

(11) Patento numeris: **3873** (51) Int. Cl.⁵: **C08B 37/10**
A61K 31/73

(21) Paraiškos numeris: **IP1474**

(22) Paraiškos padavimo data: **1993 11 18**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **1995 06 26**

(45) Patento paskelbimo data: **1996 04 25**

(60) SU duomenys: **PCT/HU 90/00013, 1990 02 20**
SU 4895005, 1991 04 11

(31, 32, 33) Prioritetas: **891/89, 1989 02 24, HU**

(72) Išradėjas:

Kalman Burger, HU
Geza Takacs-Nagy, HU
Ivan Rethy-Prikkel, HU
Janos Illes, HU
Bela Stefko, HU
Erzsebet Neszmelyi, HU
Istvan Gebhardt, HU
Istvan Racz, HU
Gyongyver Kiraly, HU
Viktoria Varkonyi, HU

(73) Patento savininkas:

RICHTER GEDEON VEGYESZETI GYAR RT., Gyomroi ut 19-21, 1475
Budapest, HU

(74) Patentinis patikėtinis:

Rita Laurinavičiūtė, 5, UAB "Metida", Pilies g. 8/1-2, 2600 MTP Vilnius, LT

(54) Pavadinimas:

Kompozicijų deprotonuotos hialurono rūgšties asociatų (kompleksų)
pagrindu gavimo būdas

(57) Referatas:

Išradimas priskiriamas kompozicijų, turinčių naujus deprotonuotus hialurono rūgšties su periodinės lentelės ketvirto periodo 3d metalo jonais asociatus kaip aktyvius komponentus arba nešikius, gavimo būdai.

LT 3873 B

Pasiūlytos kompozicijos naudojamos kaip farmacinės arba kosmetinės priemonės, jos įgalina pagerinti kūno plotelių epitelizacijos procesą, klubų opų, pragulų ir t. t. užgijimą.

Išradimas priskiriamas naujų deprotonuotos hialurono rūgšties asociatų (kompleksų) su periodinės lentelės ketvirto periodo 3d metalų jonais ir juos turinčių kompozicijų gavimo būdui.

Pagal geriausią šio išradimo realizavimo variantą, vandeniniai tirpalai, turintys naujus deprotonuotos hialurono rūgšties asociatus su periodinės lentelės 3d metalų jonais, betarpiškai gaunami iš natrio hialuronato vandeninio tirpalo.

Pagal šį išradimą nauji asociatai didžiaja dalimi yra cinko ir kobalto hialuronatai. Kompozicijos, turinčios šiuos asociatus, gali būti naudojamos kaip farmacinės (terapinės) arba kosmetinės priemonės. Kompozicijų, turinčių naujus asociatus, panaudojimo sritis pagal šį išradimą taikoma, pavyzdžiui, kūno dalių epitalizacijos proceso pagreitinimui, klubų opų, pragulų užgijimui, didžiaja dalimi negyjančioms žaizdoms, nudegimams, radiacijos ir šiluminio poveikio pasekmėms, riebalinių liaukų uždegimams, o taip pat jie naudojami ir kitose srityse.

Hialurono rūgštis yra makromolekulė. Ji buvo gauta daugiau nei prieš penkiasdešimt metų, ir pirmą kartą ją aprašė Mejeris (J. Biol. Chem. 107, 629 (1934), J. Biol. Chem. 114, 689(1936)). Veismanas pateikė struktūros aprašymą (J. Am. Chem. Soc. 76, 1753 (1954)). Hialurono rūgštis yra gamtinis didelio klampumo gliukozaminglikanas, turintis gliukurono rūgštį ir β_{1-4} gliukozaminą su besikeičiančiu komponentų santykiu; jos molekulinė masė yra nuo 50000 iki keleto (nuo 3 iki 13) milijonų. Hialurono rūgšties išskyrimas - senas uždavinys, ypatingai švarios hialurono rūgšties išskyrimas ir vartojimas apžvelgiamas JAV patentų Nr. 4141973 ir 4303676 išradimo aprašyme ir Europos patento Nr. 0144019 išradimo aprašyme. Iki dabartinio laiko hialurono rūgštį naudojo natrio druskos pavidale, pavyzdžiui, pagrindinai

terapijoje, oftalmologijoje, chirurgijoje ir kosmetologijoje. Hialurono rūgšties druskos, turinčios šarminių ir žemės šarminių metalų jonus, magnio, aliuminio, amonio arba amonio darinių, gali būti naudojamos kaip nešikliai, promotuojantys vaistų absorbciją (žr. Belgijos patento Nr. 904547 išradimo aprašymą). Hialurono rūgšties sunkiųjų metalų druskos (kuriose prie "sunkiųjų" metalų priskiriama periodinės lentelės 5, 6 ir 7 periodo elementai) ir sidabro druskos naudojamos kaip fungicidinės medžiagos, tuo tarpu aukso druskos naudojamos artrito gydymui (žr. patento WO Nr. 87/05517 išradimo aprašymą).

Naudojant įvairius struktūros aiškinimo būdus, buvo įrodyta, kad antrinė struktūra, t. y. hialurono rūgšties konformacija, kinta priklausomai nuo metalų jonų (W. T. Winter ir A. Sruther: J. Mol. Biol. 517, 761 (1977); I. K. Shechan ir E. D. T. Atkins: Int. Biol. Macromol. 5, 215 (1983); ir N. Figueroa ir B. Chakrabarti: Biopolymers 17, 2415 (1978)). Žymų molekulinės struktūros pakitimą, kaip rodo palyginamasis rentgenostruktūrinis kalio ir natrio hialuronatų tyrimas, gali nulemti netgi panašių metalų jonai (A. K. Mitra ir kiti: J. Macromol., Sci. Phys. 824, 1 ir 21 (1985)).

Literatūroje negalima rasti jokių nuorodų, priklausančių hialurono rūgšties asociatams (kompleksams), turintiems periodinės lentelės ketvirtojo periodo 3d metalų jonus; iš tikrųjų pagal chromatografinės analizės, filtruojant gelį, duomenimis, hialurono rūgštis negali prijungti cinko jonų, ne taip kaip heparinas (R. F. Parish ir W. R. Fair: Biochem. J. 193, 407 - 410 (1981)).

Nežiūrint į tą faktą, kad pagal literatūrinius duomenis hialurono rūgštis (arba jos natrio druska) negali prijungti cinko jonų, šio išradimo autoriai sprendė problemą - tyrė tarpusavio sąveikos tarp hialurono rūgšties ir periodinės lentelės ketvirtojo periodo 3d metalų jonų, didžiąja dalimi apimančius cinko ir kobalto jonus, cheminius procesus. Kadangi pramoninėje gamyboje hialurono rūgštis gaminama tikrai natrio druskos pavidale, ši druska yra pagrindinė medžiaga, tiriant hialuronatus. Todėl tyrimas buvo pradėti nuo natrio jonų ir hialuronato sąveikos proceso tyrimo. Tuo tikslu laisvų natrio jonų aktyvumas vandeniniuose natrio hialuronato tirpaluose buvo nustatytas su natriui selektyvaus stiklo elektrodo pagalba. Pagal tyrimų duomenis vienareikšmiškai buvo nustatyta, kad ne daugiau kaip 60 % natrio jonų, įvestų ekvivalentiniu santykiu kartu su hialuronato karboksilinėms grupėms, vandeniniuose tirpaluose yra laisvų jonų pavidalu, tuo tarpu likę 40 % sudaro ryšį su hialuronatu.

