

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10) **PL 246411 B1**

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **439912**

(22) Data zgłoszenia: **2021.12.20**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2023.06.26 BUP 26/2023**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2025.01.20 WUP 03/2025**

(51) MKP:

A61K 47/36 (2006.01)

A61K 31/7068 (2006.01)

A61K 31/203 (2006.01)

A61P 17/02 (2006.01)

(73) Uprawniony z patentu:

UNIWERSYTET GDAŃSKI, Gdańsk, PL
POLITECHNIKA GDAŃSKA, Gdańsk, PL
GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY,
Gdańsk, PL
INNOVABION SPÓŁKA Z OGRANICZONĄ
ODPOWIEDZIALNOŚCIĄ, Gdańsk, PL

(72) Twórca(-y) wynalazku:

PIOTR SKOWRON, Gdańsk, PL
SYLWIA RODZIEWICZ-MOTWIDŁO,
Rotmanka, PL
MARIA DZIERŻYŃSKA, Sopot, PL
JUSTYNA SAWICKA, Gdańsk, PL
PAWEŁ SACHADYN, Gdynia, PL
PAULINA SŁONIMSKA, Gdańsk, PL
PAWEŁ SOSNOWSKI, Ruda, PL
PIOTR SASS, Gdynia, PL
JOLANTA KAMIŃSKA, Augustów, PL
JAKUB BACZYŃSKI-KELLER, Gdynia, PL
RAFAŁ PŁATEK, Warszawa, PL

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Katarzyna Paprzycka, Kraków, PL

(54) Tytuł:

Kompozycja farmaceutyczna na bazie formułacji hydrożelowych do zastosowania jako dwuskładnikowy preparat stymulujący regenerację tkanek

PL 246411 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest jednoczesne zastosowanie w kompozycji dwóch mieszanin hydrożelowych na bazie alginianu zawierających zebularynę i kwas retinowy – kompozycja dwóch formuacji zawierających każda składnik aktywny, które po podaniu do organizmu ulegają biodegradacji i stopniowo uwalniają substancje czynne zebularynę i kwas retinowy, które pobudzają regenerację tkanek. Wynalazek znajduje zastosowanie jako preparat stymulujący procesy regeneracyjne tkanek, zwłaszcza skóry, w wypadkach, gdy podanie miejscowe leku regeneracyjnego jest nieskuteczne, gdyż nie zapewnia odpowiedniej penetracji leku do tkanki i w wypadku uszkodzeń wymagających długotrwałego dostarczenia leku. Przykładami takich uszkodzeń są przewlekłe rany skóry i neuropatie obwodowe.

Regeneracja tkanek oznacza proces odtwarzania uszkodzonych lub utraconych tkanek prowadzący do przywrócenia pierwotnej struktury. Procesy regeneracji mogą zachodzić w organizmie samorzutnie lub w efekcie terapii. W organizmach ludzi, jak i innych ssaków, niezbędna do normalnego funkcjonowania jest regeneracja fizjologiczna, jak w przypadku regularnego odnawiania naskórka, nabłonka jelita, nabłonka endometrium czy tkanek wątroby. Uszkodzenia tkanek przez czynniki zewnętrzne, wskutek urazów mechanicznych, oparzeń, działania toksyn, promieniowania, niedokrwienia lub operacji chirurgicznych mogą być naprawione poprzez działanie naturalnych mechanizmów regeneracji tkanek, jednak efektywność tych endogennych procesów regeneracyjnych nie zawsze jest wystarczająca do pełnego i prawidłowego odtworzenia utraconych struktur, albo postęp procesów naprawczych jest zbyt powolny i nie zachodzi w normalnym dla danego typu uszkodzenia czasie. Przykładowo skóra ma zdolności regeneracyjne, ale na skutek powikłań cukrzycowych, niedokrwienia, chemioterapii, odleżyn, gojenie ran skóry może być znacznie opóźnione, tj. przekraczać 3 miesiące. W cięższych przypadkach niegojące się rany mogą mieć nawet charakter chroniczny. W przypadku nieregenerujących się uszkodzeń podejmowane są próby interwencji terapeutycznych. Jedną z opcji terapeutycznych jest farmakologiczna aktywacja zablokowanego potencjału regeneracyjnego. Bardzo obiecującym, ale stosunkowo słabo zbadanym podejściem jest zastosowanie inhibitorów epigenetycznych w połączeniu z aktywatorami transkrypcji. Połączone podanie inhibitora metylotransferazy DNA – zebularyny i aktywatora transkrypcji – kwasu retinowego umożliwiło efektywną indukcję regeneracji małżowiny usznej u myszy w przypadku uszkodzeń, których naprawa nie następuje samorzutnie (Sass, P., et al. 2019, EBioMedicine 46: 317–329). Jednak procesy naprawcze mogą być długotrwałe, stąd potrzeba częstego podawania leków stymulujących regenerację. Wielokrotne podawanie leku np. w postaci zastrzyków jest kłopotliwe, ale też wiąże się ze skokowymi zmianami poziomu leku, które mogą być źle tolerowane przez organizm i które nie są korzystne dla procesu regeneracji. Dotychczas opracowany schemat podania zebularyny i kwasu retinowego, przedstawiony w zgłoszeniu patentowym PL423672. Opisano kompozycję farmaceutyczną zawierającą zebularynę i/lub jej farmaceutycznie dopuszczalną sól jak i kwas retinowy i/lub metabolity kwasu retinowego i/lub ich farmaceutycznie dopuszczalne sole, oraz co najmniej jeden znany dopuszczalny farmaceutycznie nośnik i/lub rozcieńczalnik do zastosowanie jako środek do pobudzania regeneracji lub gojenia ran wywołanych przez uszkodzenia mechaniczne, chemiczne, termiczne, operacje chirurgiczne lub stany patologiczne. Ta kompozycja wymagała jednakże wykonania 7 zastrzyków dootrzewnowych zebularyny w ciągu 10 dni i 6 zastrzyków dootrzewnowych zebularyny w ciągu 11 dni, co jest kłopotliwe w wykonaniu i nie zapewnia stopniowego uwalniania substancji czynnej.

