnovní nitě byly navedeny do kladecích a pletacích jehel a



zapleteny do řetízku. Byla vyrobena pletenina tvořená řetízky, příčně provázanými frontálním útkem (obrázek 11).

Příklad 12: Tkanina z vláken z oxidovaného hyaluronanu v poloze 6 N-acetyl- D-glukosaminové části

5 Z nití vyrobených obdobným způsobem jako v příkladu 8 byla na bubnovém snovadle připravena osnova, která pak byla převinuta na osnovní vál. Osnovní vál byl uchycen na stuhařský člunkový tkalcovský stav, osnovní nitě byly navedeny do nitěnek a do paprsku. Útková nit stejného složení byla přesoukána na kanetu a vložena do člunku. Byly nastaveny potřebné parametry prošlupního a prohozního mechanismu pro
10 tvorbu plátnové vazby v požadované dostavě nití. Byla vyrobena tkanina v plátnové vazbě o plošné hmotnosti 75 g/m², dostavě osnovy 10 nití/cm a dostavě útku 20 nití/cm (obrázek 15).

Seznam literatury

1. Hladík, V., Textilní vlákna, SNTL 1970, ISBN 04-834-70
- 15 2. **WO2009/050389** - FILAMENT CONTAINING HYALURONIC ACID IN FREE ACIDIC FORM AND METHOD FOR MAKING SAME
3. **PV2010-1001** - Hyaluronová vlákna, způsob jejich přípravy a použití
4. **US2006/0281912 A1** - Hyaluronan (ha) esterification via acylation technique for moldable devices
- 20 5. **WO2010095049 A1** - CROSSLINKED FIBERS AND METHOD OF MAKING SAME BY EXTRUSION
6. **WO2010095056 A2** - MEDICAL DEVICES WITH AN ACTIVATED COATING
7. **WO2010061005** - METHOD TO PRODUCE HYALURONIC ACID FUNCTIONALIZED DERIVATIVES AND FORMATION OF HYDROGELS THEREOF
- 25 8. **WO1993/011803 A1** - NON-WOVEN FABRIC MATERIAL COMPRISING HYALURONIC ACID DERIVATIVES
9. **WO1998008876 A1** - HYALURONIC ACID ESTERS, THREADS AND BIOMATERIALS CONTAINING THEM, AND THEIR USE IN SURGERY
10. **US5658582** - Multilayer nonwoven tissue containing a surface layer comprising at
30 least one hyaluronic acid ester
11. **US2004/0192643 A1** - Biomaterials for preventing post-surgical adhesions comprised of hyaluronic acid derivatives



12. **WO2011069475** - A METHOD OF PREPARATION OF AN OXIDIZED DERIVATIVE OF HYALURONIC ACID AND A METHOD OF MODIFICATION THEREOF

5 13. **WO2011/069474** - OXIDIZED DERIVATIVE OF HYALURONIC ACID, A METHOD OF PREPARATION THEREOF AND A METHOD OF MODIFICATION THEREOF

14. **US2004/0101546 A1** - Hemostatic wound dressing containing aldehyde-modified polysaccharide and hemostatic agents

