



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVEDČENIU

267 079

(11)

(13) B1

(51) Int. Cl.⁴
C 08 B 37/08

(21) PV 1507-87.W
(22) Prihlášené 06 03 87

(40) Zverejnené 12 05 89
(45) Vydané 14 12 90

(75)

Autor vynálezu

GALATÍK ANTONÍN ing. CSc., OTROKOVICE,
KUBĚNA KAREL doc. MUDr. CSc., GOTTWALDOV,
BLAŽEJ ANTON akademik, BRATISLAVA

(54)

Spôsob prípravy apyrogenného derivátu kyseliny hyaluronovej

(57) Riešenie sa týka prípravy ultračistého vysokomolekulárneho derivátu kyseliny hyaluronovej. Podstata spôsobu jej prípravy spočíva v tom, že na vodnú fázu po extrakcii biologických materiálov sa pôsobí alkylačnými činidlami obecného vzorca $X/n/-R$ alebo $X/n/-R-P/m/$, kde X je chlór, bróm alebo jód, R je organická skupina s počtom uhlíkov 1 až 14, n je celé číslo z intervalu 1 až 5, P je polárna skupina anionického typu ako $-COOH$, $-OH$, $-COONa$, $-COOK$, $-COONH_2$, $-SO_3H$ a m je celé číslo z intervalu 1 až 5, v množstve 0,1 až 15 % hmot. na hmotnosť sušiny extraktu po dobu 1 až 24 hodín a/alebo látkami polárneho charakteru, ktoré sú rozpustné vo vode a majú hydrotropnú schopnosť ako je močovina, guanidín, alebo jodid draselný v množstve 0,1 až 10 % hmot. na hmotnosť sušiny extraktu, vzniknutý roztok sa prefiltruje cez filtračnú membránu s veľkosťou pórov 0,15 až 0,50 μm , z filtrátu sa produkt vyzráža prídavkom 300 % obj. etanolu, po oddelení sa rozpustí vo vode a sterilizuje cetylpyridinium chloridom alebo bromidom, opätovne vyzráža etanolom a nakoniec premyje acetonom, vysuší a sterilizuje zahrievaním na 105 až 150 °C po dobu 10 až 25 minút.

CS 267079 B1

Vynález sa týka spôsobu prípravy apyrogenného derivátu kyseliny hyaluronovej extrakciou biologických materiálov.

Hyaluronová kyselina patrí do skupiny prirodzene sa vyskytujúcich silne polárnych kyslých polysacharidov, označovaných ako glykosaminoglykány alebo mukopolysacharidy a vyskytuje sa vo všetkých väzivových tkanivách, v koži, šlachách, chrupavkách, v sklovci oka, v synoviálnej kvapaline klbových puzdier a pod. Z hľadiska chemickej štruktúry sa vyznačuje pravidelne sa opakujúcimi sacharidickými jednotkami dvoch druhov, 1-3 glukoronovou kyselinou a 1-4 N-acetylglukosamínom, spojenými glykosidickými väzbami na polymernú makromolekulu o veľkosti 10^6 i viac.

Už dlhšiu dobu bolo predmetom záujmu farmakologických pracovníkov získanie veľmi čistých derivátov kyseliny hyaluronovej (HYA), ktoré by boli použiteľné ako náhrada alebo čiastočná náhrada HYA prirodzene sa vyskytujúcej v sklovej alebo v synoviálnej kvapaline. Hľadal sa preparát HYA vhodný pre aplikácie aj v iných oblastiach medicíny, kde je porucha u prirodzene sa vyskytujúcich kvapalín vyznačujúcich sa obsahom tejto kyseliny. Preto je v literatúre veľké množstvo prác popisujúcich tzv. čistenie HYA a rôzne spôsoby pre čistenie prirodzene sa vyskytujúcej hyaluronovej kyseliny, prípadne jej derivátov. Existuje mnoho preparátov tejto kyseliny čiastočne vyčistenej, avšak žiadny z týchto preparátov nie je vhodný pre aplikácie v medicíne, lebo obsahuje množstvo sprevádzajúcich bielkovín, ktoré spôsobujú rôzne zápaly, keď je preparát injekčne zavedený do tela cicavcov, obzvlášť do oka pri náhradách sklovca. Ako ukázal E. A. Balasz v patente USA číslo 4 141 973 z roku 1979, spoločným problémom preparátov je ich nedostatočná apyrogennosť. Preto tieto preparáty bolo doteraz treba aplikovať spoločne s protizápalovými liečivami a s antibiotikami.

