



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY  
A OBJEVY

# POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

212269

(11) (B2)

(51) Int. Cl.<sup>3</sup>  
D 01 F 1/10

- (22) Přihlášeno 17 03 78  
(21) (PV 1720-78)  
(32) (31)(33) Právo přednosti od 22 03 77  
(21482 A/77) Itálie  
(40) Zveřejněno 31 07 81  
(45) Vydáno 15 11 84

- (72) Autor vynálezu MARCONI WALTER, SAN DONATO MILANESE, BARTOLI FRANCESCO, ŘÍM,  
MORISI FRANCO, SAN GIOVANNI IN PERSICETO, PITTALIS FRANCESCO, ŘÍM (Itálie)  
(73) Majitel patentu SNAMPROGETTI S. p. A., MILÁN (Itálie)

(54) Způsob přípravy biokompatibilních vláken z polymerů

Vynález se týká způsobu přípravy biokompatibilních vláken, který se provádí přidáním polymeru, který je vybrán z celé řady nejběžněji používaných polymerů a kopolymerů, ke zvláknovacímu roztoku, přičemž se rovněž přidají látky vybrané z anti-thrombických látek, antikoagulačních látek a látek které mají podobný účinek. Tyto látky mohou být aplikovány jako povrchová vrstva na látky nebo výrobky zhotovené z polymerních látek.

Produkty připravené postupem podle vynálezu se hodí k nejrůznějším biologickým účelům.

Vynález se týká způsobu přípravy bio-kompatibilních vláken z polymerů, se zakotvenými protilátkami, antigeny nebo antisery v dané formě nebo polymerované, chelatačními enzymy, adsorbčními iontoměniči nebo jinými dalšími látkami biologického významu. V alternativním provedení se vláknité materiály povlékají během provádění zvláknování těmito bio-kompatibilními materiály.

Pokud se týče dosavadního stavu techniky, potom je třeba uvést, že v literatuře týkající se daného oboru, a zvláště je možno citovat italský patent č. 836 462, jehož autory jsou stejní autoři jako u předmětného vynálezu, je známo připravovat vláknité struktury, přičemž se používá roztoků, které obsahují polymerní látky, které jsou schopné tvořit vlákna a v těchto roztocích jsou dispergovány roztoky obsahující produkty, které mají být zakotveny ve formě drobkových kapiček podle velikosti částíček emulze.

Takto připravená emulze může být navijena za mokra nebo za sucha, přičemž vznikne vlákno, které má na svém vnějším povrchu velké množství drobných otvorů, ve kterých se uzavřou látky, které jsou určeny k zakotvení. Tyto látky jsou separovány od vnějšího prostředí účinkem membrány, která zabráňuje uvedeným látkám aby opouštěly drobné prostory, přičemž současně umožňuje volnou difúzi zakotvených látek, které jsou aktivní.

Takto připravené struktury projevují vysokou aktivitu v důsledku vysokého poměru povrchové plochy k objemu, přičemž současně umožňují vázání látek, které nejsou příliš vysokého stupně čistoty. Produkty podle dosavadního stavu techniky mají ale výhodu v tom, že se jim špatně přizpůsobují živé organismy.

Cílem uvedeného vynálezu je odstranění výše uvedených nedostatků.

Podstata způsobu přípravy bio-kompatibilních vláken z polymerů se zakotvenými protilátkami, antigeny, nebo antisery v dané formě nebo polymerované, chelatačními enzymy, adsorbčními iontoměniči nebo jinými dalšími látkami biologického významu, spočívá podle uvedeného vynálezu v tom, že se na polymer o molekulové hmotnosti v rozmezí od 25 000 do 500 000, ve formě polymerního roztoku nechá působit přímo v reakční směsi činidlem zabráňujícím agregaci thrombocytů nebo antikoagulačním činidlem nebo antithrombotickou látkou, které jsou vybrány ze skupiny zahrnující 4,5-difenyl-2-bis/2-hydroxyethyl/aminooxazol, 4,8-dipiperidino-2,6-diethanolamin-pyrimido-5,4-pyrimidin a dikumarol, nebo směsí s biokompatibilním polymerem, přičemž množství uvedeného polymeru se pohybuje v rozmezí od 20 % do 99 % hmotnostních a množství předávané zakotvené složky se pohybuje v rozmezí od 0,1 % do 30 % hmotnostních, a potom následuje zvláknování.

