

PATENTOVÝ SPIS

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLového
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2010-909**
(22) Přihlášeno: **08.12.2010**
(40) Zveřejněno: **27.06.2012**
(Věstník č. 26/2012)
(47) Uděleno: **12.09.2012**
(24) Oznámení o udělení ve Věstníku: **24.10.2012**
(Věstník č. 43/2012)

(11) Číslo dokumentu:

303 500

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

A61L 15/28 (2006.01)
A61L 15/44 (2006.01)
C08B 37/00 (2006.01)
C08L 5/00 (2006.01)

(56) Relevantní dokumenty:

WO 9628476 A; SK 285346 B; TW 265814; EP 0908108 A; US 4562020 B.
Huang a Yang (2008); Int. J. Pharm. 346, 38-46; abstract. PMID 17662545; Tejinder (2003) Cereal Chem. 80, 728-731; abstract pub. no C-2003-1003-03R.

(73) Majitel patentu:

Vysoká škola chemicko technologická v Praze, Praha 6,
CZ

(72) Puvodec:

Novák Miroslav Ing. CSc., Praha 9, CZ
Čopíková Jana Prof. Ing. CSc., Praha 9, CZ
Blahovec Jiří Prof. Ing. RNDr. DrSc., Praha 4, CZ

(54) Název vynálezu:

**Příprava polysacharidové fólie s
imunomodulačními účinky, obsahující beta-(1→
3), (1→6)-D-glukan**

(57) Anotace:

Řešení se týká způsobu přípravy fólií na bázi nativního, předem nesusušeného β -(1→3), (1→6)-D-glukanu z buněčných stěn makromycet a mikromycet, s výhodou *Saccharomyces cerevisiae*, případně doplněných o další léčivé složky a alternativně spojených s dalšími obvazovými materiály, které slouží jako hojivý a krycí prostředek při ošetřování ran, zanícených tkání, popálenin a dalších poškození, případně jako kosmetické prostředky.

CZ 303500 B6

Příprava polysacharidové fólie s imunomodulačními účinky, obsahující β -(1 $\rightarrow$ 3), (1 $\rightarrow$ 6)-D-glukan

5 Oblast techniky

Technickým řešením je způsob přípravy polysacharidové fólie, obsahující nerozpustný (partikulární) β -(1 $\rightarrow$ 3), (1 $\rightarrow$ 6)-D-glukan, získaný z buněčných stěn makromycet a mikromycet, s výhodou ze stěn *Saccharomyces cerevisiae*, která může být použita jako hojivý a krycí prostředek při ošetřování ran, zanícených tkání a popálenin.

Dosavadní stav techniky

15 Je známo, že určité polysacharidy, izolované z různých přírodních zdrojů, především vyšších i nižších hub, modulují nespecifické mechanismy imunitního systému u živočichů, včetně člověka. Z farmakologického hlediska lze tyto látky zařadit do skupiny modifikátorů biologické odpovědi (biological response modifiers, BRM). Mezi nejúčinnější modifikátory biologické odpovědi s pozitivním, immunostimulačním účinkem náleží polymery glukózy – větvené β -(1 $\rightarrow$ 3),
20 (1 $\rightarrow$ 6)-D-glukany, obvykle jednodušeji označované jako β -glukany. Immunomodulační účinek β -glukanů spočívá především v aktivaci profesionálních fagocytů – granulocytů, monocytů, dendritických buněk a především makrofágů (DiLuzio N. R., *Trends Pharmacol. Sci* 4, 344 (1983); Chihara G., Maeda Y. Y., Hamuro J., *Int. J. Tissue Reac.* IV, 207 (1982); Bohn J. A., BeMiller J. N., *Carbohydr. Polym.* 28, 3 (1995); Novák M., *Chem. listy* 101, 872 (2007); Novák M., Větvicka V., *J. Immunotoxicol.* 5, 47 (2008)).