10 15. **EP1115433 B1** - FUNCTIONALIZED DERIVATIVES OF HYALURONIC ACID, FORMATION OF HYDROGELS AND IN SITU USING SAME

16. **WO2010138074 A1** - HYALURONIC ACID BASED DELIVERY SYSTEMS

17. **WO2009108100 A1** - COMPOSITION FOR THE FORMATION OF GELS

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Příprava vláken na bázi selektivně oxidovaného hyaluronanu, **vyznačující se tím, že** se nejprve připraví 4-6 %hmotn. vodný roztok hyaluronanu selektivně oxidovaného na aldehyd v poloze 6 N-acetyl-D-glukosaminové části, který se extruduje do koagulační lázně obsahující 5 až 45 %hmotn. kyseliny mléčné, min. 50%hmotn. nižšího alkoholu a 4-10%hmotn. vody za vzniku vlákna, které se následně promyje nižším alkoholem a suší.
5
2. Příprava podle nároku 1, **vyznačující se tím, že** nižší alkohol pro promytí vlákn je vybrán ze skupiny zahrnující ethanol, 1-propanol a izopropanol.
10
3. Příprava podle nároku 1 nebo 2, **vyznačující se tím, že** nižší alkohol v koagulační lázni je vybrán ze skupiny zahrnující ethanol, 1-propanol a izopropanol.
15
4. Příprava podle kteréhokoli z předchozích nároků, **vyznačující se tím, že** koncentrace kyseliny mléčné v koagulační lázni je v rozmezí 10 až 20 %hmotn.
5. Příprava podle kteréhokoli z předchozích nároků, **vyznačující se tím, že** se vlákna po usušení povrchově upraví vložením do stabilizační lázně obsahující 70 – 80% vodný roztok nižšího alkoholu, ve kterém je rozpuštěn nízkomolekulární dihydrazid organické kyseliny v koncentraci od $5 \times 10^{-6} \text{M}$ do 0,01M, na dobu od 10 minut do 24 hodin při teplotě 20 až 50 °C, následně se vlákna promyjí alkoholem a usuší.
20
25
6. Příprava podle nároku 5, **vyznačující se tím, že** nižší alkohol ve stabilizační lázni je vybrán ze skupiny zahrnující methanol, ethanol, propan-1-ol a propan-2-ol.
7. Příprava podle nároku 5 nebo 6, **vyznačující se tím, že** nízkomolekulární dihydrazid organické kyseliny je vybrán ze skupiny zahrnující dihydrazid kyseliny sukcinové, dihydrazid kyseliny adipové nebo dihydrazid kyseliny pimmelové.
30



8. Příprava podle kteréhokoli z nároků 5 až 7, **vyznačující se tím, že** nízkomolekulární dihydrazid organické kyseliny je ve stabilizační lázni přítomen v koncentraci 5×10^{-3} M.
- 5 9. Příprava podle kteréhokoli z nároků 1 až 4, **vyznačující se tím, že** vlákna jsou podrobena termickému zatěžování v teplotním rozsahu 75 až 85 °C po dobu alespoň 12 hodin, následně se vlákno nechá vychladnout při laboratorní teplotě, a poté se podrobí působení alkoholickému roztoku organických diamino sloučenin pro stabilizaci vlákna vůči hydrolyze.
- 10 10. Vlákna na bázi selektivně oxidovaného hyaluronanu připravená podle nároku 1 až 9, **vyznačující se tím, že** je hyaluronan selektivně oxidovaný na aldehyd v poloze 6 *N*-acetyl-D-glukosaminové části.
11. Vlákna podle nároku 10, **vyznačující se tím, že** jsou povrchově zesíťovaná.
- 15 12. Použití vláken definovaných v kterémkoli z nároků 10 až 11 pro výrobu kabílků, nití, přízí, vlákenné stříže, tkaných, pletených nebo netkaných textilií.
13. Nit tvořená alespoň dvěma vlákny definovanými v kterémkoli z nároků 10 nebo 11.
- 20 14. Nit tvořená alespoň dvěma vlákny, **vyznačující se tím, že** alespoň jedno vlákno je vlákno definované v kterémkoli z nároků 10 nebo 11, a alespoň jedno vlákno je vlákno vybrané ze skupiny vláken jiných biodegradabilních materiálů.
- 25 15. Vlákenná stříž vyrobená z vláken definovaných v kterémkoli z nároků 10 nebo 11.
16. Příze vyrobená z vlákenné stříže definované v nároku 15.
- 30 17. Tkané, pletené a netkané textilie vyrobené z vláken, kabílků, nití, přízí nebo vlákenné stříže definovaných v kterémkoli z nároků 10 až 16.



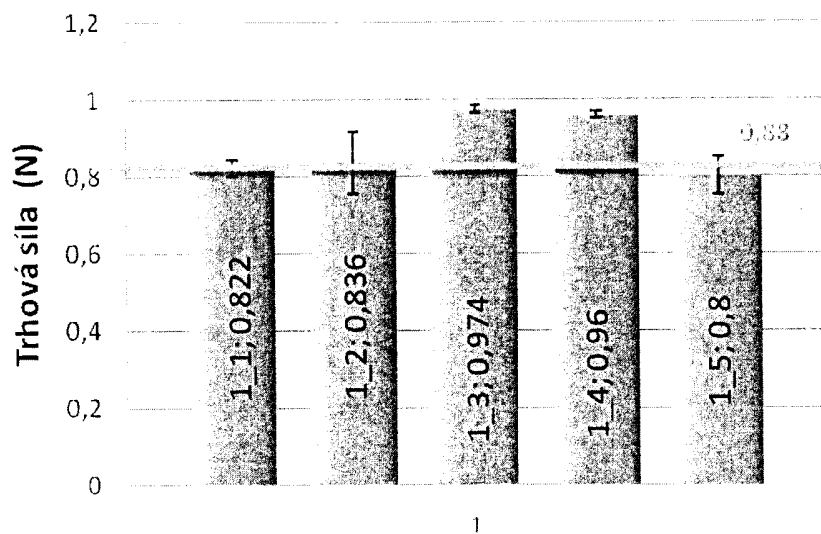
18. Tkané, pletené a netkané textilie tvořené vlákny, kábilky, nitmi, přízemi nebo vláknými střížemi definovanými v kterémkoli z nároků 10 až 16 a jinými vláknými biodegradabilními materiály.

