

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10) **PL 243151 B1**

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **430456**

(22) Data zgłoszenia: **2019.07.01**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2021.01.11 BUP 01/2021**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2023.07.10 WUP 28/2023**

(51) MKP:

A61L 27/20 (2006.01)

A61L 27/52 (2006.01)

A61L 27/60 (2006.01)

(73) Uprawniony z patentu:

**UNIwersytet Medyczny w Lublinie,
Lublin, PL**

(72) Twórca(-y) wynalazku:

AGATA PRZEKORA-KUŚMIERZ, Lublin, PL

VLADYSLAV VIVCHARENKO, Lublin, PL

PAULINA KAZIMIERCZAK,

Kolonia Miłoszewice, PL

MICHAŁ WÓJCIK, Ożarów, PL

(74) Pełnomocnik:

Anna Bełz, Lublin, PL

(54) Tytuł:

Hydrożelowy substytut skóry na bazie chitozanu oraz sposób jego wytwarzania

PL 243151 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest hydrożelowy substytut skóry na bazie chitozanu stanowiący bioaktywny preparat do zastosowań w medycynie regeneracyjnej oraz sposób jego wytwarzania.

Substytuty skóry to niejednorodna grupa materiałów wykorzystywanych do pokrywania powierzchni rany w celu zapewnienia przejściowego lub trwałego fizjologicznego zamknięcia rany, w tym ochronę przed urazami mechanicznymi, kolonizacją bakterii oraz zapewnienia wilgotnego środowiska rany. Optymalny substytut skóry powinien posiadać następujące cechy: chronić przed infekcjami, zapewniać odpowiednią wilgotność, nie uczulać oraz nie wywoływać stanu zapalnego, powinien być poręczny i elastyczny w celu dopasowania się do nieregularnych powierzchni rany oraz posiadać długi okres trwałości. Niemniej jednak, do tej pory nie opracowano idealnego substytutu skóry, który spełniałby wszystkie wymienione powyżej funkcje (Halim i wsp., Indian journal of plastic surgery: official publication of the Association of Plastic Surgeons of India, 2010, 43:23–28).

Naturalne polisacharydy znajdują szerokie zastosowanie w inżynierii biomateriałów oraz w medycynie regeneracyjnej, co przede wszystkim wynika z ich cennych właściwości oraz szerokiej dostępności. Do powszechnie używanych naturalnych polimerów należy chitozan, który charakteryzuje się biokompatybilnością, biodegradowalnością, hydrofilnością, brakiem toksyczności oraz właściwościami przeciwbakteryjnymi (Jayakumar i wsp., Biotechnology Advances, 2011, 29(3):322–37). Wynalazek rozwiązuje zagadnienie otrzymywania hydrożelowego, cienkiego, elastycznego substytutu skóry, który będzie zapewniał przejściowe fizjologiczne zaniknięcie rany, ochronę przed wnikaniem patogenów oraz przyspieszoną regenerację lub rekonstrukcję skóry w przypadku wcześniejszego zasiedlenia materiału komórkami pacjenta.

Celem wynalazku jest otrzymanie bioaktywnego substytutu skóry na bazie chitozanu i kurdlanu, który – ze względu na cenne właściwości biologiczne wchodzących w jego skład polisacharydów – będzie zapewniał fizjologiczne zamknięcie rany oraz przyspieszał proces regeneracji uszkodzonej tkanki.

Dotychczas nie został opracowany substytut skóry składający się z chitozanu oraz kurdlanu (bakteryjnego β -1,3-glukanu). W dostępnej literaturze naukowej z zakresu medycyny regeneracyjnej istnieją wyłącznie doniesienia opisujące zastosowanie chitozanu i β -glukanu (pochodzenia innego niż bakteryjne) do produkcji materiałów opatrunkowych.

Z czeskiego opisu patentu nr CZ2007683 (A3) znany jest sposób otrzymywania kompleksu chitozan-schizofylan (grzybowy β -1,3-D-glukan) lub jego soli, występujących samodzielnie lub w połączeniu z jednym lub większą liczbą innych naturalnych polisacharydów, do zastosowań jako preparat do przyspieszania gojenia się ran oraz zapobiegania przywierania bandaża do rany. Sposób otrzymywania charakteryzuje się tym, że chitozan i schizofylan oraz środek antyseptyczny rozprowadza się w sterylnej wodzie i następnie poddaje suszeniu na powietrzu lub zamrożeniu i liofilizacji.