Stąd potrzeba opracowania skuteczniejszych sposobów regeneracji tkanek.

Przedmiotem wynalazku jest jednoczesne zastosowanie w kompozycji dwóch formuacji hydrożelowych – mieszanin na bazie hydrożelu alginianowego zawierających zebularynę – składnik aktywny biologicznie oraz alginian sodowy stanowiących pierwszą formuację, kwas retinowy – składnik aktywny biologicznie oraz alginian sodowy stanowiących drugą formuację, które podane podskórnio do organizmu ulegają biodegradacji i stopniowo uwalniają zawarte w nich substancje czynne, czyli zebularynę i kwas retinowy aktywujące regenerację tkanek. Jako "jednoczesne użycie" rozumie się podanie bezpośrednio po sobie do tego zastosowania medycznego – regeneracji tkanek celem jednoczesnego zastosowania obu składników biologicznie aktywnych np. w dwóch iniekcjach podskórnych lub w postaciach do podania bezpośrednio do miejsca uszkodzenia ale podanych po sobie bez zwłoki. Wynalazek dotyczy, zatem kompozycji farmaceutycznej – zestawu – zawierającej obie formuacje. Pierwsza formuacja zawiera alginian sodowy oraz zebularynę, a druga formuacja zawiera kwas retinowy i alginian sodowy. Na podstawie doświadczeń ustalono proporcje substancji zebularyny i kwasu retinowego do alginianu w każdej formuacji. W pierwszej formuacji zebularyna jest w proporcji odpowiadającej od 60 do 240 mg

na 1 ml hydrożelu alginianowego zawierającego 10–20 mg samego alginianu sodowego w 1 ml wody, czyli 1–2% roztwór alginianu sodowego; a w formułacji drugiej kwas retinowy jest w proporcji od 1 do 4 mg na 1 ml hydrożelu alginianowego – zawierającego 10–20 mg samego alginianu sodowego w 1 ml wody, czyli 1–2% roztwór alginianu sodowego. Korzystnie, formułacja z kwasem retinowym ma dodatkowo olej np. rzepakowy.

Wynalazek polega na jednoczesnym zastosowaniu formułacji hydrożelowych zebularyny i kwasu retinowego na bazie alginianu przygotowanych np. w postaci dwóch podskórnych iniekcji lub podania bezpośrednio do miejsca uszkodzenia. Wprowadzone pod skórę hydrożelowe formułacje zebularyny i kwasu retinowego stopniowo uwalniają substancje czynne ulegające jednocześnie biodegradacji. Uwalniane stopniowo substancje czynne, zebularyna i kwas retinowy łącznie pobudzają regenerację tkanek w miejscach uszkodzenia oddalonych od miejsca iniekcji.

Wynalazek umożliwi podanie leków w postaci biodegradowalnych i biokompatybilnych kompozycji hydrożelowych, dzięki czemu lek po jednorazowym podaniu uwalniany jest stopniowo, nawet przez wiele dni.

Opis bardziej szczegółowy składu formułacji

Hydrożel owe formułację uzyskano w sposób następujący. Formułację hydrożelową zebularyny przygotowano przez zawieszenie od 60 do 240 mg zebularyny na 1 ml hydrożelu alginianowego. Formułację hydrożelową kwasu retinowego przygotowano przez zawieszenie od 1 do 4 mg na 1 ml hydrożelu alginianowego. Formułacja zawierająca do 240 mg zebularyny w 1 ml 1–2% hydrożelu alginianowego sodowego, wykazuje się dużą lepkością, ale pozostaje płynna i można ją skutecznie wykorzystać do wykonania zastrzyków podskórnych lub podania bezpośrednio do miejsca uszkodzenia. Opracowany zakres zaś od 60 do 240 mg wykazuje się skutecznością działania. Formułacja zawierająca do 4 mg kwasu retinowego w 1 ml 1–2% hydrożelu alginianowego sodowego jest lepka, ale zachowuje płynną postać nadaje się do wykonania zastrzyków podskórnych lub podania bezpośrednio do miejsca uszkodzenia. Opracowany zakres zaś od 1 do 4 mg wykazuje się skutecznością działania. Zawartość zebularyny i kwasu retinowego w przygotowanych formułacjach została dobrana z uwzględnieniem dawek aktywnych biologicznie oraz na podstawie eksperymentów, w których badano jaką ilość substancji aktywnych można dodać do formułacji hydrożelowej żeby pozostała przydatna do iniekcji lub podania bezpośrednio do miejsca uszkodzenia.