Ve výhodném provedení postupu podle uvedeného vynálezu se k polymerovému roztoku přidávají činidla vytvářející během zvláknování bio-kompatibilní povrchovou vrstvu, s výhodou polyurethan.

Rovněž je výhodné, jestliže se kromě antikoagulačního činidla k roztoku polymerů přidávají látky biologické povahy, které se pohlcují, nebo že se k roztoku polymerů přidávají látky biologického významu, které se zakotví za vzniku bio-kompatibilní povrchové vrstvy během zvláknování.

Pomocí postupu podle uvedeného vynálezu byl autory úspěšně vyřešen problém spočívající v úpravě směsí, ze kterých se připravují vlákna, přičemž je postupem podle tohoto vynálezu dosaženo shora uvedených vlastností, přičemž jsou vlákna současně bio-kompatibilní, to znamená, že jsou schopná zavedení do živých organismů, nebo je možno je jakýmkoliv způsobem vsazovat do organismů, přičemž se dostávají do kontaktu s krví, aniž by to znamenalo nebezpečí haemorrhagie nebo toxicity, jako je to možné v případech, kdy se použijí rozpustná antikoagulační činidla.

Tato uvedená vlákna je rovněž možno použít v případech, kdy je nutné uvádět do kontaktu

s krví takové látky, jako jsou například enzymy, antigeny, protilátky nebo detoxikační činidla, přičemž tyto látky jsou zakotveny v těchto vláknech a toto zakotvení je možno provést metodami známými z dosavadního stavu techniky.

Jednotlivé stupně přípravy podle uvedeného vynálezu je možno shrnout následujícím způsobem:

a) do polymerů roztoku v reakční směsi se přidává vhodné antikoagulační činidlo a po případě látky, které jsou určeny ke kontaktu s krví,

b) ve fázi zvláknování se do roztoku polymerů přidávají takové látky, které tvoří bio-kompatibilní povrchovou vrstvu. V případech, kdy je to nutné je možno rovněž do roztoku přidat látky, které jsou určeny ke kontaktu s krví, přičemž uvedené látky jsou náchylné k zakotvení v uvedených vláknech.

Mezi materiály, které je možno použít v případě postupu podle uvedeného vynálezu je možno uvést následující látky: celulóзовé polymery, esterifikované, etherifikované a nitrované celulóзовé polymery, polyamidy, polymery a kopolymery akrylonitrilu, butadienu a isoprenu, akryláty a methakryláty, vinylestery, vinylchloridy, polymery nebo kopolymery vinylidenchloridu, styrenu, vinylmáseľnanu, gamma-methylglutamátu, polyurethanů a rovněž směsi uvedených polymerů.

Mezi materiály, které je možno použít v případě postupu podle uvedeného vynálezu, jako látky, které přimíšeny k výše uvedeným polymerním látkám umožňují získání výsledných bio-kompatibilních výrobků, je možno uvést následující činidla, která zabraňují agregaci trombocytů: 4,5-difenyl-2-bis-(2-hydroxyethyl)aminooxazol, 4,8-dipiperidin-2,6-diethanolaminopyrimido-/5,4d/-pyrimidin, deriváty kyseliny salicylové, jako je například aspirin a methylsalicylát a ostatní další látky. Pro uvedené účely je možno použít polymery, které jsou inherentně bio-kompatibilní, jako jsou například různé druhy polyurethanů, které je možno použít jako samotné nebo ve směsi s nosným polymerem, nebo povlaky pro jiné polymery.