Pagal matavimus buvo nustatyta, kad didinant natrio jonų koncentraciją, chemiškai sujungtų natrio jonų kiekis gali būti padidintas iki 50 - 55 %, skaičiuojant visoms karboksilinėms grupėms. Tokiu būdu, buvo išaiškinta, kad nežiūrint į bendras visų druskų charakteristikas, natrio hialuronatas vandeniniame tirpale disocijuoja nepilnai.

Kitoje tyrimų stadijoje vandeninis natrio hialuronato tirpalas buvo nutitruotas cinko chlorido tirpalu, naudojant natrio jonams selektyvų elektrodą, paminėtą anksčiau, aprašant

laisvų natrio jonų aktyvumo kitimo sistemoje nustatymą. Charakteringa kreivė, aprašanti procesą, pateikiama Fig. 1. Suprantama, kad chemiškai sujungti su hialuronatu natrio jonai atsilaivina, veikiant cinko jonams. Pagal matavimų rezultatus bendra natrio jonų koncentracija padidėja dėka ekvivalentinio cinko kiekio, faktas, tvirtai įrodantis, kad cinko jonai sudaro su hialuronatu stipresnį ryšį, negu natrio jonai. Tokiu būdu, ankstesnis tvirtinimas, kad hialurono rūgštis negali prijungti cinko jonų (R. F. Parish ir W. R. Fair: Biochem. J. 193, 407 - 410 (1981)), eksperimentiškai buvo sugriautas.

Pagal atliktų tyrimų duomenis tampa aišku, kad dėl ekvivalentinių natrio hialuronato ir cinko jonų (cinko chlorido) kiekių sąveikos vandeniniame tirpale susidaro stochiometrinės sudėties cinko hialuronato asociatas. Po atitinkamos izotonizacijos gautas tirpalas gali būti tiesiogiai panaudotas terapiniams tikslams, ir cinko junginio kietu pavidalu nereikia gauti atskiru būdu. Preliminarių tyrimų, naudojant kobalto ir kitų 3d metalų jonus, realizavimas duoda analogiškus rezultatus.

Kietu pavidalu buvo gautas kompleksas junginių savybių tyrimui, o tiesioginis cinko jonų apsupimas buvo ištirtas smulkių struktūrų, sugeriant rentgeno spindulius, gavimo metodu. Buvo nustatyta, kad cinkas apsuptas keturiais anglies atomais vidinėje koordinacinėje sferoje. Ryšio Zn-O ilgis 199 pm, tuo tarpu du anglies atomai yra 241 pm atstumu nuo cinko atomo.

Pagal tyrimus cinko hialuronatas skiriasi nuo analogiško vario komplekso, kuris turi keturias ekvatorines ir dvi ašines jungtis Cu-O 194 ir 243 pm ilgio atitinkamai. Atstumas tarp vario atomo ir dviejų anglies atomų lūgis 258 pm. Kobalto komplekso struktūra panaši į cinko komplekso struktūrą, o ne į vario.

Tuo būdu, išradimas apima kompozicijas, turinčias kaip aktyvų komponentą arba nešėją deprotonuotos hialurono rūgšties asociatą (kompleksą) su periodinės lentelės ketvirto periodo 3d metalo jonais, nebūtinai sudėtyje su kitais aktyviais komponentais ir/arba priedais.

Įeinantys į kompozicijos sudėtį kompleksai gaunami tokiu būdu:

a) vandeninio tirpalo, turinčio ekvivalentinį druskos, geriausiai vieno iš periodinės lentelės ketvirto periodo 3d metalo chlorido, kiekį, pridėjimą į vandeninį natrio hialuronato ar kitos hialuronato druskos (šarminio arba žemės šarminio metalo, norint sidabro druskos) tirpalą; arba

b) asociato, sudaryto iš hialurono rūgšties su ketvirtinio amonio druska vandeninės suspensijos, ištirpinimas tirpiklių mišinyje, turinčiame vandeninius periodinės lentelės ketvirto periodo 3d metalo tirpalą ir tirpiklį, dalinai besimaišantį su vandeniu, geriausiai N-butanoli; po to

- asociato (komplekso), gauto iš hialurono rūgšties su periodinės lentelės ketvirto periodo 3d metalo jonu, nusodinimas žinomu būdu, naudojant alkanolį arba alkanoną, arba

- nuosėdų išskyrimas iš tirpalo ir po to, norint,
- išdžiovinimas švelniomis sąlygomis.

Metallų asociatų aukščiau nurodytu būdu gavimo procese pH lieka lygus 5. 0,2 sv./tūr. % hialuronato tirpale atveju, pH pasiekia 5,4, tuo tarpu kai 0,5 sv./tūr. % tirpale atveju, pH lygus 5. Esant būtinumui, pastarojo tirpalo pH galima pakeisti nuo 5,5 iki 5,6, pridedant keletą izotoninio natrio acetato tirpalo lašų.

Dviejų tipų tirpalai, turintys cinko hialuronatą kaip aktyvų komponentą, gali būti gauti aukščiau nurodytu būdu.

1. Izotoninis cinko hialuronato tirpalas gaunamas, pridedant cinko chlorido perteklių.

Atsižvelgiant į tai, kad laisvas cinko chloridas gali būti panaudotas dermatologijoje, cinko hialuronato tirpalo osmoso slėgis buvo sulygintas su izotoniniu slėgiu cinko chlorido pagalba. Tirpalas, gautas tokiu būdu, visai neturi laisvo hialuronato (nesujungto su cinku), bet sistemoje kartu su cinko hialuronatu yra cinko chlorido perteklius.

2. Izotoninis cinko hialuronato tirpalas gaunamas, pridedant monosacharidą arba karbohidratinį alkoholį.

Terapiniams tikslams, kai cinko jonų nesujungtų su hialuronatu buvimas neaptariamas, izotoninis tirpalas, turintis ekvivalentį hialuronatui cinko jonų kiekį, gaunamas naudojant daugiaatomį alkoholį (karbohidratinį alkoholį, geriausiai sorbitolį) arba mono- arba disacharidą (geriausiai gliukozę). Laisvų cinko jonų ir laisvo hialuronato kiekis šioje sistemoje nesiekia 5 % viso cinko ar hialuronato kiekio atitinkamai.

Asociatų panaudojimo pagal išradimą procese ilgainiui gali prireikti kompozicijų, laisvų nuo jonų. Tai yra, aukščiau nurodytu būdu gauti asociatai, paprastai turi natrio chloridą ar kitą druską, sudarytą iš pradinio hialuronato katijono ir 3d metalo druskos jono.

Du skirtingi būdo variantai gali būti panaudoti hialurono rūgšties asociato su 3d metalo jonu, neturinčio druskos, gavimui.

a) ketvirtinio amonio druskos tirpalas porcijomis sudedamas į žinomą hialuronato, geriausiai natrio hialuronato, tirpalą. Išvalius šviežiai nusodintas ketvirtines amonio druskas, asociatas ištirpinamas intensyviai maišant dviejų tirpiklių mišinyje, susidedančiame iš periodinės lentelės ketvirto periodo 3d metalo jono vandeninio tirpalo ir tirpiklio, dalinai besimaišančio su vandeniu, geriausiai n-butanolio. Dvi fazes galima atskirti, po to hialuronato asociatas nusodinamas, pridedant į vandeninę fazę alkanolio arba alkanono. Nuosėdos atskiriamos ir praplaunamos; arba

b) įdėjus maišant nuo 2 iki 3 tūrių C_{1-3} alkanolio arba C_{3-4} alkanono į cinko hialuronato tirpalą, atitinkantį neizotoniniam tirpalui, turintį cinko chloridą ekvivalentiniu hialuronatui kiekiu, nusodintas cinko hialuronatas nufiltruojamas ir praplaunamas alkanoliu arba alkanonu,

atitinkamai panaudotu nusodinimui. Esant būtinumui, cinko hialuronatas ištirpinamas tik vandenyje ir pakartojamas nusodinimo procesas.