Z czeskiego opisu patentu nr CZ201398 (A3) znany jest sposób otrzymywania włókien oraz osłony na rany składających się z kompleksu chityny/chitozan-schizofylan (grzybowy β -1,3-D-glukan). Sposób otrzymywania charakteryzuje się tym, że kompleks chityna/chitozan-schizofylan rozpuszcza się w zasadzie sodowej i moczniku lub w mieszaninie N,N-dimetyloacetamidu i chlorku litu, po czym następuje ich wirowanie w mieszaninie alkoholu i kwasu.

Z francuskiego opisu patentu nr FR2843972 (A1) znany jest sposób otrzymywania substytutu skóry na bazie matrycy chitozanowej zasiedlonej fibroblastami i/lub keratynocytami do zastosowań jako bioaktywny opatrunek komórkowy do leczenia ran przewlekłych, ostrych oraz do zastosowań w testach *in vitro* w toksykologii. Metoda otrzymywania substytutu skóry polega na przygotowaniu roztworu chitozanu w kwasie maleinowym lub w innym kwasie z dodatkiem lub bez dodatku alkoholu poliwinylowego, glicerolu, środka porogennego (chlorek sodu, glukoza, sacharoza), a następnie suszeniu lub liofilizacji oraz stabilizacji otrzymanej matrycy w roztworze zasadowym, płukaniu w wodnym roztworze izopropanolu, w PBS i/lub w pożywce hodowlanej, a następnie hodowli komórkowej *in vitro* na matrycy chitozanowej.

Znany jest sposób otrzymywania powłoki składającej się z chitozanu i β -(1,3-1,6)-glukanu pochodzenia drożdżowego do zastosowań w leczeniu ran. Metoda otrzymywania polega na rozprowadzeniu chitozanu w roztworze wodnym β -glukanu, a następnie żelowaniu β -glukanu w kwasie octowym i suszeniu w temperaturze pokojowej (Kofuji i wsp., Reactive and Functional Polymers, 2010, 70(10):784–89).

Przedmiotem wynalazku jest bioaktywny substytut skóry zbudowany z chitozanu oraz kurdlanu, rozprowadzonych w 0,5–3% (v/v) wodnym roztworze kwasu octowego, przy czym proporcje wagowe

komponentów wynoszą odpowiednio 0,5–4% (w/v) chitozanu oraz 2–15% (w/v) kurdlanu w odniesieniu do kwasu octowego.

Korzystnie, gdy chitozan występuje w ilości 2% (w/v) w odniesieniu do kwasu octowego.

Korzystnie, gdy kurdlan występuje w ilości 5–8% (w/v) w odniesieniu do kwasu octowego.

Sposób wytwarzania bioaktywnego substytutu skóry według wynalazku polega na tym, że przygotowuje się mieszaninę zawierającą 0,5–4% korzystnie 2% (w/v) chitozanu oraz 2–15% korzystnie 5–8% (w/v) kurdlanu w 0,5–3% (v/v) wodnym roztworze kwasu octowego, korzystnie 1% (v/v), a następnie mieszaninę rozprowadza się w postaci cienkiej 0,5–2 mm warstwy na powierzchni formy, którą inkubuje się w łaźni wodnej w temperaturze 90–95°C, korzystnie 95°C, przez 15–30 minut, korzystnie 20 minut, a następnie studzi w temperaturze 4–8°C, po czym ostudzoną próbkę umieszcza się w 1% (w/v) wodnym roztworze zasady sodowej na okres 10–20 minut, a następnie po wyjęciu materiału z roztworu zasady sodowej, płucze się w wodzie dejonizowanej korzystnie trzykrotnie, a następnie próbkę suszy się w temperaturze pokojowej.