Prvý známy a doteraz jediný spôsob izolácie a čistenia HYA, ktorý poskytuje materiál s dostatočnou apyrogennosťou, popísal Balasz v horeuvedenom patentnom spise. Tento postup sa nelíši od doteraz známych postupov, ale je doplnený navyše novým krokom, dlhodobým (5 dní nepretržite trvajúcim) miešaním vodných extraktov HYA s rovnakým dielom chloroformu, za podmienok zaisťujúcich dobrý kontakt oboch fáz. Pretože chloroform je kvapalina nemiešateľná s vodou a líši sa od vodných roztokov pomerne veľkou špecifickou hmotnosťou, je pre zaistenie homogenity nutné relatívne intenzívne miešanie. Za týchto podmienok nastáva čiastočná dopolymerizácia maktomolekúl HYA, o ktorej je známe, že je podporovaná mechanickým stieraním a vzdušným kyslíkom, hlavne za katalýzy kovovými iónami.

Spôsob izolácie a čistenia HYA podľa uvedeného US patentu nielen že je časovo náročný, ale niekoľkodenné miešanie s chloroformom môže podporovať degradáciu produktu na menšiu molekulovú hmotnosť. Obsah sprevádzajúcich bielkovín je tiež pomerne vysoký, asi 0,5 % hmot. a výťažnosť produktu pomerne nízka - 0,9 g/kg východzej suroviny.

Uvedené nevýhody v podstatnej miere odstraňuje spôsob prípravy apyrogenného derivátu kyseliny hyaluronovej extrakciou biologických materiálov s využitím čiastočnej deproteinizácie extraktu etanolom a chlôrovanými uhľovodíkmi podľa vynálezu, ktorého podstata spočíva v tom, že na vodnú fázu po extrakcii upravenú na hodnotu pH 5,5 až 8,5 sa pôsobí alkylačnými činidlami obecného vzorca $X/n/R$ alebo $Xh/-R-P/m/$, kde X je chlór, bróm alebo jód, R je organická skupina s počtom uhlíkov 1 až 14, n je celé číslo z intervalu 1 až 5, P je polárna skupina anionického typu ako $-COOH$, $-OH$, $-COONa$, $-COOK$, $-COONH_2$, $-SO_3H$ a m je celé číslo z intervalu 1 až 5 v množstve 0,1 až 15 % hmot. na hmotnosť sušiny extraktu počas 1 až 24 hodín a/alebo látkami polárneho charakteru, ktoré sú rozpustné vo vode a majú hydrotropnú schopnosť ako je močovina, guanidín alebo jodid draselný v množstve 0,1 až 10 % hmot. na hmotnosť sušiny extraktu, vzniknutý roztok sa prefiltruje cez filtračnú membránu o veľkosti pórov 0,15 až 0,50 μm , z filtrátu sa produkt vyzráža prídavkom 300 % obj. etanolu po oddelení sa rozpustí vo vode a sterilizuje cetylpyridínium chloridom alebo bromidom, opätovne vyzráža etanolom a nakoniec premyje acetónom, vysuší a sterilizuje zahrievaním na 105 až 150 °C po dobu 10 až 25 minút. Na roztok kyseliny hyaluronovej po odfiltrovaní cez filtračnú membránu sa môže pôsobiť zlúčeninami kovov vybratých zo skupiny Mg^{2+} , Ca^{2+} ,

Zn^{2+} , Ba^{2+} , Al^{3+} , Cu^{2+} , Cr^{3+} jednotlivito alebo v zmesi v množstvách 0,5 až 10 mólov na mól hyaluronátu.

Po pridaní alkylačného činidla sa okrem cetylpyridínium halogenidu môže pridať formaldehyd v množstve 0,1 až 10 g na 10 l roztoku hyaluronátu.