Formułację zebularyny i kwasu retinowego pozwalały na jednorazowe podskórne podanie myszy laboratoryjnej maksymalnie 48 mg zebularyny w 0,2 ml hydrożelu (240 mg na 1 ml) i maksymalnie 0,8 mg kwasu retinowego w 0,2 ml hydrożelu (4 mg na 1 ml), co odpowiada dawkom około 2000 mg/kg wagi ciała i 32 mg/kg wagi ciała. Do badania odpowiedzi regeneracyjnej wykorzystano model uszkodzenia małżowiny usznej myszy, który pozwala na obserwację regeneracji tkanki złożonej obejmującej skórę, chrząstkę, mięśnie, naczynia krwionośne, nerwy obwodowe i mieszki włosowe. Formułację hydrożelowe alginianu sodowego 2% z zebularyną i kwasem retinowym podane podskórnie umożliwiły regenerację małżowiny usznej u myszy. Szczegółowy opis doświadczenia pokazano w przykładzie 1. Ponieważ substancje czynne podane w hydrożelu uwalniają się stopniowo pod skórą, mimo wysokiej dawki są dobrze tolerowane przez organizm. Dzięki konsystencji hydrożele z substancją czynną mogą zostać też podane w bezpośrednio do miejsca uszkodzenia.

Wynalazek pokazano bliżej w przykładach i na rysunkach, na których:

Figura 1 – przedstawia mikroskopowe zdjęcia formułacji hydrożelowych alginianu 2% z 240 mg zebularyny (Zeb) na 1 ml hydrożelu alginianowego – roztwór wodny alginianu sodowego, 4 mg kwasu retinowym (RA) na 1,0 ml hydrożelu i 4 mg kwasu retinowego w 0,1 ml oleju rzepakowego na 1 ml hydrożelu alginianowego. Strzałkami wskazano kryształki kwasu retinowego.

Pierwsza formułacja zawiera 240 mg zebularyny i 20 mg alginianu sodowego w 1 ml wody. Druga mieszanina zawiera 4 mg kwasu retinowego i 20 mg alginianu sodowego w 1 ml wody. Zawartości zebularyny i kwasu retinowego znacznie przekraczają zawartości odpowiadające rozpuszczalności tych związków chemicznych w wodzie, które według danych literaturowych wynoszą do 50 mg/ml dla zebularyny (Sass, P., et al. 2019, EBioMedicine 46: 317–329) i 0,000063 mg/ml (0,21 microM) dla kwasu retinowego (Szuts EZ i Harosi FI 1991 Archives of Biochemistry and Biophysics 287:297–304). Oznacza to, że hydrożel alginianowy umożliwia efektywne podanie wielokrotnie wyższych dawek zebularyny i kwasu retinowego niż roztwory wodne o tej samej objętości.

Figura 2 – przedstawia rezultat badania *in vitro* uwalniania zebularyny (Zeb) z hydrożelu alginianowego w komorze Franza. Kwas retinowy nie uwalnia się w komorze Franza, czyli *in vitro*. *In vivo*, pod skórą uwalnia się w efekcie biodegradacji.

Figura 3 - przedstawia przebieg zamykania otworów w małżowinie usznej wyznaczony w dniu uszkodzenia bezpośrednio po jego wykonaniu i w 7, 14, 21, 28, 35 oraz 42 dniu po uszkodzeniu u 6 myszy po podaniu formułacji hydrożelu alginianowego 2% z zebularyną (Zeb) i kwasem retinowym (RA) zawieszonym w oleju rzepakowym (n=12 uszu) i 6 myszy kontrolnych (n=11 uszu). Istotność statystyczną wyników wyznaczono przy użyciu dwuskrzydłowego testu Manna-Whitneya. Różnice o istotności statystycznej $p < 0,05$ są oznaczone gwiazdką (*), $p < 0,01$ /KO,01 dwiema gwiazdkami (**).

Figura 4 – przedstawia reprezentatywną fotografię zamykania otworów w małżowinie usznej u myszy wykonane w 42 dniu po uszkodzeniu po podaniu 48 mg zebularyny (Zeb) w 0,2 ml 2% hydrożelu alginianowego i 0,8 mg kwasu retinowego (RA) rozpuszczonego w 20 μ l oleju rzepakowego, a następnie zawieszono w 0,2 ml 2% hydrożelu alginianowego (panel prawy) oraz zdjęcie z analogicznie wykonanego eksperymentu kontrolnego, w którym podano jedynie nośnik (panel lewy).