Kai būtina gauti kietą cinko hialuronatą, neturintį laisvų jonų, nuosėdos išdžiovinamos po slėgiu švelniose sąlygose. Tuo atveju, jeigu reikia cinko hialuronato tirpalo, neturinčio laisvų jonų, geriausia ištirpinti cinko hialuronatą, gautą iš tirpiklio.

Pagal bet kurį iš abiejų proceso variantų kietą arba ištirpintą medžiagą, neturinti laisvų jonų, gaunama bet koku švarumu, priklausančiu nuo pradinio cinko hialuronato kokybės.

Kompozicijų, turinčių cinko hialuronatą pagal išradimą kaip aktyvų komponentą, kliniko - farmakologinių tyrimų rezultatai (13 pavyzdys) paaiškinami klubų opos gydymo pavyzdžiu, naudojant junginius kūno paviršiaus, neturinčio epitelio, epitelizacijai. Kompozicija, turinti natrio hialuronatą, buvo panaudota kaip kontrolinis pavyzdys.

Šis tyrimas buvo atliktas su 12 ar 14 pavyzdžių atitinkamai 8 - 12 pacientų, kenčiančių dėl klubų opos, pagalba. Abiejų grupių pacientų pasiskirstymas pagal lytį ir amžių, o taip pat ligos prigimtį buvo toks.

Aktyvus komponentas	Pacientų skaičius	Moterys	Vyrai	Vidutinis amžius	Išgydytų opų skaičius	Opos charakteris*		
						A	V	M
Cinko hialuronatas	12	10	2	63,9	14	2	9	1
Natrio hialuronatas	8	6	2	65,7	12	-	7	1

* A - arterijų; V - venų; M - mišri

Gydymas buvo numatytas tokiu būdu, kad iš anksto buvo atliekamas terapinis apdorojimas priklausomai nuo klinikinio opos būvio. Gydymas su cinko arba natrio hialuronatu, atitinkamai, buvo pradėtas ant apdorotų opų arba opų su žymiai sumažėjusiais randais. Gydymas buvo atliekamas kiekvieną dieną taip, kad vieną kartą per dieną ant opos pažeisto paviršiaus buvo užtepamas plonas drėkinančių žaizdą vaistų sluoksnis.

Junginys buvo naudojamas keturias savaites. Gydymo pradžioje ir po to kartą per savaitę buvo užpildomas gydymo rezultatų užrašų lapelis ir nufotografuojamos paciento opos pažeistos odos dalys. Buvo atliekama bakteriologinė pavyzdžio analizė.

Charakteristikos ir epitelio pažeidimo laipsnis buvo atžymėtas žemiau esančiais pažymėjimais ir užrašais.

Ivertinimas

Klinikinių - farmakologinių tyrimų rezultatai iliustruojami Fig. 2. Gydymo cinko hialuronatu rezultatai parodyti kreivėje, pažymėtoje kryžiuokais, o natrio hialuronatu - kreivėje, pažymėtoje kvadratėliais, kaip savačių, kurių metu buvo atliekamas gydymas, skaičiaus funkcija. Pažeidimo laipsnio dydis parodytas ordinatėje, kuri yra bendras pažeidimo rodiklis, skaičiuojamas pagal nurodytą aukščiau formulę.

Santykinių reikšmių kitimas buvo statistiškai įvertintas kaip savaičių skaičiaus⁶ (nuo 1 iki 4) funkcija. Gydant cinko ir natrio hialuronatu buvo ištirta opų, mažėjančių iki 90 %, 80 %, 70 %.

70 % ir 60 % nuo pažeidimo laipsnio santykinės reikšmės po 1, 2, 3, ir 4 savaitių, atitinkamai. Rezultatai susumuoti 1 lentelėje.

1 lentelė

Aktyvus kompozicijos komponentas	1 - oji savaitė		2 - oji savaitė		3 - oji savaitė		4 - oji savaitė	
	santykinės pažeidimo laipsnio reikšmės išplitimas							
	90 %		80 %		70 %		60 %	
	žem.	aukšč.	žem.	aukšč.	žem.	aukšč.	žem.	aukšč.
Cinko hialuronatas	12	2	11	3	11	3	11	3
Natrio hialuronatas	4	8	7	5	6	6	3	9

Pagal 1 lentelės duomenis gali būti nustatyta, kad gydymas cinko hialuronatu kiekvieną savaitę buvo efektyvesnis, lyginant su rezultatais, gautais su natrio hialuronatu, naudotu kaip kontrolinė medžiaga.

Statistinė gautų duomenų analizė parodė, kad cinko hialuronato junginio pranašumas buvo reikšmingas (99 %), lyginant su natrio hialuronatu.

Tolesniuose statistiniuose apibendrinimuose buvo detaliau ištirta pažeidimo laipsnio kaip gydymo laiko funkcijos santykinų reikšmių pasiskirstymas. Gauti rezultatai susumuoti 2 lentelėje.

2 lentelė

Aktyvus kompozicijos komponentas	Opos pažeidimo laipsnio skaičius ir reikšmė			
	daugiau 90 %	tarp 90 ir 70 %	tarp 70 ir 50 %	žemiau 50 %
1 savaitė				
Cinko hialuronatas	2	7	5	0
Natrio hialuronatas	8	3	0	1
2 savaitė				
Cinko hialuronatas	0	6	7	1
Natrio hialuronatas	4	3	5	0
3 savaitė				
Cinko hialuronatas	0	1	8	2
Natrio hialuronatas	2	5	5	1

4 savaitė				
Cinko hialuronatas	2	1	7	3
Natrio hialuronatas	1	5	3	3

2 lentelės duomenys taip pat patvirtina cinko hialuronato panaudojimo pranašumą. Detalesni statistiniai tyrimai rodo žymų pažeidimo laipsnio, priklausančio nuo gydymo laiko, sumažėjimą.

Išvada: įvertinant klinikinius - farmakologinius tyrimus, didelis cinko hialuronato panaudojimo efektyvumas gali būti įrodytas dargi nedideliu opų skaičiaus pavyzdžiu, šis pranašumas gali būti ypač išreikštas pradinėje gydymo stadijoje.

Išradimas detaliau iliustruojamas žemiau pateiktais neribojančiais pavyzdžiais.

Proteino kiekis hialuronate (HA) buvo nustatytas O. M. Lowry metodu (J. Biol. Chem. 193 (1951)); hialuronato klampumas išmatuotas Ostvaldo viskozimetru fiziologiniame druskos tirpale 25 °C temperatūroje. Charakteringo klampumo reikšmė, ekstrapoliuota į "0" koncentraciją, t. y. $[\eta]_{25^{\circ}\text{C}}^{c \rightarrow 0\%}$ pateikta žemiau. HA kiekis nurodytas Bitter metodu (Anal. Biochem. 4, 330 (1962)).