5 19. Tkané, pletené a netkané textilie podle kteréhokoli z nároků 17 nebo 18, **vyznačující se tím, že** jsou ve formě plošné nebo tubulární textilie nebo 3D scaffoldu.

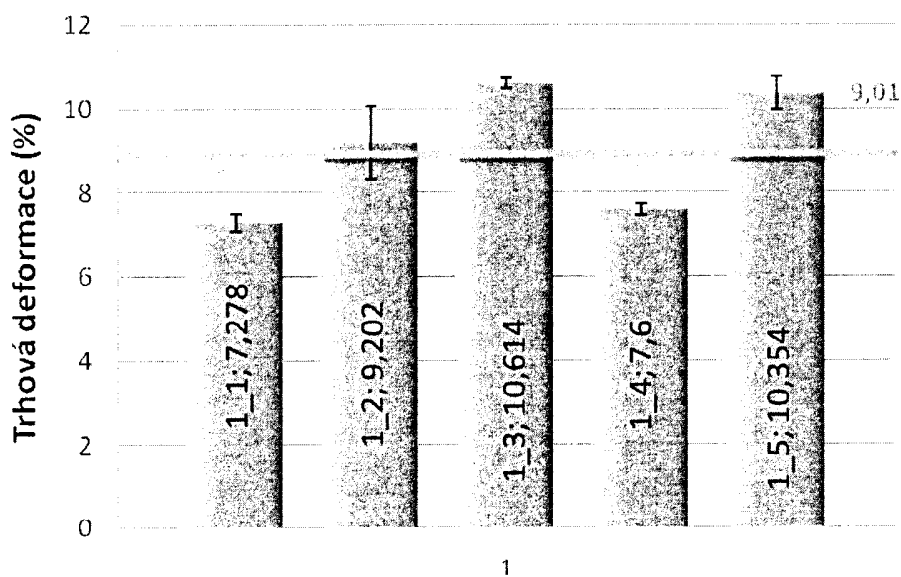
10 20. Způsob úpravy vláken, nití, vlákných stříží, přízí a tkaných, pletených a netkaných textilií, definovaných v kterémkoli z nároků 10 až 19, **vyznačující se tím, že** se na ně působí vodným roztokem 70 až 80% alkoholu obsahujícím nízkomolekulární hydrazid organické kyseliny, který je v roztoku přítomen v koncentraci $5 \times 10^{-6} \text{M}$ do 0,01M, po dobu od 10 minut do 24 hodin při teplotě 20 až 50 °C.

15 21. Způsob úpravy podle nároku 20, **vyznačující se tím, že** nízkomolekulární dihydrazid organické kyseliny je vybrán ze skupiny zahrnující dihydrazid kyseliny sukcinové, dihydrazid kyseliny adipové nebo dihydrazid kyseliny pimelové.

