

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL**

(11) **235239**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **413667**

(22) Data zgłoszenia: **06.08.2015**

(51) Int. Cl.

C07K 14/78 (2006.01)

A61L 27/24 (2006.01)

B82Y 5/00 (2011.01)

(54) **Sposoby wytwarzania kolagenu o właściwościach bakteriostatycznych
i przeciwgrzybiczych**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

29.03.2016 BUP 07/16

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

15.06.2020 WUP 07/20

(73) Uprawniony z patentu:

**POLITECHNIKA KRAKOWSKA
IM. TADEUSZA KOŚCIUSZKI, Kraków, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

**AGNIESZKA SOBCZAK-KUPIEC, Myślenice, PL
REGINA KIJKOWSKA, Kraków, PL
DAGMARA MALINA, Kraków, PL
BOŻENA TYLISZCZAK, Kęty, PL
RAFAŁ BOGUCKI, Kraków, PL**

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Marta Bartula-Toch

PL 235239 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku są sposoby wytwarzania kolagenu o właściwościach bakteriostatycznych i przeciugrzybiczych do zastosowania w medycynie i weterynarii jako materiał wszczepienny.

Kolagen należy do grupy białek strukturalnych o ogromnym znaczeniu dla funkcjonowania organizmu człowieka i zwierząt. Jest podstawowym budulcem włóknistej tkanki łącznej organizmów żywych. Około 1/3 wszystkich białek ciała ludzkiego występuje w postaci kolagenu włóknistego. Kolagen nie tylko bierze udział w funkcjach życiowych niemal wszystkich narządów i tkanek, ogólnie układów, zwłaszcza kostnego, ale też sprawuje funkcję obronną – ogranicza wnikanie i rozprzestrzenianie się w tkankach ciał patogennych – toksyn środowiskowych, drobnoustrojów i komórek nowotworowych. Masowo najwięcej kolagenu ulokowane jest w szkielecie kostnym.

W medycynie i weterynarii istnieje czasem konieczność rekonstrukcji tkanek, do której wykorzystuje się pozyskany z organizmów żywych kolagen. Zjawiskiem sporadycznie towarzyszącym procesom rekonstrukcji uszkodzonych tkanek są infekcje pooperacyjne wywołane przez bakterie lub grzyby, opóźniające procesy gojenia. Dlatego dąży się do zastosowania takich materiałów wszczepiennych, które jednocześnie mają nie tylko właściwości rekonstrukcyjne, ale również biobójcze.

Ze zgłoszenia patentowego PCT/US02/031765 znany jest wyrób wszczepialny do naprawy chrząstki, stosowany do transplantacji chondrocytów, przeszczepiania kości i chrząstki, gojenia, regeneracji stawu i zapobiegania patologiom stawów. W szczególności w wynalazku ujawniono sposoby przygotowywania miejsca przeszczepu, przyrządów służących do takiego przygotowania i do autologicznej transplantacji komórek do wytworzonego miejsca przeszczepu. Wyrób zawiera kolagenową macierz nośnikową, komórki chrzęstne i spoiwo biokompatybilne przylegające do brzegu wymienionej macierzy nośnikowej.

Wymienione powyżej komórki chrzęstne i spoiwo biokompatybilne są mieszane homogennie albo nie-homogenie lub są nanoszone naprzemiennie w jednej lub wielu warstwach na macierz nośnikową, przy czym wymienione komórki chrzęstne i wymienione spoiwo biokompatybilne występują w postaci mieszanki. Macierz nośnikowa jest elementem w kształcie arkusza zdolnym do podtrzymywania wzrostu komórek chrzęstnych i do zapewnienia wyrobowi wszczepialnemu i fizycznej integralności, aby ułatwić manipulację nim.

W innym korzystnym rozwiązaniu wymieniona macierz nośnikowa zawiera polipeptydy lub białka, który to wymieniony kolagen korzystnie jest wybrany spośród grupy składającej się zasadniczo z kolagenu końskiego, świńskiego, wołowego, owczego i kurzego. W wyrobie wszczepialnym według wynalazku, wymieniona macierz nośnikowa jest korzystnie w stanie stałym lub w postaci żelu.