Spôsobom podľa vynálezu sa dosiahne dekontaminácia HYA od bielkovinových zložiek a tým zabezpečenie apyrogennosti produktu. Podstatným znakom tohto spôsobu je modifikácia niektorých polárnych a tiolových skupín v molekule kontaminujúcich bielkovín pomocou alkylačných činidiel, ľahko oddeliteľných od HYA na základe rozdielnej rozpustnosti v etanole. Modifikujúca alkylácia spôsobí rozrušenie nekovalentne viazaných komplexov medzi HYA a väzivovými bielkovinami, ktorých vznik podmieňuje polárne a tiolové skupiny niektorých aminokyselín bielkoviny.

Vhodnými alkylačnými činidlami sú látky, poskytujúce modifikovanej bielkovine nové polárne substituenty anionickej povahy, pretože záporne sa nabíjajúca skupina poskytne bielkovine taký istý charakter, aký má kyslý polysacharid HYA a vedie k zníženiu vzájomnej polárnej interakcie. Takým alkylačným činidlom je napríklad halogenderivát kyseliny octovej, ktorý vyvoláva karboxymethyláciu tiolových a hydroxylových skupín u cysteínu, glutathionu, threonínu, serínu a ďalších skupín, napríklad kvanidinových a aminových skupín u bazických aminokyselín. Okrem tejto skupiny alkylačných činidiel však možno použiť mnoho ďalších halogenderivátov, a to i také, ktoré nemožno aplikovať vo vodných roztokoch, napríklad methylchlorid, dichlórethan a ďalšie homologické uhľovodíky alifatickej i aromatickej povahy, obsahujúci vo svojej molekule jednu alebo viac molekúl chlóru, brómu alebo jódu. V takých prípadoch metylácia alebo iná alkylácia nastáva v heterogennom systéme na fázovom rozhraní a nadbytočné alkylačné činidlo je možno oddeliť po rozdelení fáz jednoduchým spôsobom.

Výhody spôsobu podľa vynálezu spočívajú v skrátení deproteinizačného cyklu a tým zabránení poklesu molekulárnej hmotnosti získaných produktov a v dokonalejšom odstránení sprievodných bielkovín, obsah bielkovín pod 0,1 % hmot. a výťažnosť hyaluronátu 1,6 g/kg suroviny.

Pri extrakcii a čistiacich operáciach sa prípadne môže použiť inertná atmosféra.

P r í k l a d 1

Surovina použitá na izoláciu HYA, ako je očistená pupočná šnúra, hrebene kohútov alebo iné väzivo, alebo materiál obsahujúci HYA sa najprv zmrazí na -20 až -40 °C, čím sa rozrušia steny buniek.

1 kg zmrazeného tkaniva sa rozreže na malé kúsky a 3-krát extrahuje 90 % etanolom. Pri každej extrakcii sa použije 5 l etanolu (90 % obj.) a zmes sa mieša počas 24 hodín pri teplote 18 °C. Etanolvý roztok obsahuje vždy prídavok 5 % obj. chloroformu.

Potom sa prídavkom 2 l redistilovanej vody s prídavkom bakteriostatickej látky cetylpyridínium bromidu v množstve 0,01 % hmot. vyvolá rehydratácia väziva a v troch samostatných extrakčných krokoch sa vyluhuje HYA pomocou 4 l redistilovanej vody s prídavkom 200 ml chloroformu. Každý extrakčný krok sa vykonáva za pomalého miešania pri teplote 10 °C. Pred treťou extrakciou sa väzivo rozreže na jemnú drť. Extrakty sa spoja a použijú pre ďalšie čistenie.

Vodný spojený extrakt sa upraví prídavkom 1,1 kg chloridu sodného a po jeho úplnom rozpustení sa mieša 4 hodiny pri 20 °C s chloroformom v objemovom pomere 1:1. Potom sa nechajú obe fázy separovať a vodná vrstva sa oddelí. Prídavkom zriedenej kyseliny chlorovodíkovej sa upraví pH vodnej fázy na hodnotu 4,0 a znovu sa mieša, teraz v dusíkovej atmosfére, s chlo-

roformom v objemovom pomere 1:1. Po oddelení fáz sa miešanie s chloroformom opakuje, až je chloroformová fáza číra. Potom sa pH oddelenej vodnej vrstvy upraví zriedeným roztokom hydroxidu sodného na hodnoru pH 6,5 až 7,0 a pridá sa 10 % hmot. roztok sodnej soli kyseliny monochlóroctovej v množstve 0,1 % objem. roztoku na objem extraktu. Po zmiešaní sa extrakt ponechá 24 hodín v kľude, na tmavom mieste, potom sa filtruje cez sklenený fritový filter a pomocnou vrstvou kremeliny a nakoniec cez membránový filter veľkosti pórov 0,25 μm .