1 PAVYZDYS

Cinko hialuronato tirpalo pagaminimas

40,18 natrio hialuronato ištirpinama 20,0 ml dukart distiliuoto vandens. Tokiu būdu, pradinė hialurono rūgšties koncentracija sudaro 2,009 mg/ml, ekvivalentinė tirpalo koncentracija - $4,241 \cdot 10^{-3}$ mol/l (Na^+ arba hialurono rūgšties dimeras). Matavimų metu cinko chlorido 0,05154 mol/l koncentracijos tirpalas supilamas į reakcijos mišinį per mikrobiuretę. Iš pradžių tirpalas pridedamas mažomis porcijomis (0,05 ml), o po to didelėmis (nuo 0,1 iki 0,2 ml). Tirpalo potencialo kitimas matuojamas tiksliai skaitmeninę indikaciją turinčiu potenciometru, natriui selektyviu stiklo elektrodu ir sidabro/sidabro chlorido elektrodu. Titruojama tol, kol matuojamas potencialas nebekinta pridėjus kitą titravimo tirpalo porciją (matavimo sistema buvo sukalibruota sąlygose, analogiškose praktinio matavimo sąlygom).

Selektyvus jon-selektyvaus elektrodo veikimas buvo stebimas ir esant Zn^{2+} jonams tam, kad kontroliuoti potencialo kitimą praktiniuose matavimuose, kurį sukelia laisvi Na^+ jonai, o ne Zn^+ jonai, įdedami į tirpalą. Natrio chlorido $2,00 \cdot 10^{-3}$ M koncentracijos tirpalas buvo nutitruotas su cinko chlorido tirpalu analogiškais anksčiau aprašytais sąlygomis. Didėjant Zn^{2+} koncentracijai nuo 0 iki $4 \cdot 10^{-3}$ mol/l potencialo padidėjimas sudarė 2 mV, tuo tarpu

praktiniai matavimai analogiškėmis sąlygomis parodė potencialo pokytį apie 20 mV. Tokiu būdu įvertinimas nesudaro sunkumų. Matavimo eigoje natrio jonų aktyvumo padidėjimas, skaičiuojamas remiantis matavimų duomenimis, nurodo kiekybinį cinko asociato susidarymą.

Cinko chlorido tirpalo pagaminimas

Kadangi tirpalas, turintis tikslios koncentracijos cinko chloridą, negali būti gautas tiesiogiai atsveriant, iš pradžių gaunamas apytiksliai norimos koncentracijos tirpalas. Šio tirpalo pagaminimui nereikia naudoti rūgšties, todėl gali taip atsitikti, kad atsvertas cinko chloridas pilnai neištirps. Po netirpių nuosėdų sedimentacijos (apie 30 minučių) matavimo kolba pripildoma iki žymės ir tirpalas filtruojamas per filtravimo popierių.

Tiksli filtrato koncentracija nustatoma kompleksometrinio titravimo būdu, panaudojant buferį 10 ir eriochromo juodąjį T indikatorį. Tikslios koncentracijos 0,100 mol/l cinko chlorido tirpalas gaunamas skiedžiant šį tirpalą.

Natrio hialuronato, naudojamo tirpalo gavimui, charakteristikos:

Molekulinė masė	: 1850000
Proteino kiekis	: 0,07 sv. %
UV-absorbicija $A_{257}^{1\%}$	: 0,133
$A_{280}^{1\%}$	: 0,075
Klampumas $[\eta]_{25^{\circ}\text{C}}^{c \rightarrow 0\%}$	: 13,7 dl/g
HA* kiekis	: 98,12 sv. %

*HA - hialurono rūgštis (aukščiau nurodytas sutrumpinimas)

2 PAVYZDYS

Tirpalo dermatologiniams ir kosmetologiniams tikslams gavimas

12,5 ml 0,100 mol/l koncentracijos cinko chlorido tirpalo dejonizuotame vandenyje pridedama į 0,50 g atsverto hialuronato 100 ml matavimo kolboje (gali būti panaudotas kitos koncentracijos tirpalas, tačiau jo kiekis turi likti ankstesnis). Natrio hialuronatas palaikomas išbrinkinimui (12 valandų) tirpale, po to pripildo iki žymės vandeniu, kad gautų 0,5 sv./tūr. % cinko hialuronato tirpalą.

Natrio hialuronato, naudojamo anksčiau minėto tirpalo gavimui, charakteristikos.

Klampumas $[\eta]_{25^{\circ}\text{C}}^{c \rightarrow 0\%}$	: 16,5 dl/g
Proteino kiekis	: 0,8 sv. %

3 PAVYZDYS

Cinko hialuronato tirpalo, naudojamo injekcijų tirpalui, gavimas

Šiame pavyzdyje aprašytas procesas turi būti atliktas steriliose sąlygose.

0,5 ml 0,100 mol/l cinko chlorido tirpalą dukart distiliuotame vandenyje (vanduo injekcijoms, pirogeniniams preparatams, sterilus), pridedama į 0,20 g natrio hialuronato (gryni milteliai), atsverto 100 ml matavimo kolbutėje. Po to dukart distiliuotu vandeniu praskiedžiama iki 50 ml. Visą naktį natrio hialuronatas laikomas išbrinkimui, po to ištirpinamas purtant, ir tirpalas iki žymės praskiedžiamas dukart distiliuotu vandeniu. Gautas tirpalas nufiltruojamas pro membraninį filtrą (porų dydis 0,45 μm), gaunant 0,2 sv./tūr. % cinko hialuronato tirpalą.

Natrio hialuronato, naudojamo aukščiau nurodyto tirpalo gavimui, charakteristikos.

Kokybė	:	gryni, neturintys pirogeninių medžiagų, sterilūs milteliai
Molekulinė masė	:	1850000
Proteino kiekis	:	0,07 sv. %
UV-absorbcija $A_{257}^{1\%}$	:	0,133
$A_{280}^{1\%}$	:	0,075
HA kiekis	:	98,12 sv %
Klampumas $[\eta]_{25^{\circ}\text{C}}^{c \rightarrow 0\%}$	:	13,7 dl/g

4 PAVYZDYS

Cinko hialuronato, neturinčio laisvų jonų, gavimas

600 ml analizinio švarumo etanolio pridedama maišant į 200 ml 0,50 sv./tūr. % cinko hialuronato tirpalą, gautą pagal 2 pavyzdį. Nusodintas cinko hialuronatas nufiltruojamas per stiklo filtrą. Dukart praplaunama tos pačios kokybės etanolio, o po to džiovinama sumažinus slėgį. Tokiu būdu gaunama 0,88 g cinko hialuronato, kuris naudojamas 0,50 sv./tūr. % cinko hialuronato tirpalo gavimui pagal 2 pavyzdyje nurodytą būdą. Gautas cinko hialuronato tirpalas neturi natrio chlorido, susidarančio reakcijos tarp natrio hialuronato ir cinko chlorido rezultate, taigi, jis praktiškai neturi laisvų jonų.

5 PAVYZDYS

Cinko hialuronato arba jo tirpalo terapiniams tikslams, neturinčių laisvų jonų, gavimas

Šiame pavyzdyje aprašytas procesas atliekamas steriliomis sąlygomis.

1500 ml etanolio (aukščiausio švarumo) porcijomis maišant sudedama į 500 ml cinko hialuronato tirpalą, gautą pagal 3 pavyzdį. Sudėjus mišinys 30 minučių purtomas, nusodintas cinko hialuronatas nufiltruojamas per stiklo filtrą, tris kartus praplaunamas, naudojant iki 100

ml etanolio (aukščiausio švarumo) ir džiovinamas sumažinus slėgį steriliose ir švelniosiose sąlygose.