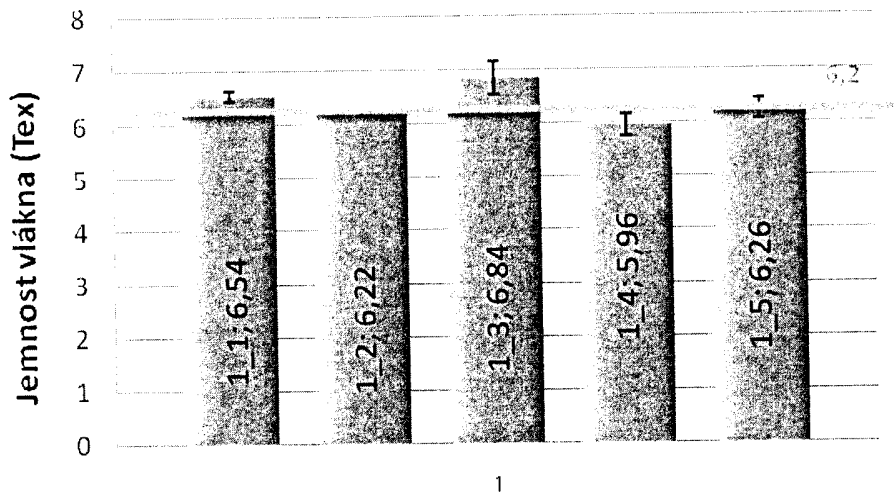
20



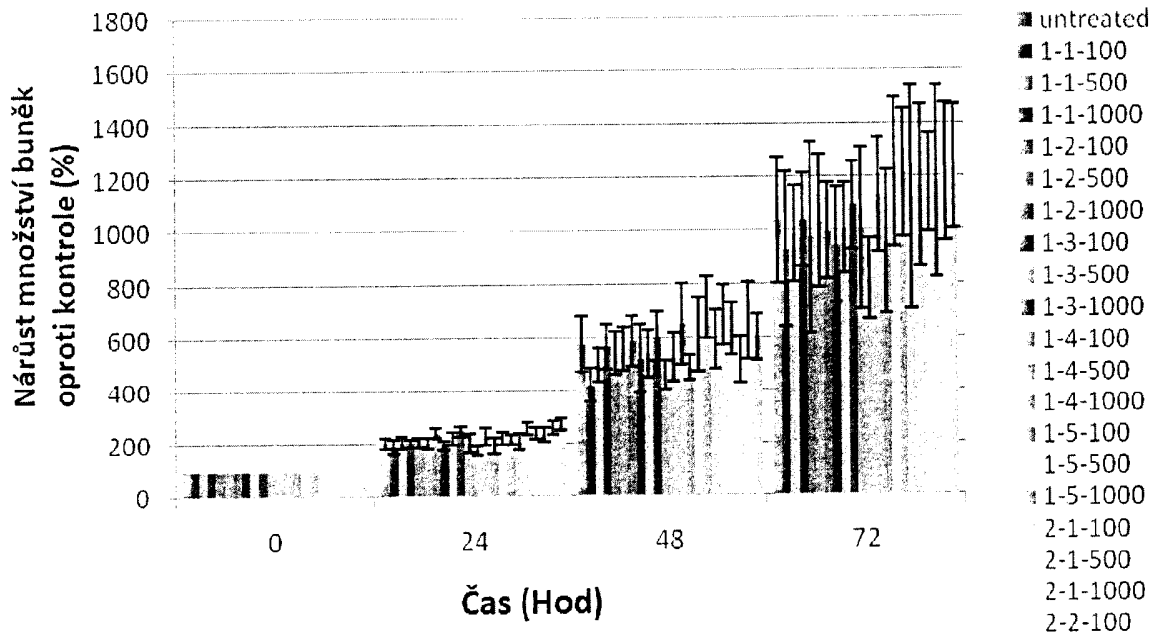
Obr. 1



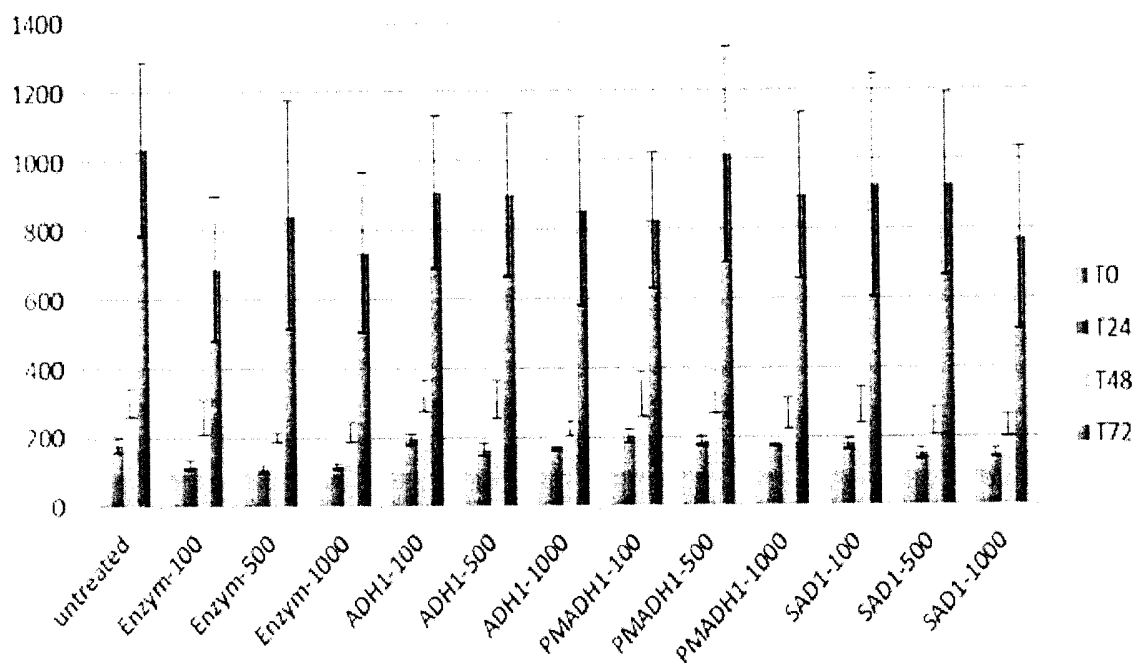
Obr. 2



Obr. 3



Obr. 4

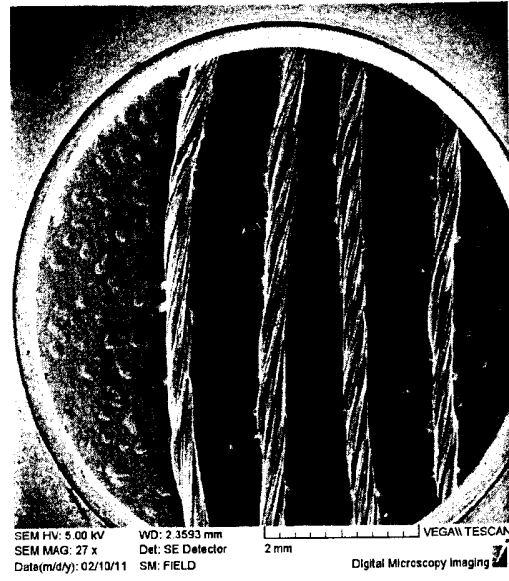
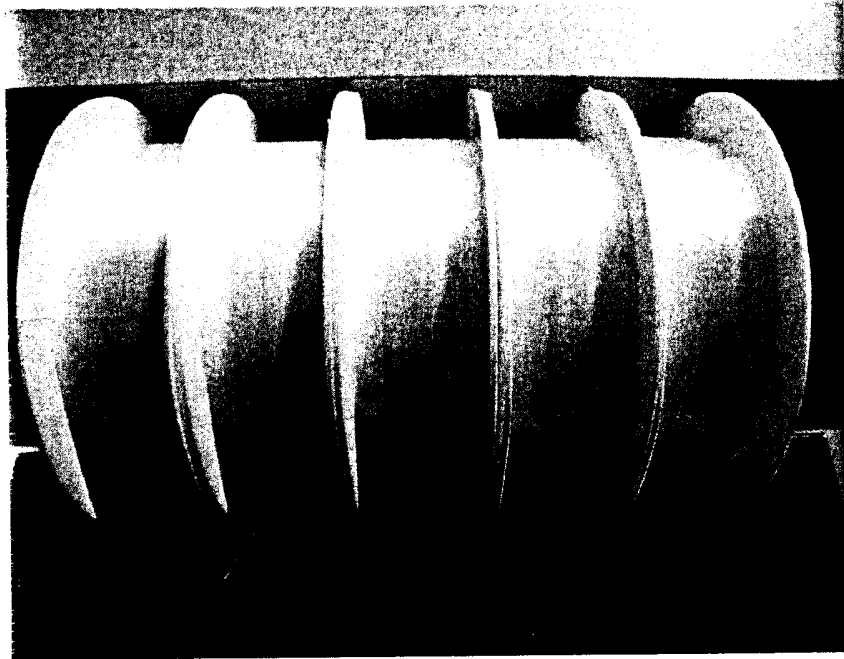


Obr. 5

Čas (hod)	Voda	PLASMA	100% FBS	PLNÉ NHDF/3T3 MÉDIUM	0% NHDF/3T3 MÉDIUM	PBS
0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0
24	0	0	0	0	0	3-4
48	0	0-1	3-4	0-1	3	3-4
72	0	0-1	3-4	3-4	4	3-4

Obr. 6

TV 012 070
.....
.....
.....
.....