Figura 5 – przedstawia zdjęcie mikroskopowe pokazujące wzrost nerwów obwodowych w obszarze regeneracji w małżowinie usznej po podaniu alginianowych formułacji zebularyny i kwasu retinowego w dniu 42 po uszkodzeniu. Obecność włókien nerwowych w zregenerowanej tkance jest wykrywana przez barwienie za pomocą specyficznego wobec neuronów znakowanego fluorescencyjnie przeciwciała przeciwko tubulinie beta 3 (*Tubb3*) (na rysunku kolor biały).

Figura 6 – przedstawia zmiany ekspresji genów sygnalizacji Wnt obserwowane w regenerującej się małżowinie usznej u myszy po podskórnym podaniu formułacji hydrożelu alginianowego 2% z zebularyną (Zeb) i z kwasem retinowym (RA) i myszy kontrolnych po podaniu samego alginianu w dniu 7, 14 i 28 po uszkodzeniu. Średnie wartości stosunku ekspresji genu względem genów referencyjnych wyznaczono dla 3 myszy (n=6 uszu) dla każdego z dni pomiarowych. Istotność statystyczną wyników wyznaczono przy użyciu dwuskrzydłowego testu Manna-Whitneya. Różnice o istotności statystycznej $p < 0,05$ są oznaczone gwiazdką (*), $p < 0,01$ są oznaczone dwiema gwiazdkami (**). Słupki błędów odpowiadają wartości błędu standardowego średniej SEM.

Przykład 1

Przygotowanie i badanie formułacji hydrożeli alginianowych

Formułacje hydrożeli alginianowych zostały sporządzone w następujący sposób. W pierwszej kolejności przygotowano 2% roztwór alginianu sodowego w ten sposób, że 20 mg czystego alginianu sodowego zawieszano w 1 ml wody. Formułacje zebularyny przygotowano przez zawieszenie 240 mg zebularyny w 1 ml 2% alginianu sodowego poprzez 30 s homogenizację w młynie kulowym stosując porcelanowe kulki 2 mm przy szybkości 4 m/s w temp. pokojowej. Formułację kwasu retinowego przygotowano na dwa sposoby: albo przez zawieszenie 4 mg kwasu retinowego w 1 ml 2% alginianu sodowego, albo przez zawieszenie 4 mg kwasu retinowego rozpuszczonego w 0,1 ml oleju rzepakowego w 1 ml 2% alginianu sodowego przygotowanego wcześniej. W obu przypadkach zawiesiny homogenizowano w młynie kulowym stosując porcelanowe kulki 2 mm przy szybkości 4 m/s w temp. pokojowej. Uzyskane formułacje poddano badaniu mikroskopowemu, które wykazało homogenność formułacji alginianowych zebularyny oraz formułacji alginianowej kwasu retinowego z dodatkiem w oleju rzepakowego. Homogenność formułacji hydrożelowej zebularyny potwierdzają obserwacje mikroskopowe, które nie wykazują obecności kryształów lub aglomeratów (Fig. 1). Formułacja kwasu retinowego bez dodatku oleju rzepakowego zawierała niewielkie, niewidoczne gołym okiem kryształy kwasu retinowego o równomiernej dystrybucji w hydrożelu (Fig. 1). Formułacja z olejem ma inną postać, przypominającą emulsję. Taki obraz mikroskopowy formułacji hydrożelowej kwasu retinowego wskazuje, że kwas retinowy nie ulega wprawdzie rozpuszczeniu w hydrożelu, co jest typowe dla substancji hydrofobowych, do jakich należy ten związek chemiczny, ale ponieważ małe kryształy kwasu retinowego są rozproszone w całej objętości hydrożelu, wraz z biodegradacją alginianu, kwas retinowy będzie się stopniowo uwalniał do organizmu. Wszystkie trzy formułacje nadawały się do sporządzenia zastrzyków. Badanie wykonane w komorze Franza wykazało, że zebularyna stopniowo uwalnia się z alginianu 2% (Fig. 2), natomiast kwas retinowy, w warunkach komory Franza nie uwalniał się z formułacji alginianowych. Ta formułacja działa skutecznie, ponieważ pod skórą alginian ulega biodegradacji i w ten sposób uwalnia kwas retinowy, a więc brak uwalniania w komorze Franza nie jest niekorzystny. O uwalnianiu się zebularyny świadczy wzrastający w czasie poziom zebularyny wyrażony jednostkami arbitralnymi (a.u.). Przykładowo po 120 min poziom uwolnionej zebularyny był wyższy dwukrotnie (4×10^{11} a.u.) niż po 1 h (2×10^{11} a.u.). Po 50 h (3000 min) poziom zebularyny osiągnął maksymalną wartość 1×10^{12} a.u. wyższą o rząd niż po 30 min (1×10^{11} a.u.).

Przykład 2

Pobudzenie regeneracji tkanki złożonej po podaniu kompozycji to jest dwóch formułacji hydrożelowych alginianu z zebularyną i z kwasem retinowym, których sposób otrzymywania opisano w przykładzie 1.