V dalším jsou uvedeny praktické příklady provedení, přičemž tyto příklady mají pouze ilustrativní charakter a nijak neomezuji podstatu uvedeného vynálezu.

#### P ř í k l a d 1

Podle tohoto provedení se rozpustí 10 gramů triacetátu celulózy (Fluka) ve 133 gramech methylenchloridu (Carlo Erba, čisté reakční činidlo), při teplotě okolí. K získanému polymernímu roztoku se potom přidá 1 gram 4,5-difenyl-2-bis-(2-hydroxyethyl)aminooxazolu, který se připraví postupem známým a popsáním v dosavadním stavu techniky, jako například: V. Rosnati, E. Marchetti, G. Mattalia, Journal Medical Chemistry, 11, str. 1 092 až 1 093 (1968).

K tomuto polymernímu roztoku, který se ředem ochladí na teplotu 0 °C, se potom přidá 20 gramů vodného roztoku, který obsahuje 30 % glycerinu.

Mícháním uvedených složek se připraví emulze, která obsahuje kapičky vodné fáze, rozptýlené v polymerní fázi, přičemž tyto kapičky mají průměr od 4 do 5 mikronů.

Takto připravená emulze se potom nechá stát po dobu 20 minut, a potom se nalije do ocelového válce, přičemž tento válec je připojen svým horním koncem na dusíkovou láhev a spodní konec tohoto válce je opatřen zvláknovací tryskou, která je ponořena do toluenové lázně. Do uvedeného prostoru se potom přidává dusík, přičemž se vytvoří jistý tlak dusíku a pod tímto tlakem se emulze protlačuje zvláknovací tryskou do toluenové lázně, kde dochází ke koagulaci.

Takto získané vlákno se potom navíjí na navíjecí válec a zpracuje se proudem vzduchu za účelem odstranění toluenu a methylenchloridu.

Současně s tímto postupem byl připraven druhý přípravek, přičemž se při této přípravě použilo stejného postupu, a pro přípravu emulze se použilo roztoku invertázy BDH, místo výše uvedeného roztoku vody s glycerinem. Aktivita, kterou projevuje vlákno obsahující invertázu, byla zjišťována za pomoci substrátu obsahujícího 20 % hmotnostních na objem roztoku sacharózy ve fosfátovém pufru (0,1 M, pH 4,4, při teplotě 25 °C).

Výsledná aktivita je 30% vzhledem k celkové aktivitě pohlcených látek a tato aktivita je konstantní i po 30 dnech kontinuálního promývání fosfátovým pufrům (0,1 M, pH 4,5).

Potom se připraví intravenozní katetr (Wallace) o délce 30 centimetrů, o vnitřním průměru 0,69, a vnějším průměru 1,14 milimetrů, který se povleče filmem triacetátu celulózy ponořením této trubice do roztoku polymeru v methylenchloridu (koncentrace 2 % hmotnostní), obsahující 4,5-difenyl-2-bis/2-hydroxyethylaminooxazol v množství ekvivalentním 10 %, vzhledem k triacetátu celulózy. Na takto získaný katetr se potom navine homogenním způsobem po celé délce 60 miligramů vlákna pohlcujícího roztok vody a glycerolu.

Tento katetr se potom vloží do stehenní žíly průměrně dospělého psa v celkové anestezii (Pentothal) za volné respirace.

V dalším postupu se izoluje postranní větve stehenní žíly a uvedený katetr se zavede celou svojí délkou tak, aby se převážná část uvedeného katetru vznášela v žilách vena iliaca a vena cava inferior. Konec katetru se připojí ke kolaterální větvi stehenní žíly a potáhne se svalovými svazky. Nakonec se provede kožní šev. Během provádění této operace a okamžitě po jejím provedení se zvířeti podává heparin za účelem zabránění vzniku cévních thrombů v důsledku chirurgického poranění.

