

RZECZPOSPOLITA  
POLSKA



Urząd Patentowy  
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL**

(11) **238256**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **432848**

(22) Data zgłoszenia: **06.02.2020**

(51) Int. Cl.

**A61L 15/28 (2006.01)**

**A61L 15/60 (2006.01)**

(54) **Sposób wytwarzania chłonnego biomateriału na bazie kurdlanu  
do zastosowań medycznych**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:  
**28.12.2020 BUP 27/20**

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:  
**02.08.2021 WUP 18/21**

(73) Uprawniony z patentu:

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

(72) Twórca(y) wynalazku:

**KATARZYNA KLIMEK, Lublin, PL  
GRAŻYNA GINALSKA, Lublin, PL**

(74) Pełnomocnik:

**rzecz. pat. Anna Bełz**

**PL 238256 B1**

## Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania wysoko chłonnego i biokompatybilnego biomateriału opatrunkowego na bazie liniowego  $\beta$ -1,3-glukanu (kurdlanu) do zastosowań biomedycznych, w celu pochłaniania uwalnianego płynu z rany i przyspieszenia procesów gojenia w miejscu zranienia.

Gojenie ran, w tym ran przewlekłych, jest procesem długotrwałym, składającym się z kilku faz, takich jak homeostaza, zapalenie, proliferacja i przebudowa (Klein K.C, Guha S.C, Indian J. Plast. Surg. 2014, 47, 303–317). Warto podkreślić, że w procesie gojenia ran kluczową rolę odgrywają jony wapnia, na każdym ze wspomnianych powyżej etapów (Lansdown B.G, Wound Repair Regen. 2002, 10, 271–285). Już podczas procesu homeostazy, jony wapnia będące IV czynnikiem krzepnięcia są uwalniane z płytek krwi i stymulują konwersję protrombiny do trombiny, co wpływa na wstępne zamknięcie rany i utworzenie skrzepu (Baugh R.F., Hougie C., Clin. Hematol. 1979, 8, 3–30). W fazie zapalnej oraz proliferacji, stężenie jonów wapnia zaczyna sukcesywnie wzrastać, prowadząc do rekrutacji komórek układu immunologicznego, tj. neutrofilii, monocytów i makrofagów, a także do migracji komórek skóry – fibroblastów w miejsce zranienia (Kok S. i wsp. J. Cell. Sci. 2001, 114, 1155–1167; Lansdown B.G, Wound Repair Regen. 2002, 10, 271–285). W ostatniej fazie – przebudowy, dochodzi do reorganizacji kolagenu i tworzenia dojrzałej blizny, co również zależy od stężenia jonów wapnia. Wskazuje się, że wapń wpływa na pobudzenie sygnałów wewnątrzkomórkowych prowadzących do przebudowy macierzy zewnątrzkomórkowej (Lansdown B.G, Wound Repair Regen. 2002, 10, 271–285).

Znanym rozwiązaniem w terapii gojenia ran jest stosowanie biokompatybilnych opatrunków wzbogaconych wapniem, które dostarczają ten pierwiastek w miejsce zranienia, przyspieszając przy tym procesy regeneracyjne (Rojczyk-Gołębiowska E. i wsp. Leczenie Ran 2013, 10, 65–70). Znany jest z opisu patentowego CN109550072 chłonny opatrunek na bazie alginianu oraz chitozanu, który uwalnia jony wapnia w miejscu zranienia, przez co wspiera procesy proliferacji komórek skóry – fibroblastów i zapewnia szybki proces gojenia. Z kolei z opisu CN109260508 znany jest biokompatybilny opatrunek na bazie alginianu sodowego oraz alkoholu poliwinylowego, który uwalnia jony wapnia, wspierając proliferację fibroblastów i procesy regeneracyjne skóry. Z opisu patentowego CN106994133 znany jest wapniowo-cynkowy kompozyt na bazie alginianu, który uwalnia do środowiska jony wapnia oraz cynku przez co zapewnia ochronę przeciwbakteryjną, a także wspiera procesy gojenia ran.

Z powyższych opisów patentowych wynika, że obecnie nie ma opatrunków na bazie bakteriynego liniowego  $\beta$ -1,3-glukanu (kurdlanu). Wiadomo jednak, że hydrożel  $\beta$ -1,3-glukanowy (kurdlanowy) otrzymywany metodą termiczną znalazł zastosowanie jako składnik ceramiczno-polimerowego substytutu kostnego (Patent PL 206 394 i International Patent nr EU 2 421 570 B1). Z kolei hydrożel kurdlanowy, otrzymywany metodą dializy względem roztworu jonów wapnia znalazł zastosowanie jako składnik ceramiczno-polimerowego rusztowania kostnego (Patent PL 229 329 B1).