Ocenę przydatności formułacji hydrożelu alginianowego z zebularyną i z kwasem retinowym, zawierających do 240 mg zebularyny i do 4 mg kwasu retinowego na 1 ml 2% hydrożelu alginianowego do pobudzenia proces regeneracji tkanki złożonej przeprowadzono stosując model uszkodzenia małżowiny usznej u myszy. Uszkodzenie tkanki wykonano za pomocą laboratoryjnego dziurkacza nożyczkowego poprzez wycięcie otworów o średnicy 2 mm w środkowej części małżowiny usznej. Użyto samic myszy ze szczepu BALB/c w wieku 8–10 tygodni w dniu rozpoczęcia eksperymentu. Zwierzęta rozdzielono losowo na dwie grupy po 6 osobników. Mysiom z pierwszej grupy podano podskórnie w dniu zranienia bezpośrednio po wykonaniu zranienia 48 mg zebularyny w 0,2 ml hydrożelu alginianowego 2% oraz 0,8 mg kwasu retinowego rozpuszczonego zawieszono w 0,2 ml hydrożelu alginianowego 2% w postaci dwóch bezpośrednio po sobie wykonanych zastrzyków. Mysiom z drugiej grupy, grupy kontrolnej, podawano podskórnie sam nośnik. Protokół eksperymentów na zwierzętach został zatwierdzony przez Lokalną Komisję Etyczną ds. Doświadczeń na Zwierzętach przy Uniwersytecie Technologiczno-Przyrodniczym w Bydgoszczy (nr zgody 50/2016). Uszy były fotografowane przez 6 tygodni w odstępach tygodniowych. W celu oceny postępów regeneracji powierzchnię otworów w małżowinie usznej wyznaczano przy użyciu komputerowej analizy dokumentacji fotograficznej. Średnie wartości procentowe zamknięcia otworu w małżowinie usznej wyznaczone w dniu 42 po uszkodzeniu wynosiły dla myszy kontrolnych i myszy po podaniu hydrożelowych formułacji zebularyny i kwasu retinowego odpowiednio $41,73 \pm 8,47\%$ SEM i $74,13 \pm 2,79\%$ SEM, $p=0,005$. Przebieg postępu procesu regeneracyjnego przedstawia Fig. 3. Istotną statystycznie poprawę zarastania otworów w małżowinie usznej u myszy traktowanych hydrożelową formułacją zebularyny i kwasu retinowego odnotowywano od 7 do 42 dnia po zranieniu. Efekt regeneracji tkanki złożonej pod podaniem formułacji hydrożelowej alginianu z zebularyną i kwasem retinowym ilustrują reprezentatywne fotografie uszu myszy wykonane w dniu 42 po uszkodzeniu Fig. 4, gdzie zmniejszenie rozmiaru otworu stanowi miarę odpowiedzi regeneracyjnej. W odtworzonej tkance małżowiny usznej miał miejsce intensywny wzrost drobnych nerwów obwodowych (Fig. 5), co pokazuje silny sygnał pochodzący od znakowanych fluorescencyjnie przeciwciał przeciwko specyficznej dla neuronów tubulinie beta 3 występujący w całym obszarze odtworzonej. Unerwienie tkanki jest ważne, ponieważ tkanka pozbawiona unerwienia nie jest w pełni funkcjonalna.

Po sekcjach zwierząt post-mortem w dniu 42 nie znaleziono pod skórą formułacji alginianowych, co wskazuje, że ulegają one biodegradacji. Biodegradacja nośnika hydrożelowego tłumaczy działanie biologiczne kwasu retinowego w ustroju zwierzęcia, mimo że nie uwalnia się *in vitro*.

Przykład 3.

Efekt podania hydrożelowych formułacji zebularyny i kwasu retinowego w alginianie na ekspresję genów sygnalizacji Wnt.

W celu oceny efektu podania hydrożelowych formułacji zebularyny i kwasu retinowego w alginianie na działanie sygnalizacji Wnt, której aktywacja jest typowa podczas procesów regeneracyjnych, porównano poziomy transkryptów wybranych genów Wnt w regionie uszkodzenia małżowiny usznej u myszy poddanych działaniu tych formułacji myszy kontrolnych, które otrzymały jedynie nośnik w dniu 7, 14 i 42 po zranieniu. Oznaczenia wykonano dla panelu 13 kluczowych genów sygnalizacji Wnt: *Atf3*, *Dvl2*, *Fosl1*, *Gsk3a*, *Lrp5*, *Lrp6*, *Prickle2*, *Sfrp1*, *Sfrp4*, *Tcf3*, *Wnt4a*, *Wnt5a*, *Wnt7a*.

W tym celu po eksperymentach, jak opisano w Przykładzie 2, zwierzęta poddano eutanazji w dniu 7, 14 i 42 po zranieniu. Pobrane tkanki zabezpieczono w odczynniku RNAlater, a następnie przechowywano w temp. -80°C . Pierścienie otaczające rany wycięto z małżowiny usznej stosując 3 mm sztance biopsyjne. Po dezintegracji tkanek za pomocą ręcznego homogenizatora mechanicznego, RNA izolowano za pomocą zestawu RNeasy (Qiagen). Poziomy transkryptów wyznaczono metodą ilościowego PCR w czasie rzeczywistym względem transkryptów referencyjnych *Tbp* i *Actb*. Sekwencje nukleotydowe starterów do PCR zestawiono w Tabeli 1.