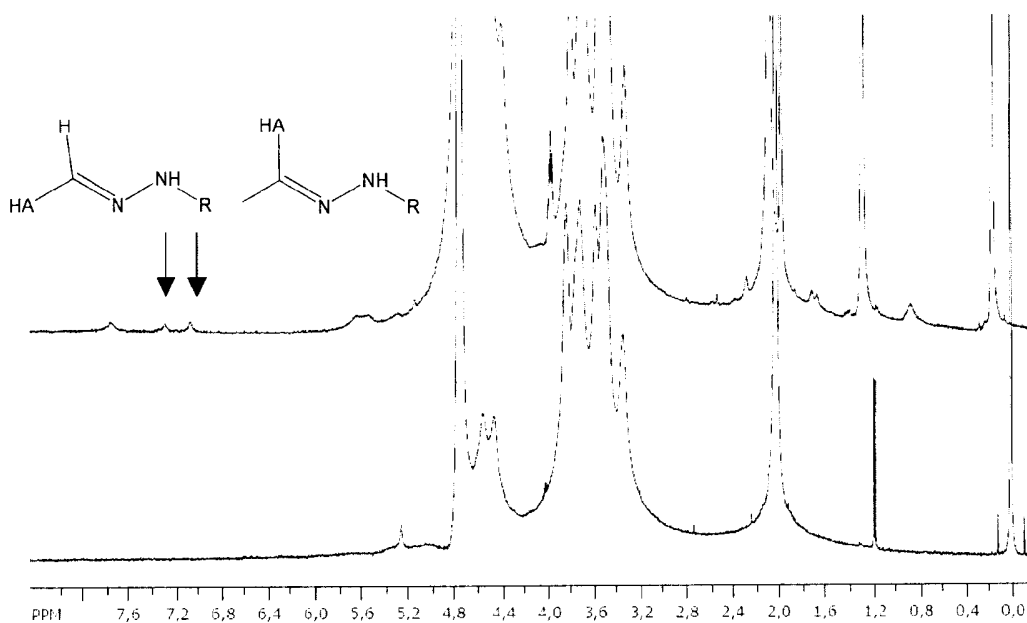


Obr. 7

Vzorek	A	B
A	3,48	3,25
B	3,29	4,53
C	3,48	4,2
D	3,65	4,35
E	3,63	4,6
F	3,38	4,36
Průměr	3,51	4,19
Smodch	0,13	0,45

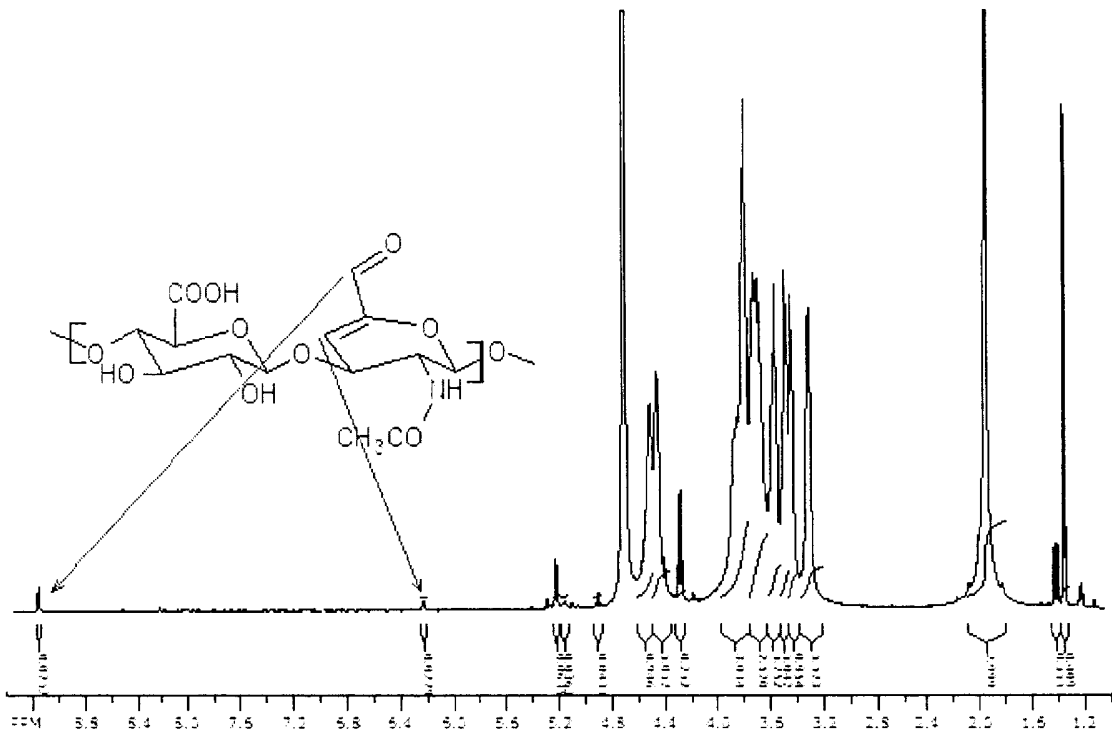
Vzorek	A	B
A	9,22	4,84
B	8,1	10,7
C	8,78	9,6
D	9,77	10,08
E	9,34	11,22
F	8,97	10,17
Průměr	9,04	9,29
Smodch	0,52	2,12