Zaletą opracowanego według wynalazku sposobu wytwarzania bioaktywnego substytutu skóry jest otrzymanie biokompatybilnego biomateriału w formie cienkiego, elastycznego, chłonnego, hydrożelowego filmu, który charakteryzuje się brakiem toksyczności w stosunku do komórek eukariotycznych. Ponadto powierzchnia materiału sprzyja adhezji i proliferacji fibroblastów skóry, keratynocytów i mezenchymalnych komórek macierzystych. Biomateriał sprzyja również tworzeniu macierzy zewnątrzkomórkowej, w tym włókien kolagenowych, co przyczynia się do przyspieszenia procesu odbudowy zranionej tkanki. Bioaktywny substytut skóry według wynalazku będzie zapewniał fizjologiczne zamknięcie rany chroniąc przed rozwojem infekcji, a dzięki zdolności zatrzymywania wysięku będzie utrzymywał wilgotne środowisko rany, stwarzając optymalne warunki dla procesu regeneracji.

Bioaktywny substytut skóry będący przedmiotem wynalazku, ze względu na swoje właściwości biologiczne będzie zapewniał odpowiednie warunki wspierające regenerację skóry. Opracowany biomateriał może znaleźć zastosowanie w medycynie regeneracyjnej jako bioaktywny substytut skóry do pokrywania powierzchniowych ran lub jako funkcjonalny ekwiwalent skóry zasiedlany komórkami pacjenta w warunkach *in vitro*.

Przedmiot wynalazku ilustrują przedstawione poniżej przykłady:

Przykład I

Do 0,04 g chitozanu i 0,16 g kurdlanu dodano 2 ml 1% (v/v) wodnego roztworu kwasu octowego i mieszano do uzyskania jednolitej masy. Otrzymaną masę rozprowadzono w postaci cienkiej (1,5 mm) warstwy na powierzchni płaskiej formy o powierzchni 10 cm² odpornej na działanie wysokiej i ultra-niskiej temperatury. Formę inkubowano w łaźni wodnej w temperaturze 95°C przez 20 minut, a następnie ostudzono w temperaturze 6°C. Ostudzony biomateriał umieszczono na 20 minut w 1% (w/v) wodnym roztworze zasady sodowej. Po wyjęciu materiału z roztworu zasady, płukano go trzykrotnie przez okres 30 minut w wodzie dejonizowanej, a następnie próbkę suszono w temperaturze pokojowej.

Otrzymany biomateriał posiada strukturę chłonnego, hydrożelowego filmu, jest nietoksyczny, a jego powierzchnia sprzyja adhezji i proliferacji fibroblastów skóry, keratynocytów i mezenchymalnych komórek macierzystych.

Przykład II

Do 0,01 g chitozanu i 0,30 g kurdlanu dodano 2 ml 0,5% (v/v) wodnego roztworu kwasu octowego i mieszano do uzyskania jednolitej masy. Otrzymaną masę rozprowadzono w postaci cienkiej (0,5 mm) warstwy na powierzchni płaskiej formy o powierzchni 10 cm² odpornej na działanie wysokiej i ultra-niskiej temperatury. Formę inkubowano w łaźni wodnej w temperaturze 90°C przez 25 minut, a następnie ostudzono w temperaturze 4°C. Ostudzony biomateriał umieszczono na 20 minut w 1% (w/v) wodnym roztworze zasady sodowej. Po wyjęciu materiału z roztworu zasady, płukano go trzykrotnie przez okres 30 minut w wodzie dejonizowanej, a następnie próbkę suszono w temperaturze pokojowej.

Otrzymany biomateriał posiada strukturę chłonnego hydrożelowego filmu, jest nietoksyczny, a jego powierzchnia sprzyja adhezji i proliferacji fibroblastów skóry, keratynocytów i mezenchymalnych komórek macierzystych.