Istotny statystycznie wzrost ekspresji genów Wnt po podaniu formułacji hydrożelowych zebularyny i kwasu retinowego względem mysz kontrolnych zaobserwowano w dniu 7 dla genów *Fosl1*, *Lrp5* i *Wnt4a*, w dniu 14 dla genów *Atf3*, *Prickle2*, *Tcf3*, *Wnt5a*, a w dniu 42 dla większości badanych genów tj. *Atf3*, *Dvl2*, *Fosl1*, *Lrp5*, *Lrp6*, *Prickle2*, *Sfrp1*, *Sfrp4*, *Wnt7a* (Fig. 6).

Przykłady potwierdzają, że:

Mieszanina po podaniu do organizmu ulega biodegradacji zapewniając stopniowe uwalnianie kwasu retinowego i zebularyny, co umożliwi pobudzenie regeneracji tkanek, środek leczniczy stymuluje wzrost nerwów, środek aktywuje transkrypcje genów sygnalizacji komórkowej istotnych dla regeneracji.

Opisano biodegradację na końcu przykładu 2. Nie znajduje się hydrożelu po sekcji pod skórą zwierząt.

Tabela 1

Sekwencje nukleotydowe starterów użytych do badania poziomów wybranych transkryptów metodą PCR w czasie rzeczywistym.

Gen	Starter sensowny	Starter antysensowny
<i>Actb</i>	GGCTGTATTCCCCTCCATCG	CCAGTTGGTAACAATGCCATGT
<i>Tbp</i>	GAGAGCCACGGACAACCTGCG	GGGAACCTCACATCACAGCTC
<i>Atf3</i>	TTTGCTAACCTGACACCCTTTG	AGAGGACATCCGATGGCAGA
<i>Dvl2</i>	GTAGGCGAGACGAAGGTGATT	CGCTGCAAAACGCTCTTGAA
<i>Fos1</i>	ATGTACCGAGACTACGGGGAA	CTGCTGCTGTCGATGCTTG
<i>Gsk3a</i>	CAAGTTCCCCCAGATCAAAGC	GGCTAGAGCAGAGTGCAATGG
<i>Lrp5</i>	ACGTCCCGTAAGGTTCTCTTC	GCCAGTAAATGTCGGAGTCTAC
<i>Lrp6</i>	TGCAAACAGACGGGACTTGAG	CGGGGACAATAATCCAGAAACAA
<i>Prickle2</i>	CATCAGCAAGCTCATGTTTGAC	ACCCAGGCGTACTCTTCCA
<i>Sfrp1</i>	TACTGGCCCGAGATGCTCAA	GAGGCTTCCGTGGTATTGGG
<i>Sfrp4</i>	TCCATCCTGGTGGCGTTATG	GCATCCGGGTGATGTTCCA
<i>Tcf3</i>	TTTGACCCTAGCCGGACATAC	GCATAGGCATTCCGCTCAC
<i>Wnt4a</i>	GTCAGGATGCTCGGACAACAT	CACGTCTTTACCTCGCAGGA
<i>Wnt5a</i>	AATGAAGCAGGCCGTAGGA	AGCCAGCACGTCTTGAGG
<i>Wnt7a</i>	TCAGTTTCAGTCCGAAATGGC	CCCGACTCCCCACTTTGAG

Zastrzeżenia patentowe

1. Kompozycja farmaceutyczna zawierająca dwie formułacje hydrożel we z substancjami czynnymi biologicznie do jednoczesnego zastosowania, z których jedna mieszanina zawiera nie mniej niż 60 mg zebularyny na 1 ml hydrożelu alginianowego sodowego i nie więcej niż 240 mg zebularyny na 1 ml hydrożelu alginianowego sodowego, a druga mieszanina zawiera nie mniej niż 1 mg kwasu retinowego na 1 ml hydrożelu alginianowego sodowego i nie więcej niż 4 mg kwasu retinowego na 1 ml hydrożelu alginianowego sodowego, przy czym substancje czynne biologicznie, czyli zebularyna i kwas retinowy z każdej formułacji po podaniu do organizmu uwalniają się stopniowo wskutek biodegradacji hydrożelu umożliwia ich łączne działanie do zastosowania do pobudzenia regeneracji tkanek.
2. Kompozycja według zastrz. 1, **znamienna tym**, że alginian sodowy jest od 1 do 2% roztworem w wodzie.