Takovéto účinky vykazují β -glukany nejen při vnitřním, ale i při zevním použití. Byly popsány pozitivní účinky β -glukanu na hojení popálenin, rozsáhlých poranění, otevřených zlomenin a bércových vředů (Leibovich S. J. and Danon D., *J. Reticuloendothel. Soc.* 27, 1 (1978);
30 Wolk M., Danon D., *Med. Biol.* 63, 73 (1985); Sang Bong Lee, *etal. Biomaterials* 24, 2503 (2003). Je znám rovněž příznivý účinek β -glukanu na biosyntézu kolagenu při hojení ran různého původu (Portera C. A., *etal., Amer. Surgeon* 63, 125 (1997); Hida Shunsuke *etal. Microbiol. Immunol.* 50, 453 (2006)).

35 V odborné i patentové literatuře jsou popsány fólie sloužící jako kryty ran, připravené z různých β -glukanů, často i v kombinaci s dalšími látkami (želatinou, kolagenem, polyvinylalkoholem ad., např. Delatte S. J., *etal., J. Pediatr. Surg.* 36, 113 (2001); Sang Bong Lee *etal. Biomaterials* 24, 2503 (2003); Mei-Hua Huang a Ming-Chien Yang, *Internat. J. Pharmaceut.* 346, 38 (2008); Williams J. M., Lawin T. P., U.S. patent 5676967 a řada dalších).

40 Publikované práce a patenty vycházejí nejčastěji z cereálních β -glukanů, případně z vodorozpustných fungálních β -glukanů. Cereální β -glukany, izolované nejčastěji z ovesa nebo ječmene, a fungální β -glukany, izolované z mikromycet (např. ze *Saccharomyces cerevisiae*) nebo vyšších hub (např. z *Lentinula edodes*, *Pleurotus ostreatus* ad.), se liší svojí primární strukturou: biologicky účinné cereální β -glukany jsou lineární β -(1 $\rightarrow$ 3), (1 $\rightarrow$ 4)-D-glukany, zatímco fungální
45 jsou větvené β -(1 $\rightarrow$ 3), (1 $\rightarrow$ 6)-D-glukany. Vodorozpustnost fungálních β -glukanů je nepřímě úměrná velikosti molekuly. Na základě četných prací (např. Bohn J. A., BeMiller J. N., *Carbohydr. Polym.* 28, 3 (1995); Bell S., *etal., Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 39, 189 (1999); Volman J. J., Ramakers J. D., Plat J., *Physiol. Behav.* 94 276 (2008)) je známo, že vyšší biologickou účinnost
50 mají (1) β -glukany s větší molekulou (a tedy nerozpustné ve vodě), a (2) díky svojí struktuře fungální β -glukany ve srovnání s cereálními je β -glukan, izolovaný z buněčných stěn kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*.

Kromě zdroje β -glukanu má na jeho biologickou účinnost i způsob přípravy, který ovlivňuje jeho fyzikálně-chemické i biologické vlastnosti. Z řady prací (viz např. review Bohn J. A., BeMiller J. N., *Carbohydr. Polym.* **28**, 3 (1995)) je známo, že na biologický účinek β -glukanu má podstatnou měrou vliv jeho konformace, tedy uspořádání polymerní molekuly do jednoduchého nebo trojitěho helixu, případně do amorfni formy. Maximální účinek vykazuje konformace trojitěho helixu; tato forma β -glukanu má vysoký stupeň krystalinity. Na přítomnost té či oné konformace v preparátu β -glukanu má podstatný vliv způsob přípravy β -glukanu, zejména finální fáze přípravy, sušení (lísková nebo sprejová sušárna, lyofilizace apod.); to je obecný závěr, platný i pro řadu dalších biologicky aktivních polysacharidů. Je popsáno, že sušení při teplotách nad 90 °C působí pokles biologického účinku, a kromě toho snižuje elasticitu a viskozitu oproti nativnímu polysacharidu (Ginzberg A., Korin E., Arad S., *Biotechnol. Bioeng.* **99**, 411 (2007)). Zřejmou příčinou je doložená skutečnost, že vysoká teplota při sušení (90 až 140 °C) vede k nevratným změnám trojhelixové konformace na konformaci jednovláknového ohebného řetězce (Wang X., Zhang Y., Zhang L., Ding Y., *J. Phys. Chem. B* **113**, 9915 (2009)).