Klinický stav zvířete se zaznamenává po dobu 90 dní, přičemž se provádějí periodická měření následujících krevních parametrů: fibrinogenese, agregace thrombocytů, prothrombinový čas, thromboelastogram, počet červených krvinek, bilirubinový test.

Získaná klinická data jsou uvedena v následující tabulce 1, přičemž z těchto hodnot je zřejmé, že během celkové doby provádění testu byl celkový stav zvířete normální. Nakonec byl katetr vyjmut a po opatrném prozkoumání bylo zjištěno, že je prostý thrombů. Posmrtné zkoumání žíly ukázalo absenci vaskulárních lézí.

T a b u l k a 1

Krevní parametry

| Doba (dny) | Klinický stav | Fibrinogen (mg/100 ml) | Tensioelastogram r + X am | Agregace thrombocytů | Červené buňky (%) | Hemoglobin (%) | Bilirubin (mg/100 ml) |
|------------|---------------|------------------------|---------------------------|----------------------|-------------------|----------------|-----------------------|
| 1          | dobrý         | 240                    | 10                        | 72 38                | 44                | 14,0           | 0,56                  |
| 7          | dobrý         | 250                    | 10                        | 70 42                | 46                | 14,2           | 0,62                  |
| 30         | dobrý         | 210                    | 12                        | 74 40                | 45                | 13,8           | 0,64                  |
| 60         | dobrý         | 220                    | 9                         | 72 35                | 46                | 13,9           | 0,60                  |
| 86         | dobrý         | 230                    | 10                        | 71 38                | 43                | 14,4           | 0,60                  |

## P ř í k l a d 2

Podle tohoto provedení se rozpustí ve 133 gramech methylenchloridu 10 gramů triacetátu celulózy a 1 gram 4,4-diaminodifenylmethanu. K tomuto roztoku polymerů se potom přidá za míchání 20 gramů 30% roztoku vody a glycerinu.

V dalším postupu se míchání provádí tak dlouho, dokud se nevytvoří homogenní emulze.

Tato emulze se potom převede do zvláknovací nádrže, která byla popsána v příkladu 1, přičemž koagulační kapalinou je roztok toluenu, obsahujícího 1 % polyethylenglykol-bis-chlormravenčanu (o molekulové hmotnosti 325). Během provádění zvláknování reaguje diamin obsažený v polymerní fázi, s bis-chlormravenčanem, rozpuštěným v toluenu, a povléká vlákno triacetátu celulózy vrstvou polyurethanu.

Intravenózní katetr, stejného typu jako bylo uvedeno ve shora uvedeném příkladu 1, se povleče filmem, což se provede jedním ponořením katetru do 2% roztoku triacetátu celulózy a 0,2% roztoku 4,4'-diaminodifenylmethanu v methylenchloridu, který obsahuje rovněž 1 % polyethylenglykolbischlormravenčanu.

Potom se navine 60 miligramů tohoto vlákna na katetr za účelem obalení tohoto katetru po celé délce.

V dalším se katetr vloží do stehenní žíly průměrně dospělého psa stejným způsobem jako je to uvedeno ve shora uvedeném příkladu 1.

Tento test probíhal po dobu 90 dní.

V dále uvedené tabulce č. 2 jsou uvedeny výsledky, získané při provádění testu, při kterém se sledují krevní parametry.

Nakonec se po 90denním používání uvedený katetr vyjme z uvedené stehenní žíly, stejným způsobem jako je uvedeno v příkladu 1, přičemž se zjišťuje přítomnost thrombů, což nebylo v uvedeném případě zaznamenáno. Při posmrtném zkoumání stehenní žíly, byla zjištěna absence vazálních lézí.