Z filtrátu sa vyzráža hyaluronová kyselina prídavkom etanolu v množstve 1,5 objemu etanolu na 1 objem extraktu. Oddelená HYA sa rozpustí v 2 l redestilovanej vody obsahujúcej 7,8 g chloridu sodného a 5 g cetylpyrinium chloridu. Po rozpustení sa vyzráža opäť HYA tromi objemami etanolu a po oddelení sa zrazenina rozpustí v 2 l 0,0 M chloridu sodného. K roztoku sa pridá 1 ml čerstvo vyzrážaného hydroxidu hlinitého o obsahu 10 % hmot. $\text{Al}(\text{OH})_3$, suspenzia sa premieša a ponechá 24 hodín v kľude s občasým premiešaním. Po oddelení zrazeniny sa roztok opäť vyzráža 3 objemami etanolu. Rozpustenie a vyzrážanie etanolom sa opakuje ešte trikrát a nakoniec sa zrazenina premyje acetónom a usuší za zníženého tlaku. Suchý produkt sa sterilizuje ohrievaním na 145 $^{\circ}\text{C}$ po dobu 15 minút.

Získalo sa 1,12 g produktu o molekulárnej hmotnosti 2,84 miliónu a obsahu bielkovín 0,013 % hmot. (vyjadrené ako albumín).

P r í k l a d 2

Hrebene kohútov získané ihneď po porážke, odkrvené a povrchovo očistené sa orežú tak, že sa oddeľujú okraje a špičky a zmrazia sa na -20 až -40 $^{\circ}\text{C}$.

1 kg zmrazeného materiálu sa rozdrví a čistí opakovanou extrakciou etanolom v množstve 3 l etanolu na 1 kg drte za pohybu počas 12 hodín. Extrakcia sa opakuje štyrikrát. Potom sa odvodnené tkanivo extrahuje tromi objemami redestilovanej vody za mierneho miešania v dusíkovej atmosfére, vždy po dobu 24 hodín. V prvej a druhej extrakcii sa do vodnej fáze pridá 0,1 g chelatónu 3. V druhej a tretej extrakcii sa použije prídavok 100 ml chloroformu. Vodné extrakty sa spoja a v nich sa rozpustí 1,3 kg chloridu sodného. Vzniknutý roztok sa zmieša s trichlóretylénom v objemovom pomere 1:1 a mieša sa 4 hodiny za obvyčajnej teploty. Po oddelení fáz sa miešanie opakuje ešte trikrát. Potom sa vodná fáza upraví na hodnotu pH 6 až 7,5 pomocou zriedeného roztoku hydroxidu sodného a pridá sa 2 g ethylbromidu a 2,5 g sodnej soli 1-bróm-2-sulfoetylénu a 0,5 g formaldehydu a 0,5 g cetylpyridinium bromidu. Po rozpustení sa roztok ponechá v kľude 24 hodín na tmavom mieste. Po alkylácii sa upraví pH na hodnotu 3,5 až 4,0 a roztok sa premyje cez stípec kyslého iontomeniča v H cykle. Kolóna sa premyje 5-timi objemami vody a pH eluátu sa upraví pomocou 0,1 M hydroxidu sodného na neutrálnu hodnotu. Potom sa pridá trypsín v množstve 0,001 g na 10 l roztoku a voľne sa mieša 5 hodín. K roztoku sa pridá 100 g/10 l močoviny a v miešaní sa pokračuje ďalšie dve hodiny za obvyčajnej teploty. Zmes sa nechá cez noc v kľude. Na druhý deň sa oddelí HYA vyzrážaním tromi objemami etanolu a oddelením. Zrazenina sa rozpustí v 4 l vody obsahujúcej 192 g chloridu sodného a prefiltruje sa cez membránový filter o veľkosti pórov 0,35 μm . Z filtrátu sa vyzráža HYA tromi objemami etanolu a po oddelení rozpustí v 2 l vody obsahujúcej 9,6 g chloridu sodného a opäť vyzráža etanolom. Toto zrážanie sa opakuje celkom štyrikrát. Potom sa zrazenina 3-krát premyje acetónom a usuší pri teplote 40 $^{\circ}\text{C}$. Nakoniec sa produkt sterilizuje za sucha pod dusíkom pri 105 $^{\circ}\text{C}$ 15 minút.