6 PAVYZDYS

Cinko hialuronato be laisvų jonų gavimas

200 ml 10 sv. % Hiamino^R 1622 (benzildimetil/-2-2-p-(1,1,3,3-tetrametilbutil)fenoksi/etoksi/etil/amonio chlorido) tirpalo maišant sudedama į tirpalą, turintį 1 g natrio hialuronato 400 ml dukart distiliuoto vandens. Susidarę nuosėdos, t. y. hialurono rūgšties ketvirtinio amonio asociatas, išskiriamos centrifuguojant, du kartus praplaunamas, naudojant po 100 ml distiliuotu vandens ir vėl centrifuguojama. Praplautos nuosėdos ištirpinamos tirpiklių mišinyje, susidedančiame iš 400 ml 2 sv./tūr. % cinko chlorido vandeninio tirpalo (pH nuo 5,0 iki 5,4) ir 400 ml n-butanolio. Palaikoma, kol susidaro dvi fazės; vandens sluoksnis, turintis ištirpintą cinko hialuronatą, nufiltruojamas per membraninį filtrą (porų dydis 0,45 μm), po to cinko hialuronatas nusodinamas pridedant tris tūr. dalis etanolio, nufiltruojamas per stiklo filtrą, praplaunamas etanolio ir džiovinamas azoto atmosferoje švelniomis sąlygomis, gaunant 0,82 g cinko hialuronato.

Esant būtinumui, 0,50 sv./tūr. % tirpalas gaunamas iš cinko hialuronato, kuris vėliau gryninamas 4 pavyzdyje nurodytu būdu.

Natrio hialuronato, naudojamo pradine medžiaga, charakteristikos:

Klampumas $[\eta]_{25^{\circ}\text{C}}^{c \rightarrow 0\%}$: 16,5 dl/g

Proteino kiekis : 0,18 sv. %

Cinko hialuronatas gali būti gaunamas aukščiau nurodytu būdu iš asociatų, sudarytų iš ketvirtinių amonio druskų. Būtinios šiam tikslui ketvirtinės druskos:

- karbotetradeciloksimetil-trimetilamonio chloridas (žr. Vengrijos patento Nr. 188.537 išradimo aprašymą),
- heksadecilpiridinio chloridas,
- cetilpiridinio chloridas,
- trimetilamonio chloridas ir panašūs junginiai.

7 PAVYZDYS

Kobalto hialuronato gavimas

Kobalto hialuronato gavimo būdas atitinka 6 pavyzdyje nurodytam, išskyrus, kad hialurono rūgšties ketvirtinio amonio asociatas ištirpinamas tirpiklių mišinyje, susidedančiame iš 2 sv./tūr. % vandeninio kobalto(II) chlorido $\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ tirpalo ir n-butanolio

8 PAVYZDYS

Vandeninio tirpalo, turinčio 0,50 sv./tūr. % cinko hialuronato, ir izotoninio tirpalo gavimas su cinko chloridu

Apie 50 ml 0,110 mol/l koncentracijos cinko chlorido tirpalo pridedama į 0,50 g natrio hialuronato 100 ml matavimo kolbutėje ir paliekama visai nakčiai išbrinkimui. Po to, natrio hialuronatas ištirpinamas purtant ir kolba užpildoma iki žymės 0,110 mol/l koncentracijos cinko chlorido tirpalu.

Gauto tirpalo osmoso slėgis yra ekvivalentiškas 0,149 mol/l NaCl tirpalo slėgiui, pH dydis lygus 5,0. Esant būtinumui, pH dydį padidinamas iki 5,5 - 5,6, pridėdant 2,00 ml 0,150 mol/l natrio acetato tirpalo. Pasiekus tam tikrą pH reikšmę, tirpalo osmoso slėgis tampa lygus 0,1489 mol/l koncentracijos NaCl tirpalo slėgiui.

Cinko hialuronato tirpalas gaunamas iš ypatingai švaraus natrio hialuronato, aprašyto 3 pavyzdyje, ir du kartus distiliuoto vandens steriliose sąlygose. Po to tirpalas filtruojamas per membraninį filtrą (porų dydis 0,45 μm).

Gautas tirpalas gali būti taip pat panaudotas kaip injekcijų medžiaga.

9 PAVYZDYS

Vandeninio tirpalo, turinčio 0,20 sv./tūr. % cinko hialuronato, ir izotoninio tirpalo su cinko chloridu gavimas

Galutiniam 100 ml tūriui gauti pasveriamas 0,20 g natrio hialuronato ir ištirpinama 0,120 mol/l koncentracijos cinko chlorido tirpale.

Cinko chloridas ištirpinamas ir 0,120 mol/l koncentracijos tirpalas gaunamas 1 pavyzdyje nurodytu būdu (keičiant cinko chlorido kiekius).

Tirpalo osmoso slėgis ekvivalentiškas 0,154 mol/l koncentracijos natrio chlorido tirpalo slėgiui; pH lygus nuo 5,3 iki 5,4.

HA kiekis	: 1,96 mg/ml
Klampumas	: 15,9 dl/g
Proteino kiekis	: 0,015 mg/ml
Tirpalo švarumas*	: $A_{660}^{1\text{cm}} = 0,015$

*Remiantis šviesos sugėrimo matavimu ties 660 nm, naudojant 1 cm kiuvetę

Tirpalas gaunamas su natrio hialuronatu, aprašytu 2 pavyzdyje, ir visų pirma, naudojamas kompozicijų, vartojamų dermatologijoje ir kosmetikoje, gamybai.

10 PAVYZDYS

Vandeninio tirpalo, turinčio 0,50 sv./tūr. % cinko hialuronato, ir izotoninio tirpalo su gliukoze gavimas

Tirpalas turi natrio hialuronatą ir paskaičiuotą ekvivalentinį cinko chlorido kiekį.

12,5 ml 0,100 mol/l koncentracijos natrio chlorido tirpalo pridedama į 0,50 g natrio hialuronatą, atsvertą 100 ml matavimo kolbutėje (gali būti panaudotas kitos koncentracijos cinko chlorido tirpalas, bet cinko chlorido turi būti tiek pat). Natrio hialuronatas laikomas 12 valandų išbrinkinimui cinko chlorido tirpale, praskiesto vandeniui iki 50 ml, po to purtant ištirpinama. Po to pridedama 24,5 ml 1,00 mol/l koncentracijos gliukozės tirpalo ir vandeniui praskiedžiama iki žymės.

Tirpalo osmoso slėgis ekvivalentiškas 0,1495 mol/l koncentracijos natrio chlorido tirpalo slėgiui; pH reikšmė lygi 5,4. Bendra cinko koncentracija = $1,25 \cdot 10^{-2}$ mol/l.

Tirpalas gaunamas su natrio hialuronatu, aprašytu 2 pavyzdyje, ir, visų pirma, naudojamas kompozicijų, vartojamų dermatologijoje ir kosmetikoje, pagaminimui.

11 PAVYZDYS

Vandeninio tirpalo, turinčio 0,20 sv./tūr. % cinko hialuronato, ir izotoninio tirpalo su gliukoze gavimas

Tirpalas turi natrio hialuronatą ir paskaičiuotą ekvivalentinį cinko chlorido kiekį.