## T a b u l k a 2

Krevní parametry

| Doba (dny) | Klinický stav | Fibrinogen (mg/100 ml) | Tensioelas-<br>togram<br>r + X | Agregace<br>thrombocytů<br>am | Červené<br>buněk (%) | Hemoglo-<br>bin (%) | Bilirubin<br>(mg/100 ml) |
|------------|---------------|------------------------|--------------------------------|-------------------------------|----------------------|---------------------|--------------------------|
| 1          | dobrý         | 310                    | 9                              | 68 48                         | 49                   | 15,0                | 0,62                     |
| 7          | dobrý         | 320                    | 12                             | 65 52                         | 48                   | 15,6                | 0,70                     |
| 30         | dobrý         | 290                    | 13                             | 74 50                         | 49                   | 15,4                | 0,70                     |
| 60         | dobrý         | 280                    | 12                             | 75 45                         | 46                   | 14,0                | 0,54                     |
| 86         | dobrý         | 290                    | 12                             | 70 56                         | 45                   | 15,0                | 0,80                     |

## P ř í k l a d 3

Podle tohoto provedení se rozpustí při teplotě okolí 15 gramů triacetátu celulózy ve 100 gramech methylenchloridu.

K tomuto polymernímu roztoku se potom přidá 1,5 gramu 4,5-difenyl-2-bis-(2-hydroxyethyl)aminoxazolu. Potom se ponechá roztok odpařovat, dokud se neodstraní veškeré rozpouštědlo.

Z tohoto materiálu se potom připraví fólie o tloušťce 4 milimetry. Test na adhezivitu krevních destiček se provede metodou A. J. Hellema (Platelet adhesiveness in Von Willebrand's disease). Použije se nové modifikace filtrační metody se skleněnými prstenci, viz: Glass Bead filter method, Scand. J. Haemat., 7, 374 (1970), přičemž se použije 6 mililitrů krve zdravého jedince, která se odejme a okamžitě se nechá protékat přes skleněné prstence kolony (Adeplat-Mascia Brunelli) za pomoci čerpadla kterým prochází 4 mililitry za minutu.

Potom se skleněné prstence nahradí kouskem triacetátu celulózy o hmotnosti 200 miligramů, a postup shora uvedený se zopakuje.

Součet krevních destiček se provede před a po průtoku krve přes skleněné prstence nebo přes výše uvedený polymerní materiál, přičemž se potom se krev shromáždí ve vodném roztoku obsahující draselnou sůl EDTA v koncentraci 6 gramů v 10 mililitrech.

Součet krevních destiček se provede s mikroskopem, pracujícím na principu fázového kontrastu, postupem známým z literatury a popsáným Brecherem a Cronkitem (Morphology and enumeration of human-blood platelets, J. Appl. Physiol., 3, 365, 1950).

V případě skleněných prstenců byla adhezivita krevních destiček 78,8 %, přičemž v případě použití celulóзовého materiálu nebylo možné změřit pokles krevních destiček, to znamená, že byl pod citlivostí uvedené měřicí metody.

#### P ř í k l a d 4

Podle tohoto provedení se rozemele 20 gramů odštěpků z běžného PVC ve válcovém mlýně při teplotě pohybující se v rozmezí od 120 °C do 130 °C během intervalu 20 minut. K této polymerní hmotě se potom přidá 1 gram 4,5-difenyl-2-bis-(2-hydroxyethyl)aminoxazolu. Po ochlazení na teplotu okolí se získá fólie o tloušťce 5 milimetrů.

V dalším postupu se potom na tomto materiálu o hmotnosti 200 miligramů, který byl získán shora uvedeným postupem, zjišťuje adhezivita způsobem, který byl popsán v předchozím příkladu. Rovněž i v tomto případě nebyl zaznamenán pokles krevních destiček po průtoku krve uvedeným materiálem.

#### P ř í k l a d 5

Podle tohoto provedení se připraví trubice z polydimethylsiloxanu o vnitřním průměru 7 milimetrů, vnějším průměru 9 milimetrů a o délce 1 metr, která se naplní 1 % acetonovým roztokem 4,5-difenyl-2-bis(2-hydroxyethyl)aminoxazolu a potom se tato trubice uzavře na obou koncích. Tato trubice se ponechá po dobu 24 hodin při teplotě okolí, použitý roztok se zcela odpaří, přičemž stěny trubice je možno pozorovat pod UV ozáření, jako silně a rovnoměrně fluorescentní, a tento fakt potvrzuje pravidelné rozdělení činidla zabranujícího agregaci trombocytů v uvedeném polymeru.