Obr. 8

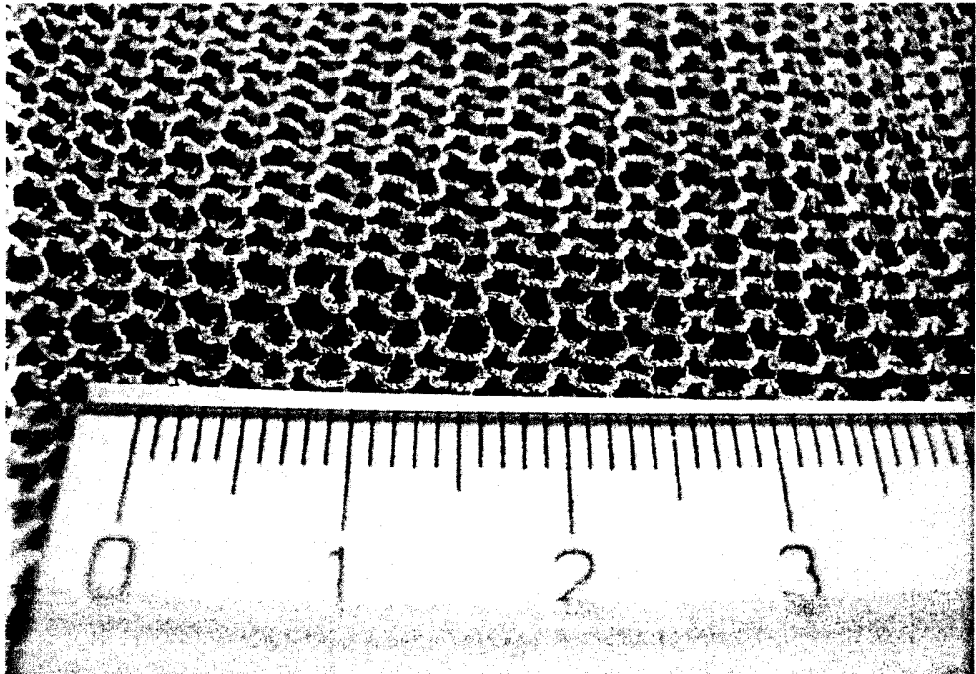


Obr. 9

FV W12 075
.....
.....
.....