Istota pierwszego wynalazku polega na tym, że sporządza się wodną zawiesinę nanocząstek złota o stężeniu od 50 do 200 ppm Au, po czym do tej zawiesiny wprowadza się kolagen w postaci proszku lub włókien, w takiej ilości aby stosunek fazy ciekłej do fazy stałej wynosił w przybliżeniu 1:1. Następnie mieszaninę miesza się z prędkością od 300 do 1000 obrotów na minutę w czasie od 30 do 60 minut, pozostawia na okres od 1 do 24 godzin i przesącza się przez bibułę filtracyjną w celu oddzielenia fazy stałej od ciekłej. Osad kolagenu wzbogaconego w nanocząstki złota suszy się następnie w temperaturze od 18 do 25°C przy dostępie powietrza o wilgotności od 35 do 55%.

Istota drugiego wynalazku polega na tym, że sporządza się wodną zawiesinę nanocząstek złota o stężeniu od 50 do 200 ppm Au, po czym do tej zawiesiny wprowadza się kolagen w postaci proszku lub włókien, w takiej ilości aby stosunek fazy ciekłej do fazy stałej wynosił w przybliżeniu 1:1. Następnie mieszaninę miesza się z prędkością od 300 do 1000 obrotów na minutę w czasie od 30 do 60 minut, po czym powstałą zawiesinę umieszcza się w temperaturze od -20 do -30°C na okres od 24 do 48 godzin. Po tym czasie materiał umieszcza się w liofilizatorze gdzie w temperaturze od -30 do -40°C przy ciśnieniu od 0,2 do 0,24 mBar następuje proces liofilizacji trwający od 24 do 72 h.

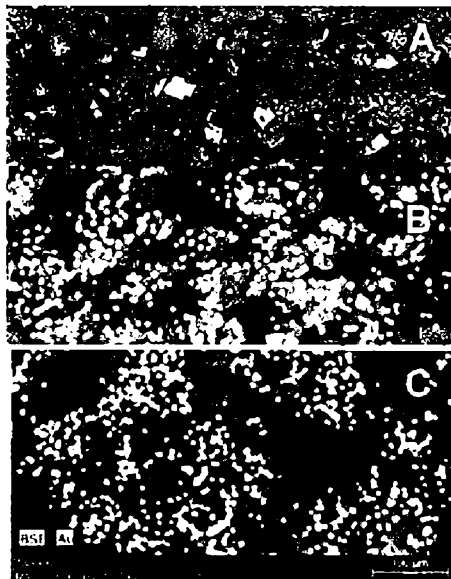
Zaletą wynalazku jest przede wszystkim łatwość w otrzymywaniu pożądanego materiału wszczepiennego przy dość ograniczonych nakładach finansowych. W wyniku zastosowanej metody nanocząsteczki złota adsorbują się w sposób trwały na powierzchni ziaren bądź włókien kolagenowych, a po wprowadzeniu do organizmu działają biobójczo na różne szczepy bakterii i grzybów.

Przedmiot wynalazków przedstawiony został w przykładach wykonania.

P r z y k ł a d I

Do 5 cm³ wodnej zawiesiny złota atomowego o stężeniu 50 ppm Au, zgrupowanego w nanocząstki wsypuje się ok. 1 g proszku kolagenu. Otrzymaną zawiesinę miesza się na mieszadle magne-