5,0 ml 0,100 mol/l koncentracijos natrio chlorido tirpalo pridedama į 0,20 g natrio hialuronatą, atsvertą 100 ml matavimo kolbutėje, po to praskiedžiama dejonizuotu vandeniui iki 50 ml. Išbrinkinus natrio hialuronatą visą naktį, purtant ištirpinama, pridedama 27,0 ml 1,00 mol/l koncentracijos gliukozės tirpalo ir iki žymės kolba pripildoma vandeniui.

Tirpalo osmoso slėgis ekvivalentiškas 0,151 mol/l koncentracijos natrio chlorido tirpalo slėgiui; pH reikšmė lygi nuo 5,6 iki 5,7. Bendra cinko koncentracija = $5 \cdot 10^{-3}$ mol/l.

12 PAVYZDYS

Vandeninio tirpalo, turinčio 0,50 sv./tūr. % cinko hialuronato, ir izotoninio tirpalo su sorbitoliu gavimas

Cinko hialuronato tirpalas gaunamas steriliose sąlygose iš didelio švarumo natrio hialuronato, aprašyto 3 pavyzdyje, ir distiliuoto vandens. Tirpalas turi ekvivalentinį cinko chlorido kiekį, apskaičiuotą natrio hialuronatui.

Gavimo procesas realizuojamas 10 pavyzdyje nurodytu būdu, išskyrus tai, kad vietoj gliukozės į cinko hialuronato tirpalą pridedama 23,5 ml 1,00 mol/l koncentracijos sorbitolio tirpalo (182,19 g D-sorbitolio 1 litre).

Gautas tirpalas nufiltruojamas per membraninį filtrą (porų dydis 0,45 μm). Šis tirpalas gali būti panaudotas bet kokiems tikslams, išskyrus injekcijas.

Tirpalo osmoso slėgis ekvivalentiškas 0,1520 mol/l koncentracijos natrio chlorido tirpalo slėgiui; pH reikšmė lygi 5,5. Bendra cinko koncentracija = $1,25 \cdot 10^{-2}$ mol/l.

13 PAVYZDYS

Vandeninio tirpalo, turinčio 0,20 sv./tūr. % cinko hialuronato, ir izotoninio tirpalo su sorbitoliu gavimas

Tirpalas turi ekvivalentinį cinko chlorido kiekį, apskaičiuotą natrio hialuronatui.

Cinko hialuronato tirpalas gaunamas steriliose sąlygose iš didelio švarumo natrio hialuronato, kaip nurodyta 3 pavyzdyje, ir dukart distiliuoto vandens.

Gavimo procesas realizuojamas 12 pavyzdyje aprašytu būdu, išskyrus tai, kad 0,2 g natrio hialuronato ištirpinama 5 ml 0,100 mol/l koncentracijos cinko chlorido tirpale, po to pridedama 26,50 ml 1mol/l koncentracijos sorbitolio tirpalo ir praskiedžiama iki 100 ml. Gautas tirpalas nufiltruojamas per membraninį filtrą (porų dydis 0,45 μm). Šis tirpalas gali būti panaudotas įvairiais tikslais, išskyrus injekcijas.

Tirpalo osmoso slėgis ekvivalentiškas 0,1501 mol/l koncentracijos natrio chlorido tirpalo slėgiui; pH reikšmė lygi 5,6. Bendra cinko koncentracija = $5 \cdot 10^{-3}$ mol/l.

Hialuronato kiekis	: 2,03 mg/ml
Klampusumas	: 16,1 dl/h
Proteino kiekis	: 0,016 mg/ml
Tirpalo švarumas*	: $A_{660}^{1\text{cm}} = 0,010$

*Remiantis šviesos sugėrimo matavimu ties 660 nm, naudojant 1 cm kiuvetę

14 - 26 PAVYZDŽIAI

Šiuose pavyzdžiuose įvairių kompozicijų komponentai (farmacijai ir kosmetikai) pateikiami pagal mūsų parinktą receptūrą. Izotoninių cinko hialuronato tirpalų gavimas aprašytas aukščiau pateiktuose pavyzdžiuose. Čia terminas "distiliuotas vanduo injekcijoms" atitinka atitinka dukart distiliuotą steriliose sąlygose vandenį.

I. Injekciniai tirpalai

Medžiagos, pateiktos 14 - 17 pavyzdžiuose, naudojamos poodinėms injekcijoms, o 18 pavyzdyje - akių injekcijoms. 3 pavyzdyje aprašytas aktyvus komponentas naudojamas šiuose pavyzdžiuose.

14 PAVYZDYS

Aktyvus cinko hialuronato komponentas	2,0 mg
Sorbitolis	48,3 mg
Galutinis vandeninio tirpalo tūris, gautas su distiliuotu vandeniu injekcijoms	1,0 ml

15 PAVYZDYS

Aktyvus cinko hialuronato komponentas	5,0 mg
Sorbitolis	48,3 mg
Galutinis vandeninio tirpalo tūris, gautas su distiliuotu vandeniu injekcijoms	1,0 ml

16 PAVYZDYS

Aktyvus cinko hialuronato komponentas	2,0 mg
Propil-para-hidroksibenzoatas	0,05 mg
Metil-para-hidroksibenzoatas	0,5 mg
Gliukozė	48,6 mg
Galutinis vandeninio tirpalo tūris, gautas su distiliuotu vandeniu injekcijoms	1,0 ml

17 PAVYZDYS

Aktyvus cinko hialuronato komponentas	5,0 mg
Propil-para-hidroksibenzoatas	0,05 mg
Metil-para-hidroksibenzoatas	0,5 mg
Gliukozė	44,1 mg
Galutinis vandeninio tirpalo tūris, gautas su distiliuotu vandeniu injekcijoms	1,0 ml

18 PAVYZDYS

Aktyvus cinko hialuronato komponentas	10,0 mg
Kalio sorbatas	1,0 mg
Sorbitolis	41,0 mg
Galutinis vandeninio tirpalo tūris, gautas su distiliuotu vandeniu injekcijoms	1,0 ml

Medžiagos, pateiktos 19 - 28 pavyzdžiuose, pagrindu naudojamos dermatologijoje ir kosmetikoje. Šiuose pavyzdžiuose naudojamas 2 pavyzdyje pateiktas aktyvus komponentas.

II. Tirpalai vietiniam vartojimui

19 PAVYZDYS

Aktyvus cinko hialuronato komponentas	5,0 mg
Kalio sorbatas	1,0 mg
Natrio acetatas	24,6 mg
Galutinis vandeninio tirpalo injekcijoms, gauto su distiliuotu vandeniu, tūris	1,0 ml

20 PAVYZDYS

Aktyvus cinko hialuronato komponentas	2,0 mg
Kalio sorbatas	1,0 mg
Sorbitolis	48,3 mg
Galutinis vandeninio tirpalo injekcijoms, gauto su distiliuotu vandeniu, tūris	1,0 ml

III. Geliai vietiniam vartojimui

21 PAVYZDYS

Aktyvus cinko hialuronato komponentas	20,0 mg
Akrilo rūgšties polimerizatas	200 mg
Natrio hidroksidas (30 % koncentracijos)	50 mg
Kalio sorbatas	10 mg
Distiliuotas vanduo	iki 10,0 mg

22 PAVYZDYS

Aktyvus cinko hialuronato komponentas	20,0 mg
Akrilo rūgšties polimerizatas	200 mg
Natrio hidroksidas (30 % koncentracijos)	50 mg
Kalio sorbatas	10 mg
Distiliuotas vanduo	iki 10,0 mg