V publikovaných odborných pracích a patentech, týkajících se přípravy fólií s β -glukanem a používaných jako krytu ran, se uvádí, že β -glukan byl zakoupen od určité firmy, zabývající se výrobou β -glukanu ve velkém. Je zřejmé, že se jednalo o sušený β -glukan, neboť výrobci nedistribuuji jinou formu. Pro použití k přípravě fólie musí být tento produkt znovu rehydratován, ovšem rehydratace jednou usušeného β -glukanu ale nevede k obnovení původní krystalinity, ani stupně homogenity molekulární konformace, které vykazoval původní, nativní β -glukan (Kobayashi K., Kimura S., Togawa E., Wada M., Kuga S., *Carbohydr. Polym.* **80**, 491 (2010)). Z toho vyplývá, že používání sušeného komerčního β -glukanu pro přípravu fólií vede ke snížení jeho biologické účinnosti a léčivé kvality z něho připravovaných krytů ran. Navíc se v důsledku změn makroskopické struktury sušeného preparátu v důsledku nedostatečné homogenity výchozí suspenze nebo naopak agregace částic se mění k horšímu i makrostruktura fólií, kvalita jejich povrchu a následně i jejich mechanická pevnost.

Podstata vynálezu

Podstatou předkládané přihlášky vynálezu je způsob přípravy zevní aplikační formy β -glukanu ve formě fólií, který minimalizuje až eliminuje nedostatky dosud užívaných postupů přípravy takovýchto fólií tím, že fólie jsou připraveny z nativního, předem nesusušeného nerozpustného (partikulárního) β -(1 $\rightarrow$ 3), (1 $\rightarrow$ 6)-D-glukanu, získaného z buněčných stěn makromycet nebo mikromycet. Vhodným a výhodným výchozím materiálem jsou buněčné stěny kulturních kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*. β -Glukan, připravený ze stěn *Saccharomyces cerevisiae* má vysokou biologickou aktivitu a není třeba se obávat jeho kontaminace mykotoxiny. K přípravě nativního β -glukanu ze stěn *S. cerevisiae* lze použít různé, v podstatě ekvivalentní metody, které jsou vesměs založeny na alkalické digesti komerčního pekařského droždí, např. popsané v pracích Bell D. J. a Northcote D. H., *J. Chem. Soc.* 1944-7 (1950), Bacon J. S. D., Farmer V. C., Jones D., Taylor I. F., *Biochem. J.* **114**, 557-567 (1969) nebo Misaki A., Johnson J., Kirkwood S., Scaletti J. V., Smith F., *Carbohydr. Res.* **6** 150-164 (1968).

Fólie se připraví tím, že se suspenze nativního, předem nesusušeného β -(1 $\rightarrow$ 3), (1 $\rightarrow$ 6)-D-glukanu, získaného z různých mikromycet nebo makromycet, přímo bez předcházející dehydratace (sprejové sušení, lyofilizace apod., smísí s přísadkou látek, zvyšujících pružnost, ohebnost, pevnost a prodyšnost fólií, vybraných ze skupiny látek tvořené glycerolem, sorbitolem, propylenglykolem, polyakrylátovými gely, tragantem, arabskou gumou, pektiny, sodnou solí karboxymethylcelulózy, estery sorbitanu s vyššími mastnými kyselinami atd. v množství 1 až 70 % hmotn., vztaženo na hmotnost β -glukanu, směs se nalije na ohraničený inertní povrch, přičemž množství glukanu v suspenzi je 1 až 20 mg.cm⁻² inertního povrchu a posléze se suspenze vysuší při teplotě 10 až 60 °C, například v horkovzdušné sušárně.

β-Glukan ve fólii může být případně dále smíšen kromě zmíněných látek s léčivými, kterými mohou být lokální antibiotika (např. erytromycin, clindamycin, neomycin, bacitracin aj.), chemoterapeutika (především sulfonamidy), lokální antimykotika (např. clotrimazol, nystatin, pimaricin, terbinafin) a další účinné látky, volené podle účelu použití fólií, v takovém množství, aby se docílilo jejich účinné lokální koncentrace podle příslušných doporučení Státního ústavu pro kontrolu léčiv.

Přehled obrázků na výkrese

Obr. 1 snímek z elektronového mikroskopu zobrazuje fólii připravenou ze směsi 50 % hmotn. rehydratovaného, β-glukanu a 50 % hmotn. želatiny.