Rysunki

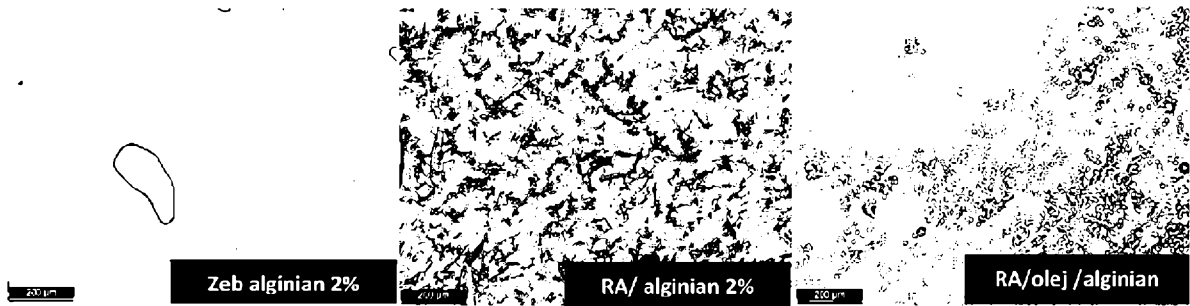


Fig 1.

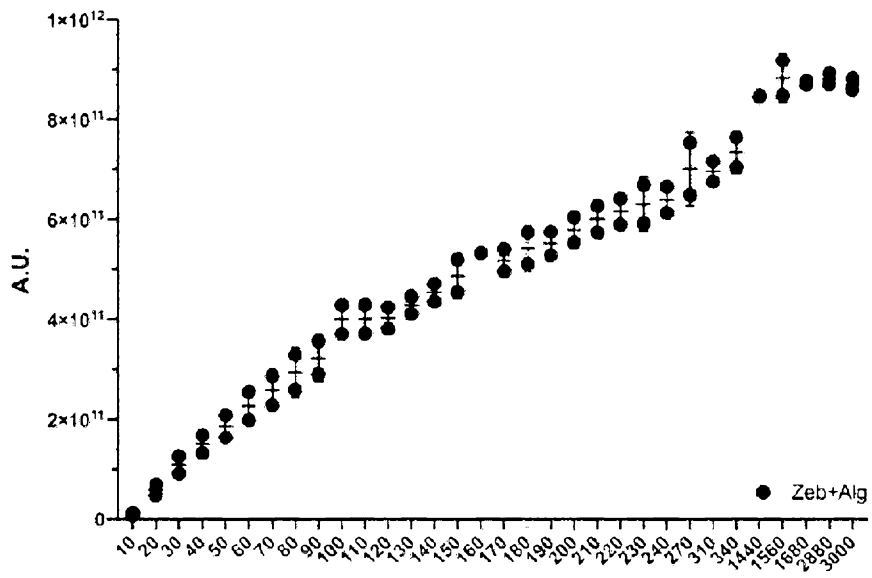


Fig 2.

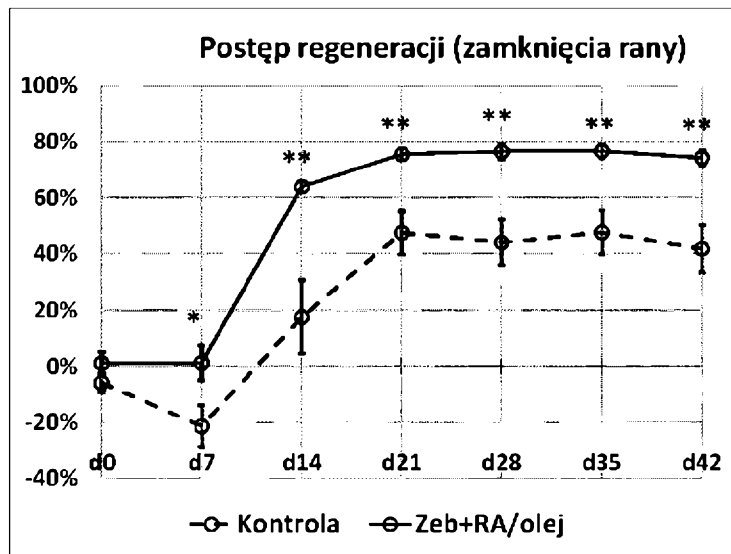


Fig. 3.

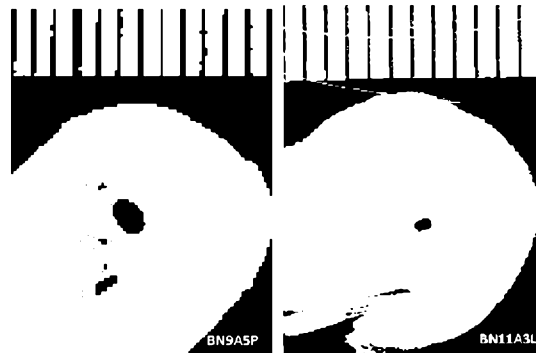


Fig. 4.