IV. Pastos ir tepalai vietiniam vartojimui

23 PAVYZDYS

Aktyvus cinko hialuronato komponentas	50 mg
---------------------------------------	-------

Kalio sorbatas	10 mg
Minkštas baltas vaškas	125 mg
Sorbitanoleatas	150 mg
Cetilo stearilo alkoholis	840 mg
Glicerinmonostearatas	110 mg
Propilenglikolis	475 mg
Distiliuotas vanduo	iki 10 g

24 PAVYZDYS

Aktyvus kobalto hialuronato komponentas	50 mg
Kalio sorbatas	10 mg
Minkštas baltas vaškas	125 mg
Sorbitanoleatas	150 mg
Cetilo stearilo alkoholis	840 mg
Glicerinmonostearatas	110 mg
Propilenglikolis	475 mg
Distiliuotas vanduo	iki 10 g

25 PAVYZDYS

Aktyvus cinko hialuronato komponentas	50 mg
2-fenoksietanolis	100 mg
Natrio laurilsulfatas	100 mg
Cetilpalmitatas	400 mg
Stearinas	400 mg
Stearilo alkoholis	450 mg
Cetilo alkoholis	450 mg
Baltas vazelinas	500 mg
Propilenglikolis	550 mg
Glicerinas	600 mg
Distiliuotas vanduo	iki 10,0 g

26 PAVYZDYS

Aktyvus kobalto hialuronato komponentas	50 mg
2-fenoksietanolis	100 mg
Natrio laurilsulfatas	100 mg
Cetilpalmitatas	400 mg

Stearinas	400 mg
Stearilo alkoholis	450 mg
Cetilo alkoholis	450 mg
Baltas vazelinas	500 mg
Propilenglikolis	550 mg
Glicerinas	600 mg
Distiliuotas vanduo	iki 10 g

27 PAVYZDYS

Aktyvus cinko hialuronato komponentas	50,0 mg
Mikrokristalinis parafinas	250 mg
Propilenglikolis	500 mg
Sorbitolis	400 mg
Gyvulinis vaškas (acetilintas)	500 mg
Baltas vazelinas	iki 10 g

V. Kompozicijos dezinfekcijai ir pūliuojančių žaizdų bei nudegimų surandėjimui**28 PAVYZDYS**

Aktyvus cinko hialuronato komponentas	10 mg
Kalio sorbatas	1,0 mg
Hidrofilinis koloidinis silicio dioksidas	50 mg
Sorbitolis	iki 1 g

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Kompozicijos gavimo būdas, sumaišant aktyvų komponentą su įprastais priedais ir/arba nešikliais, besiskiriantis tuo, kad kaip aktyvus komponentas naudojamas deprotonuotos hialurono rūgšties asociatas su periodinės lentelės ketvirto periodo 3d metalo jonais.
2. Kompozicijos gavimo būdas pagal 1 punktą, besiskiriantis tuo, kad aktyvus komponentas yra deprotonuotos hialurono rūgšties asociatas su cinko jonais.
3. Kompozicijos gavimo būdas pagal 1 punktą, besiskiriantis tuo, kad aktyvus komponentas yra deprotonuotos hialurono rūgšties asociatas su kobalto jonais.