Obr. 2 snímek z elektronového mikroskopu zobrazuje fólii připravenou ze směsi 50 % hmotn. nativního β-glukanu a 50 % hmotn. želatiny.

Obr. 3 snímek z konfokálního mikroskopu zobrazuje fólii připravenou ze směsi 50 % hmotn. rehydratovaného, β-glukanu a 50 % hmotn. želatiny.

Obr. 4 snímek z konfokálního mikroskopu zobrazuje fólii připravenou ze směsi 50 % hmotn. nativního β-glukanu a 50 % hmotn. želatiny.

Příklady provedení

Příklad 1

Do suspenze obsahující 100 g nativního, předem nesusušeného β-(1→3), (1→6)-D-glukanu, připraveného z intaktních buněk *Saccharomyces cerevisiae* alkalickou digescí, nejprve za normální teploty a poté za desetiminutového varu, neutralizací a několikanásobným promytím vodou, se přidá 50 g chemicky čistého glycerolu a dokonale se promíchá. Poté se směs vylije na vhodnou podložku s plochou takovou, aby konečná plošná hustota fólie byla 20 mg.cm⁻². Vše se umístí do sušárny a usuší při teplotě nepřevyšující 50 °C. Hotová fólie se opatrně sejme a rozdělí na díly potřebné velikosti.

Příklad 2

Obdobným způsobem jako v příkladu 1, byly získány fólie připravené ze směsi 50 % hmotn. nativního β-glukanu a 50 % hmotn. želatiny a fólie připravené ze směsi 50 % hmotn. rehydratovaného předem usušeného β-glukanu a 50 % hmotn. želatiny. Získané fólie z nativního β-glukanu jsou homogenní a jejich povrch je relativně vysoce hladký. To dokládají snímky fólií připravených ze směsi 50 % hmotn. nativního β-glukanu a 50 % hmotn. želatiny v elektronovém (obr. 2) a konfokálním mikroskopu (obr. 4). Snímky z elektronového mikroskopu (obr. 1) a konfokálního mikroskopu (obr. 3) zobrazují fólie připravené ze směsi 50 % hmotn. rehydratovaného, β-glukanu a 50 % hmotn. želatiny (rozměry výřezů resp. zvětšení jsou uvedeny na snímcích). Ze snímků je patrná podstatně hrubší a nehomogenní struktura fólií, připravených z rehydratovaného, sušeného β-glukanu oproti fóliím připraveným z nativního glukanu.

Příklad 3

5 50 % g nativního, předem nesusušeného β -(1 $\rightarrow$ 3), (1 $\rightarrow$ 6)-D-glukanu, připraveného podle Příkladu 1, se smísí s 20 g chemicky čistého glycerolu a 5 g polyoxyethylen-(20) sorbitanmonolaurátu, promísí a zpracuje stejně jako v Příkladu 1 s tím, že plošná hustota fólie se upraví na 5 mg.cm⁻².

Příklad 4

10

K suspenzi, připravené podle Příkladu 1 se přidá 1 g 4-aminobenzensulfonamidu a po promíchání a rozpuštění se postupuje jako v Příkladu 1.

15

Příklad 5

K suspenzi, připravené podle Příkladu 1 se přidá 1 % hmotn. klindamycinu (jako Clindamyciniphosphas) a po promíchání a rozpuštění se postupuje jako v Příkladu 1.

20

Příklad 6

25 Fólie, připravená způsobem podle Příkladu 1, 3, 4 nebo 5 se vloží na navlhčenou hydrofilní gázu a společně se usuší při teplotě do 50 °C tak, aby vznikl dvojvrstvý obvazový materiál, který se poté upraví na vhodnou velikost, neprodyšně uzavře ve vhodném obalu a vysterylizuje ozářením.

Průmyslová využitelnost

30

Fólie, díky imunomodulačním účinkům daným obsahem β -(1 $\rightarrow$ 3), (1 $\rightarrow$ 6)-D-glukanu a případně hojivým účinkům, daným dalšími obsaženými léčivými látkami, může sloužit jako zevní hojivý a krycí prostředek při ošetřování ran, zanícených tkání, popálenin a dalších poškození. V modifikované podobě může být využita rovněž v kosmetice, například jako plet'ová maska.