Získalo sa 1,7 g suchého produktu obsahujúceho 0,22 % hmot. bielkovín (ako albumín) o molekulovej hmotnosti 1,62 milióna.

P r í k l a d 3

Surovinou použitou k extrakcii boli hrebene sliepok získané po porážke a varení v horúcej vode, povrchovo očistené, orezané a zmrazené pri -40°C . Na prípravu bol použitý 1 kg zmrazenej suroviny rozdrtenej na jemné čiastky. Tento materiál bol trikrát extrahovaný vždy 4 l etanolu po dobu 24 hodín za mierneho miešania. Spojené extrakty sa zmiešajú a upraví sa prídavkom chloridu sodného na koncentráciu 100 g/l NaCl. Potom sa pridá 120 g močoviny a extrakt sa mieša 6 hodín a rovnakým množstvom zmesi trichlórretylénu a tetrachlórmetánu v pomere 1:1. Potom sa oddelia fázy, oddelená vodná vrstva sa okyslí prídavkom zriedenej kyseliny chlorovodíkovej na pH 4,0 a opakuje sa miešanie so zmesou trichlórretylén-tetrachlórmetán za rovnakých podmienok po dobu 5 hodín. Vodná fáza sa oddelí a neutralizuje zriedeným roztokom uhličitanu sodného na pH $7,0 \pm 0,5$. Potom sa pridá 1,5 g chloridu horečnatého a extrakt sa ponechá po premiešaní v kľude pri 5°C najmenej 1 hod. Roztok sa prefiltruje a filtrát sa vyzráža tromi objemami etanolu. Zrazenina sa rozpustí v 1,5 l vody obsahujúcej 9,2 g chloridu sodného a 1 % hmot. cetylpyridínium bromidu. Po rozpustení sa opäť vyzráža 3 objemami etanolu HYA a oddelí. Rozpustenie v 0,1 M roztoku chloridu sodného a vyzrážanie etanolom sa opakuje celkom štyrikrát. Nakoniec sa zrazenina premyje tromi objemami acetónu a usuší za zníženého tlaku. V suchom stave sa produkt sterilizuje pri teplote 135°C po dobu 15 minút. Pri príprave sa získalo 2,14 g produktu o obsahu 1,2 % hmot. bielkovín (ako albumín) o molekulárnej hmotnosti 3,8 miliónu. Tento produkt bol vhodný pre povrchové aplikácie.

P r í k l a d 4

Surovina použitá na prípravu hyaluronátu (očistená pupočná šnúra, hrebene kohútov, očný sklavec alebo iný materiál obsahujúci hyaluronovú kyselinu) sa mechanicky rozmelní v zmrazenom stave a vloží do extrakčnej nádoby opatrenej miešadlom. Tu sa v pohybe extrahuje trikrát 90 až 96 %-ným etanolom, vždy po dobu 24 hodín, posledná extrakcia trvá 48 hodín. Extrahovaná surovina sa použije na izoláciu hyaluronátu. Prvá extrakcia sa vykoná 10 %-ným roztokom chloridu sodného po dobu 24 hodín v množstve 10 l na každý kilogram suroviny. Na ostatné extrakcie sa použije destilovaná voda v rovnakom množstve, extrakcia trvá vždy 24 hodín za striedavého pohybu a kľudu extrahovanej zmesi. Všetky tri extrakty sa spoja a prídavkom pevného chloridu sodného sa upraví koncentrácia na 10 g/l.