Potom se kus takto zpracované trubice a podobná kontrolní trubice podrobí testu na adhezivitu krevních destiček podle metody popsané A. J. Hellenem (Platelet adhesiveness in Von Willebrand's disease). V tomto případě se použije nové modifikace filtrační metody se skleněnými prstenci, uvedené v: Scand. J. Haemat., 7, 374 (1970), přičemž se použije krve zdravého jedince, přičemž tato krev se po odebrání nechá protékat uvedenými trubicemi pomocí čerpadla, kterým prochází 4 mililitry za minutu, a testuje se.

Součet krevních destiček se provádí před a po průtoku krve uvedenými trubicemi, přičemž vzorky krve se shromáždí ve vodném roztoku, který obsahuje draselnou sůl EDTA o koncentraci 6 miligramů v 10 mililitrech. Součet krevních destiček se provede za pomoci mikroskopu, pracujícím na principu fázového kontrastu, metodou Brechera a Cronkita (Morphology and enumeration of human blood platelets, J. Appl., Physiol., 3, 365 /1950/).

V případě kontrolní trubice činila adhezivita 58,5 %. V případě zpracované trubice podle uvedeného výsledku nebyl zaznamenán žádný pozorovatelný pokles počtu krevních destiček vzhledem k počtu na počátku.

#### P ř í k l a d 6

Podle tohoto provedení se trubice "Tygon" o vnitřním průměru 7 milimetrů, vnějším průměru 9 milimetrů a o délce 1 metr, zpracuje roztokem činidla zabraňujícím agregaci trombocytů podle příkladu 5. Tato trubice se potom podrobí testu na adhezivitu krevních destiček, přičemž výsledky se porovnávají s kontrolní trubicí, nezpracovanou, jak bylo uvedeno v příkladu 5. Rovněž i v tomto případě nebyl zaznamenán žádný pozorovatelný pokles počtu krevních destiček v případě zpracované trubice, přičemž v případě nezpracované trubice byla adhezivita 48 %.

#### P Ř E D M Ě T V Y N Á L E Z U

1. Způsob přípravy bio-kompatibilních vláken z polymerů, se zakotvenými protilátkami, antigeny nebo antiséry v dané formě nebo polymerované, chelatačními enzymy, adsorbčními iontoměniči nebo jinými dalšími látkami biologického významu, vyznačující se tím, že se na polymer o molekulové hmotnosti v rozmezí od 25 000 do 500 000 ve formě roztoku polymerů působí přímo v reakční směsi činidlem zabraňujícím agregaci trombocytů nebo antikoagulačním činidlem nebo antithrombickou látkou, které jsou vybrány ze skupiny zahrnující 4,5-difenyl-2-bis(2-hydroxyethyl)aminooxazol, 4,8-dipiperidino-2,6-diethanolamin-pyrimido-5,4-pyrimidin a dikumarol, nebo směsí s biokompatibilním polymerem, přičemž množství uvedeného polymeru se pohybuje v rozmezí od 20 % do 99 % hmotnostních a množství předávané zakotvené složky se pohybuje v rozmezí od 0,1 % do 30 % hmotnostních, a potom následuje zvláknování.
2. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se k roztoku polymerů přidávají činidla vytvářející během zvláknování vláken bio-kompatibilní povrchovou vrstvu, s výhodou polyurethan.
3. Způsob podle bodů 1 a 2, vyznačující se tím, že kromě antikoagulačního činidla se k polymernímu roztoku přidávají látky biologické povahy, které se zakotví.
4. Způsob podle bodů 1 až 3, vyznačující se tím, že se k roztoku polymerů přidávají látky biologického významu, které se zakotví za vzniku bio-kompatibilní povrchové vrstvy během zvláknování.