35

PATENTOVÉ NÁROKY

40

1. Příprava polysacharidové fólie s imunomodulačními účinky, **vyznačující se tím**, že se suspenze obsahující nativní, předem nesusušený β -(1 $\rightarrow$ 3), (1 $\rightarrow$ 6)-D-glukan, smísí s přidavkem látek, zvyšujících pružnost, ohebnost, pevnost a prodyšnost fólií vybraných ze skupiny tvořené glycerolem, sorbitolem, propylenglykolem, polyakrylátovými gely, tragantem, arabskou gumou, želatinou, kolagenem, pektiny, alkalickými solemi karboxymethylcelulózy, estery sorbitanu s vyššími mastnými kyselinami, v množství 1 až 70 % hmotn. (vztaženo na hmotnost β -glukanu), směs se nalije na ohraničený inertní povrch, přičemž množství glukanu v suspenzi je 1 až 20 mg.cm⁻² inertního povrchu a posléze se suspenze vysuší při teplotě 10 až 110 °C.

45

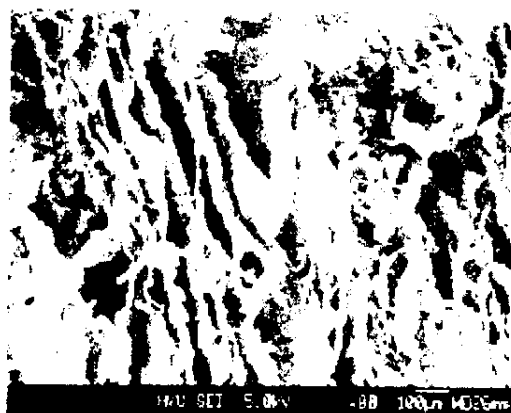
2. Příprava podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že nativní, předem nesusušený β -(1 $\rightarrow$ 3), (1 $\rightarrow$ 6)-D-glukan se získá z buněčných stěn kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*.

3. Příprava podle nároků 1 a 2, **vyznačující se tím**, že se suspenze vhodným způsobem vysuší, například v horkovzdušné sušárně s kontrolovanou teplotou.

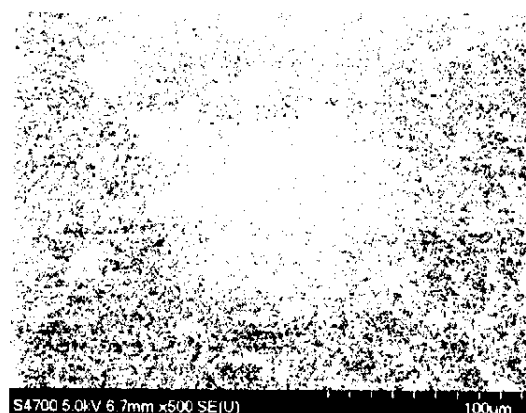
4. Příprava podle nároků 1 a 2, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že se suspenze nativního β -glukanu smísí s dalšími lokálně působícími farmakologicky účinnými látkami, kterými mohou například být lokální antibiotika, chemoterapeutika, lokální antimykotika a další účinné látky, volené podle účelu použití fólií, v takovém množství, aby se docílilo jejich účinné lokální koncentrace.

5. Příprava podle nároků 1 a 2, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že se připravená fólie kombinuje s dalšími obvazovými materiály vybranými ze skupiny tvořené tkanými, netkanými obvazy, kompresy nebo tampony.

1 výkres



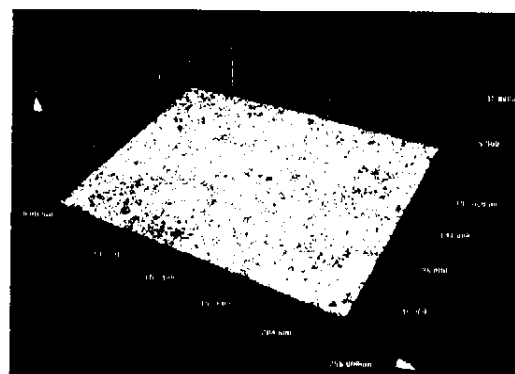
Obr. 1



Obr. 2



Obr. 3



Obr. 4

Konec dokumentu