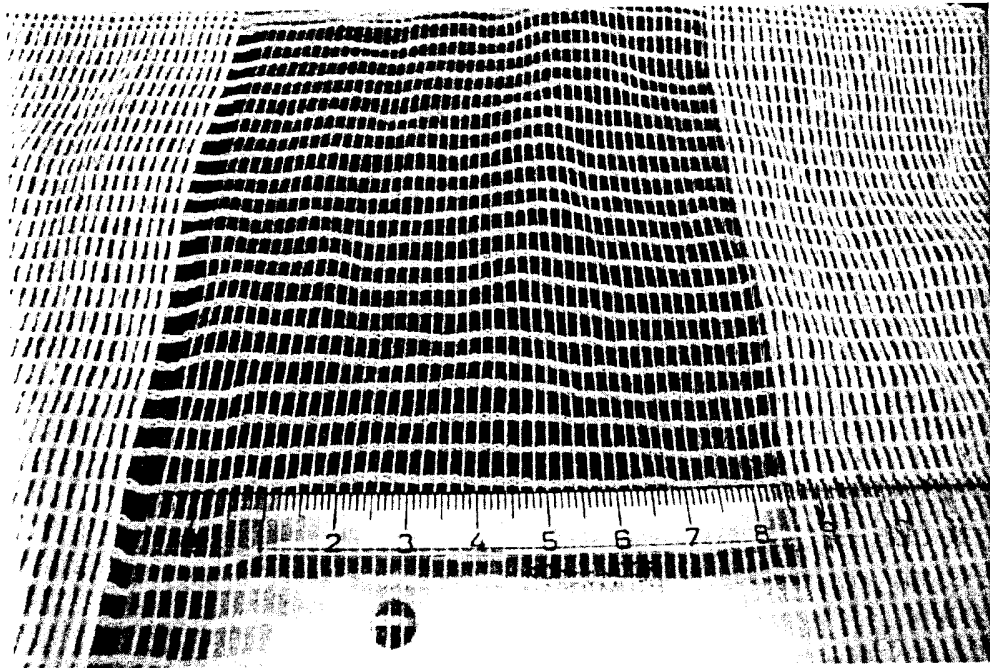
Obr. 10



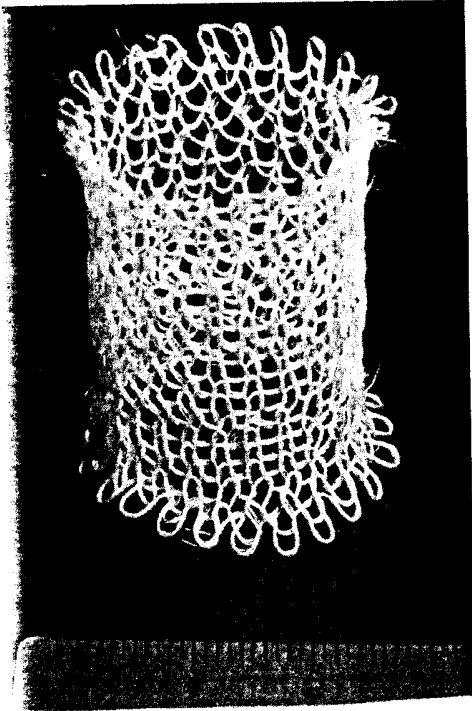
Obr.11

PV W/2-090

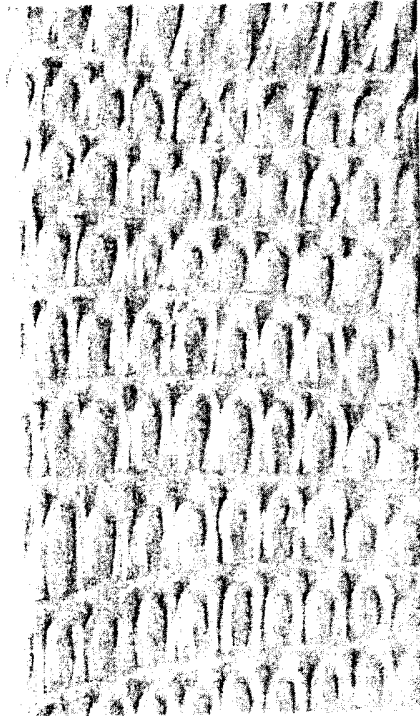
7/8



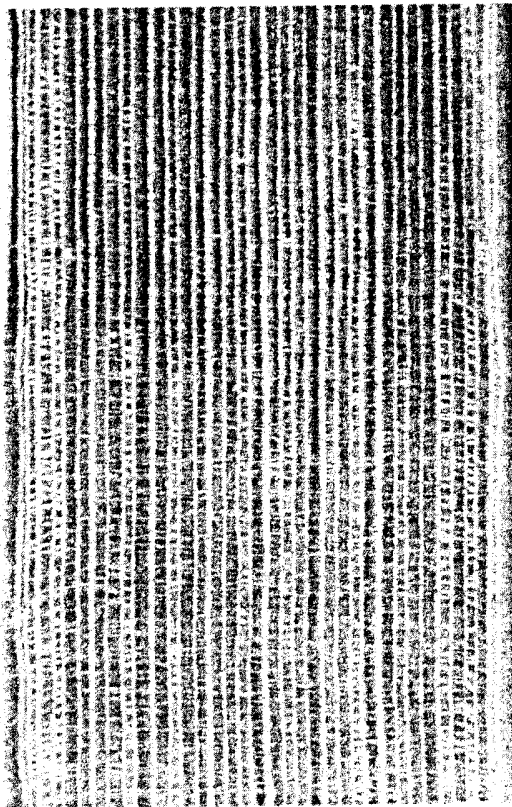
Obr. 12



Obr. 13



Obr. 14



Obr. 15