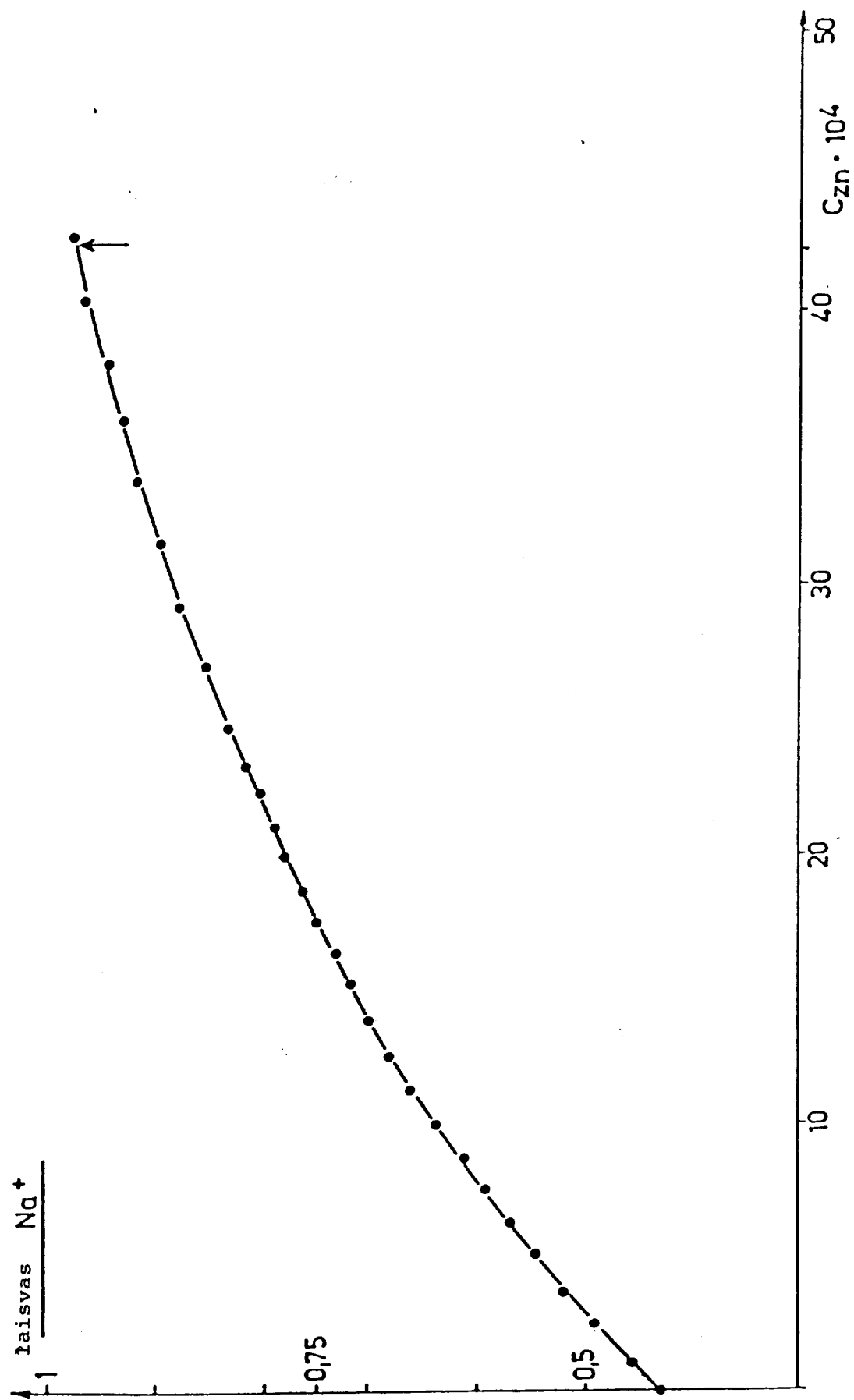


Fig.1

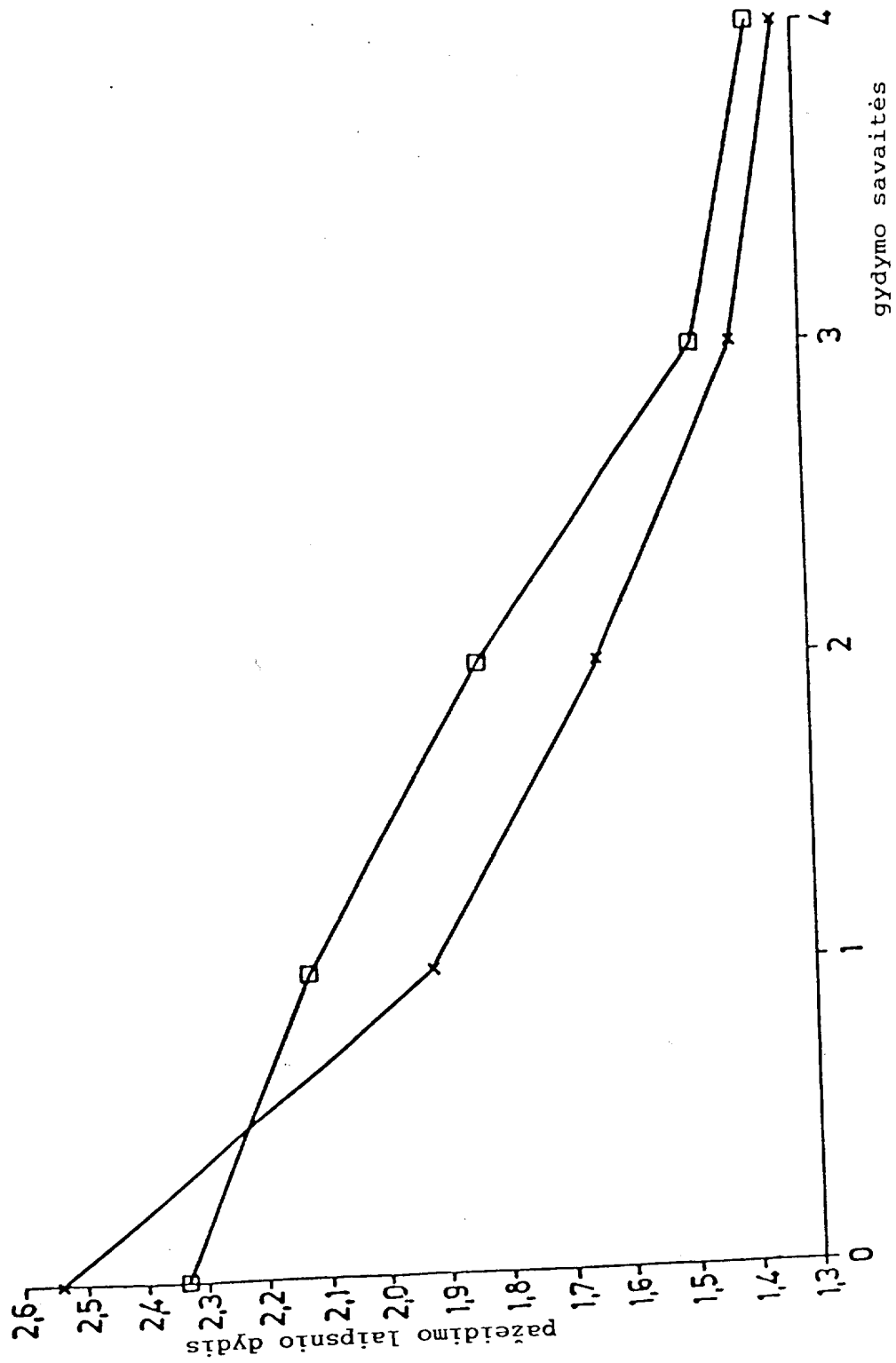


Fig.2

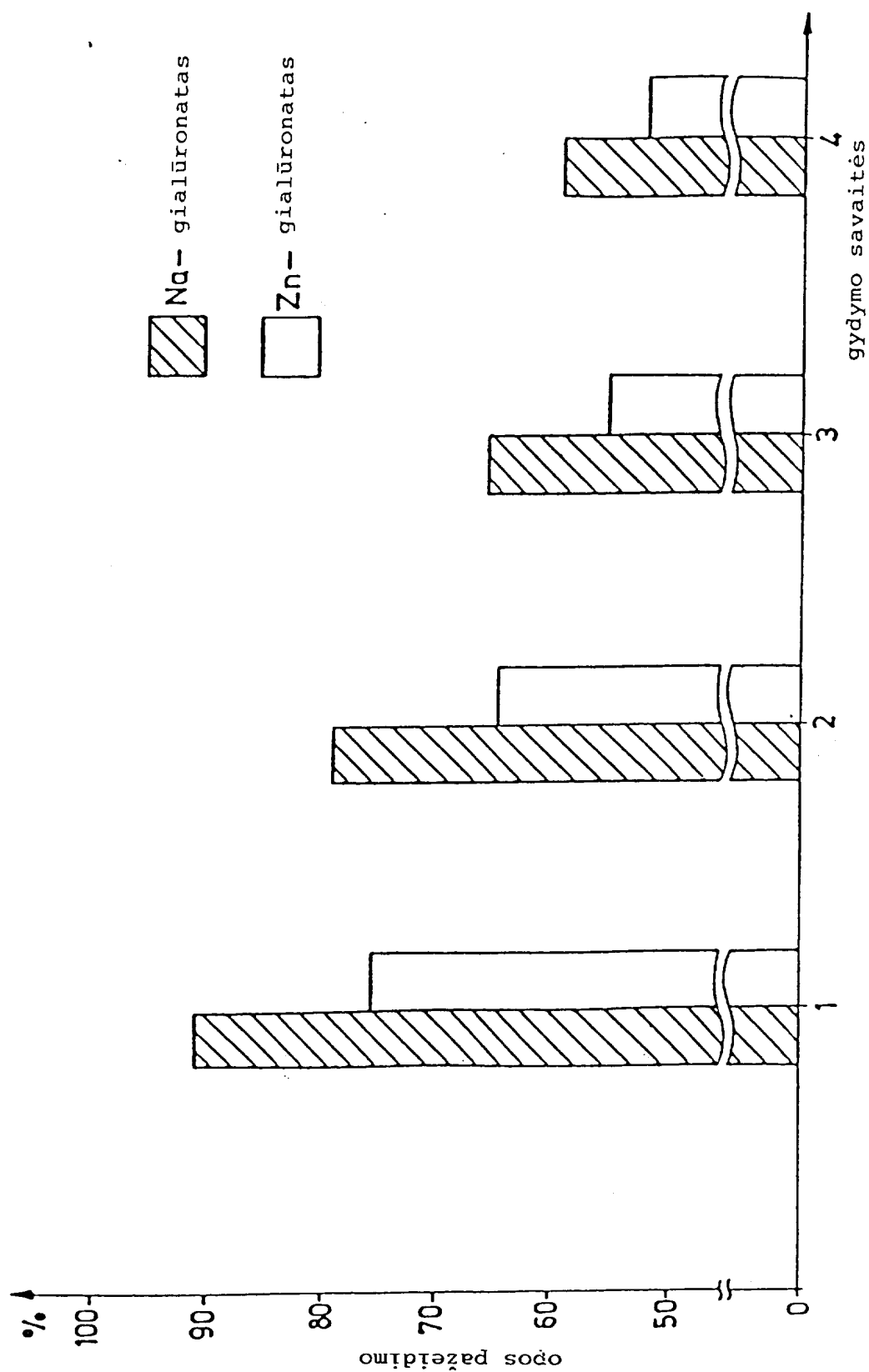


Fig.3