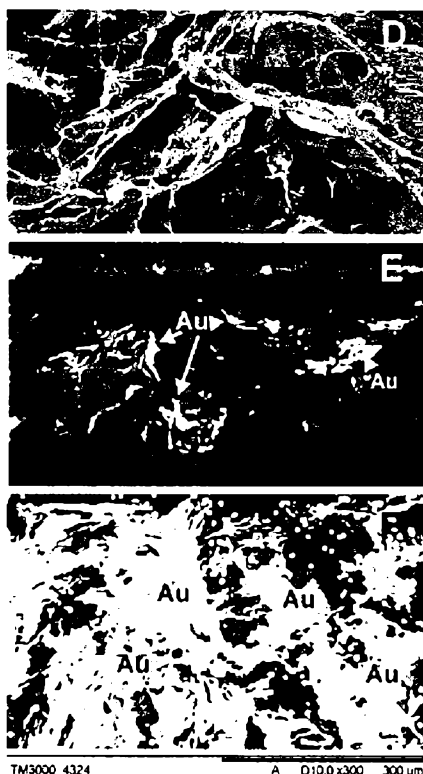
tycznym przy prędkości 500 obrotów na minutę przez około 30 minut, po czym pozostawia się na 24 godziny. Następnie zawiesinę odfiltruje się i pozostawia na bibule filtracyjnej do wyschnięcia otrzymując próbkę zawierającą na ziarnach kolagenu nanocząstki złota atomowego. Poniżej przedstawiono obraz ze skaningowego mikroskopu elektronowego, gdzie: A – kolagen w postaci proszku, B i C – kolagen po modyfikacji nanozłotem. Na powierzchni ziaren widoczne są kuliste nanocząstki złota barwy żółtej.



Przykład II

Sporządza się wodną zawiesinę nanozłota o stężeniu 50 ppm Au. Do ilości 6 cm³ i wprowadza się ok. 1,5 g proszku sproszkowanego kolagenu i miesza się na mieszadło magnetycznym przy prędkości 5000 obrotów na minutę przez 40 minut. Tak przygotowaną zawiesinę umieszcza się w zamrażarce w temperaturze –20°C i pozostawia na okres 24 h. Następnie zamrożoną zawiesinę poddaje się procesowi liofilizacji w liofilizatorze, polegającym na wymrażaniu cieczy z analizowanego materiału, w temperaturze –35°C przy ciśnieniu 0,22 mBar przez okres 24 godziny. W metodzie tej cała zawartość złota z pierwotnej zawiesiny zostaje zadsorbowana na powierzchni ziaren kolagenu.

Poniżej przedstawiono obraz ze skaningowego mikroskopu elektronowego, gdzie D – kolagen z formie kostki z włókien, E – kolagen po modyfikacji nanozłotem metodą według rozwiązania pierwszego, F – kolagen po modyfikacji nanozłotem metodą liofilizacji według rozwiązania drugiego.



Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania kolagenu o właściwościach bakteriostatycznych i przeciwgrzybiczych, **znamienny tym**, że sporządza się wodną zawiesinę nanocząstek złota o stężeniu od 50 do 200 ppm Au, po czym do tej zawiesiny wprowadza się kolagen w postaci proszku lub włókien, w takiej ilości aby stosunek fazy ciekłej do fazy stałej wynosił w przybliżeniu 1:1, a następnie mieszaninę miesza się z prędkością od 300 do 1000 obrotów na minutę w czasie od 30 do 60 minut, pozostawia na okres od 1 do 24 godzin i przesącza się przez bibułę filtracyjną w celu oddzielenia fazy stałej od ciekłej, a otrzymany osad kolagenu wzbogaconego w nanocząstki złota suszy się następnie w temperaturze 18–25°C przy dostępie powietrza o wilgotności od 35 do 55%.
2. Sposób wytwarzania kolagenu o właściwościach bakteriostatycznych i przeciwgrzybiczych, **znamienny tym**, że sporządza się wodną zawiesinę nanocząstek złota o stężeniu od 50 do 200 ppm Au, po czym do tej zawiesiny wprowadza się kolagen w postaci proszku lub włókien, w takiej ilości aby stosunek fazy ciekłej do fazy stałej wynosił w przybliżeniu 1:1, następnie mieszaninę miesza się z prędkością od 300 do 1000 obrotów na minutę w czasie od 30 do 60 minut, po czym umieszcza się w temperaturze od –20 do –30° C na okres od 24 do 48 godzin, a po tym czasie materiał umieszcza się w liofilizatorze gdzie w temperaturze od –30 do –40°C przy ciśnieniu od 0,2 do 0,24 mBar następuje proces liofilizacji trwający od 24 do 72 h.