Spojené extrakty sa mierne zalkalizujú na pH 7,4 až 7,8 pomocou hydrogenuhličitanu sodného, pridá sa močovina v množstve 2,5 g/l a chlórctan sodný v množstve 1,5 g/l. Roztok sa dobre premieša a potom ponechá v kľude v tmavom prostredí a pri teplote do 20°C , po dobu 20 hodín.

Vzniknutý homogénny roztok sa prefiltruje cez filtračnú membránu o veľkosti pórov $0,5\text{ }\mu\text{m}$ a z filtrátu sa vyzráža produkt etanolom v množstve 100 % objemových, oddelí sedimentáciou a potom sa rozpustí v 10-krát menšom objeme redestilovanej vody, obsahujúcej 5,6 g NaCl/l a opätovne prečistí zrážaním etanolom, teraz v množstve 300 % obj. Rozpúšťanie a zrážanie sa ešte 2-krát opakuje a potom sa k vodnému roztoku hyaluronátu pridá pred zrážaním etanolom cetylpyridínium bromid v množstve 0,5 g/l a ponechá sa 2 hodiny sterilizovať za obvyčajnej teploty. Potom sa zmes vyzráža etanolom a dvakrát opakuje. Nakoniec sa roztok vyzráža 3 objemami acetónu, trikrát sa zrazenina dekantuje a premyje malým množstvom acetónu a nakoniec usuší za zníženého tlaku pri obvyčajnej teplote.

P R E D M E T V Y N Á L E Z U

1. Spôsob prípravy apyrogenného derivátu kyseliny hyaluronovej extrakciou biologických materiálov s využitím čiastočnej deproteinizácie extraktu etanolom a chlorovanými uhľovodíkmi, vyznačujúci sa tým, že na vodnú fázu po extrakcii upravenú na hodnotu pH 5,5 až 8,5 sa pôsobí alkylačnými činidlami*obecného vzorca $X/n/-R$ alebo $X/n/-R-P/m/$, kde X je chlór, bróm alebo jód, R je organická skupina s počtom uhlíkov 1 až 14, n je celé číslo z intervalu 1 až 5, P je polárna skupina anionického typu ako $-COOH$, $-OH$, $-COONa$, $-COOK$, $-COONH_2$, $-SO_3H$ a m je celé číslo z intervalu 1 až 5, v množstve 0,1 až 15 % hmot. na hmotnosť sušiny extraktu po dobu 1 až 24 hodín a/alebo látkami polárneho charakteru, ktoré sú rozpustné vo vode a majú hydrotropnú schopnosť ako je močovina, guanidín, alebo jodid draselný v množstve 0,1 až 10 % hmot. na hmotnosť sušiny extraktu, vzniknutý roztok sa prefiltruje cez filtračnú membránu s veľkosťou pórov 0,15 až 0,50 μm , z filtrátu sa produkt vyzráža prídavkom 300 % obj. etanolu, po oddelení sa rozpustí vo vode a sterilizuje cetylpyridinium chloridom alebo bromidom, opätovne vyzráža etanolom a nakoniec premyje acetónom, vysuší a sterilizuje zahrievaním na 105 až 150 °C po dobu 10 až 25 minút.

2. Spôsob prípravy apyrogenného derivátu kyseliny hyaluronovej podľa bodu 1 vyznačujúci sa tým, že na roztok kyseliny hyaluronovej po odfiltrovaní cez filtračnú membránu sa pôsobí zlúčeninami kovov vybraných zo skupiny Mg^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} , Ba^{2+} , Al^{3+} , Cr^{3+} jednotlivo alebo v zmesi v množstvách 0,5 až 10 mólov na mól hyaluronátu.

3. Spôsob podľa bodov 2 a 1 vyznačujúci sa tým, že po pridaní alkylačného činidla sa pridá okrem cetylpyridinium halogenidu formaldehyd v množstve 0,1 až 10 g na 10 l roztoku hyaluronátu.

4. Spôsob podľa bodov 1 a 3 vyznačujúci sa tým, že po prídavku alkylačného činidla sa okyselený extrakt premýva cez kolónu s kyslým iontomeničom v H cykle a po zneutralizovaní sa pridá trypsín v množstve 0,001 až 0,6 g na 10 l roztoku.