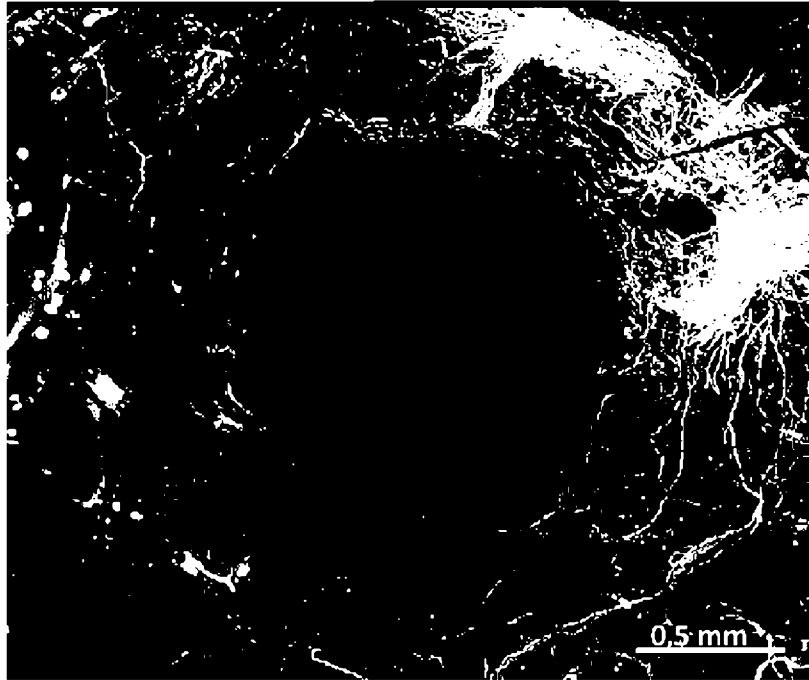


Fig. 5.

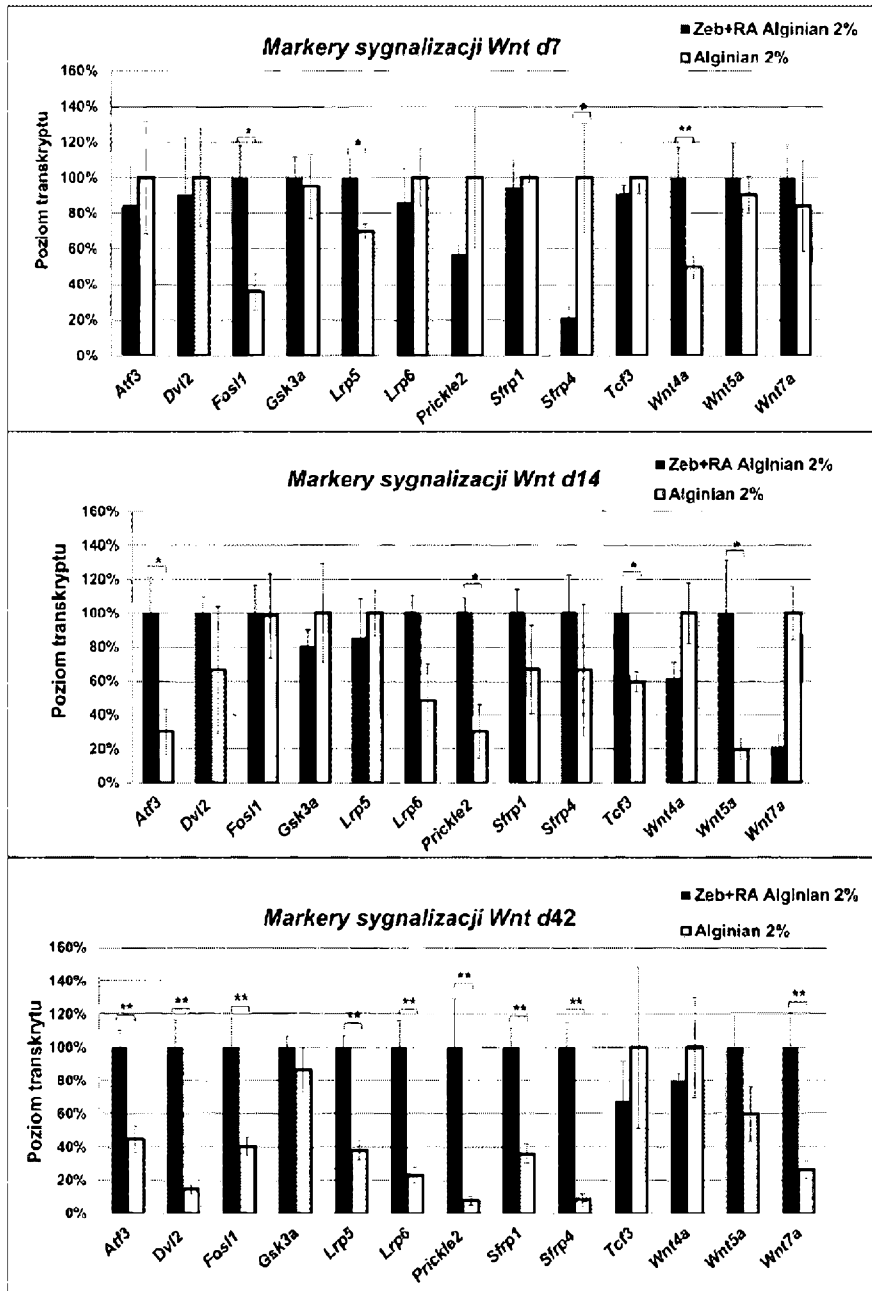


Fig. 6.