Przykład III

Do 0,02 g chitozanu i 0,05 g kurdlanu dodano 1 ml 2% (v/v) wodnego roztworu kwasu octowego i mieszano do uzyskania jednolitej masy. Otrzymaną masę rozprowadzono w postaci cienkiej (1 mm) warstwy na powierzchni płaskiej formy o powierzchni 5 cm² odpornej na działanie wysokiej i ultra-niskiej temperatury. Formę inkubowano w łaźni wodnej w temperaturze 95°C przez 15 minut, a następnie ostu-

dzono w temperaturze 8°C. Ostudzony biomateriał umieszczono na 20 minut w 1% (w/v) wodnym roztworze zasady sodowej. Po wyjęciu materiału z roztworu zasady, płukano go trzykrotnie przez okres 30 minut w wodzie dejonizowanej, a następnie próbkę suszono w temperaturze pokojowej.

Otrzymany biomateriał posiada strukturę chłonnego, hydrożelowego filmu, jest nietoksyczny, a jego powierzchnia sprzyja adhezji i proliferacji fibroblastów skóry, keratynocytów i mezenchymalnych komórek macierzystych.

Przykład IV

Do 0,04 g chitozanu i 0,16 g kurdlanu dodano 2 ml 3% (v/v) wodnego roztworu kwasu octowego i mieszano do uzyskania jednolitej masy. Otrzymaną masę rozprowadzono w postaci cienkiej (1,5 mm) warstwy na powierzchni płaskiej formy o powierzchni 10 cm² odpornej na działanie wysokiej i ultra-niskiej temperatury. Formę inkubowano w łaźni wodnej w temperaturze 95°C przez 20 minut, a następnie ostudzono w temperaturze 4°C. Ostudzony biomateriał umieszczono na 20 minut w 1% (w/v) wodnym roztworze zasady sodowej. Po wyjęciu materiału z roztworu zasady, płukano go trzykrotnie przez okres 30 minut w wodzie dejonizowanej, a następnie próbkę suszono w temperaturze pokojowej.

Otrzymany biomateriał posiada strukturę chłonnego, hydrożelowego filmu, jest nietoksyczny, a jego powierzchnia sprzyja adhezji i proliferacji fibroblastów skóry, keratynocytów i mezenchymalnych komórek macierzystych.

Zastrzeżenia patentowe

1. Hydrożelowy substytut skóry na bazie chitozanu **znamienny tym**, że stanowi go chitozan i kurdlan (bakteryjny β -1,3-D-glukan) rozprowadzone w 0,5–3% (v/v) wodnym roztworze kwasu octowego, przy czym proporcje wagowe stałych komponentów wynoszą odpowiednio 0,5–4% (w/v) chitozanu oraz 2–15% (w/v) kurdlanu w odniesieniu do kwasu octowego.
2. Hydrożelowy substytut skóry według zastrz. 1 **znamienny tym**, że chitozan występuje w ilości 2% (w/v) w odniesieniu do kwasu octowego.
3. Hydrożelowy substytut skóry według zastrz. 1 **znamienny tym**, że kurdlan występuje w ilości 5–8% (w/v) w odniesieniu do kwasu octowego.
4. Sposób wytwarzania hydrożelowego substytutu skóry na bazie chitozanu **znamienny tym**, że przygotowuje się mieszaninę 0,5–4% (w/v) chitozanu oraz 2–15% (w/v) kurdlanu w 0,5–3% (v/v) wodnym roztworze kwasu octowego, korzystnie 1% (v/v), a następnie mieszaninę rozprowadza się w postaci cienkiej 0,5–2 mm warstwy na powierzchni formy, którą inkubuje się w temperaturze 90–95°C, korzystnie 95°C, przez 15–30 minut, korzystnie 20 minut, po czym studzi w temperaturze 4–8°C, a ostudzoną próbkę umieszcza się w 1% (w/v) wodnym roztworze zasady sodowej na okres korzystnie 20 minut, a następnie po wyjęciu z roztworu zasady sodowej płucze się w wodzie dejonizowanej i suszy w temperaturze pokojowej.
5. Sposób według zastrz. 4 **znamienny tym**, że chitozan stosuje się w ilości 2% (w/v) w odniesieniu do kwasu octowego.
6. Sposób według zastrz. 4 **znamienny tym**, że kurdlan stosuje się w ilości 5–8% (w/v) w odniesieniu do kwasu octowego.
7. Sposób według zastrz. 4 **znamienny tym**, że biomateriał płucze się w wodzie dejonizowanej przez okres 30 minut.