Wynalazek rozwiązuje zagadnienie otrzymywania biomateriału na bazie liniowego  $\beta$ -1,3-glukanu (kurdlanu), charakteryzującego się wysoką zdolnością do pochłaniania płynów oraz uwalniania jonów wapnia w środowisku wodnym, a także biokompatybilnością w warunkach *in vitro*, poprzez wspieranie żywotności i procesów proliferacji komórek skóry – fibroblastów.

Sposób wytwarzania biomateriału według wynalazku polega na tym, że 6–20% (w/v) roztwór  $\beta$ -1,3-glukanu (kurdlanu), korzystnie 11% (w/v) przygotowuje się w 0,1–0,5 M roztworze zasady sodowej (NaOH), korzystnie 0,3 M, po czym otrzymany roztwór korzystnie umieszcza się w formach o pożądanym kształcie i poddaje dializie w roztworze soli wapniowej o stężeniu od 5 g/l do 150 g/l, korzystnie 20 g/l w czasie 1–24 godziny/godzin, w temperaturze 19–30°C, a następnie umieszcza się w wodzie destylowanej lub dejonizowanej na około 15 minut. Otrzymany hydrożel  $\beta$ -1,3-glukanu (kurdlanu) umieszcza się w zamrażarce w temperaturze od -5°C do -40°C korzystnie -20°C na okres 2–5 dni korzystnie 2 dni, a następnie w temperaturze od -60°C do -195°C korzystnie -80°C na 2–8 godzin, po czym zamrożony biomateriał poddaje się suszeniu poprzez liofilizację w czasie 15–30 godzin, korzystnie 19–26 godzin, a następnie sterylizacji gazowej.

Korzystnie jest, gdy przy dializie stosuje się roztwory rozpuszczalnych w wodzie soli wapniowych jak  $\text{CaCl}_2$  lub  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  lub  $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Ca}$ .

Korzystnie jest, gdy dializę prowadzi się w temperaturze 25°C przez 3 godziny.

Korzystnie jest, gdy sterylizację prowadzi się tlenkiem etylenu (55°C) przez około 3 godziny.

Wytworzony wg wynalazku biomateriał kurdlanowy charakteryzuje się bardzo dobrymi właściwościami fizykochemicznymi oraz biologicznymi, zwłaszcza odznacza się zdolnością do pochłaniania du-

żej ilości płynów (porównywalną z dostępnymi na rynku materiałami wysokochłonnyymi; Adv. Skin. Wound. Care 2012, 25, 215–320), a w stanie mokrym uwalnia duże ilości jonów wapnia (ok. 240 mg/l). Ponadto zapewnia on transmisję pary wodnej na poziomie ok. 2100 g/m<sup>2</sup>/dzień (przyjmuje się, że poziom umożliwiający odpowiednie gojenie ran wynosi ok. 2000–2500 g/m<sup>2</sup>/dzień (J. Tissue Viability 2010, 19, 54–66)) oraz sprzyja żywotności i proliferacji fibroblastów *in vitro*.

Zdolność do pochłaniania dużej ilości płynów wynika ze sposobu wytwarzania biomateriału. Zamrażanie, a następnie liofilizacja sprawiają, że biomateriał jest całkowicie pozbawiony wody, zachowując swój kształt i strukturę – w wyglądzie biomateriał przypomina „suchą gąbkę”. Zdolność do uwalniania jonów wapnia wynika z faktu, że podczas procedury wytwarzania biomateriału, powstaje on w procesie dializy względem jonów Ca<sup>2+</sup> – jony te wnikają do wnętrza materiału – zatem materiał zawiera je w swojej strukturze, a następnie uwalnia je, gdy umieszcza się go w roztworze wodnym. Zdolność do transmisji pary wodnej wynika z faktu, że podczas wchłaniania płynów przez materiał całkowicie wysuszony, zmienia on strukturę na hydrożelową. Biomateriał w stanie mokrym – biomateriał hydrożelowy, umożliwia transmisję pary wodnej (umożliwia jej przepuszczanie) na poziomie, który zapewnia prawidłowe gojenie ran.

Proces dializy i dwuetapowe zamrażanie umożliwiają temu biomateriałowi uzyskanie korzystnych właściwości – jest zdolny do pochłaniania dużej ilości płynów oraz uwalniania dużych ilości jonów wapnia do środowiska. Ponadto poddanie go sterylizacji zwłaszcza tlenkiem etylenu sprawia, że zachowuje on swoje właściwości.

Przedmiot wynalazku ilustrują przedstawione poniżej przykłady.

#### Przykład 1

0,5 g kurdlanu dodano do 10 ml roztworu NaOH o stężeniu 0,3 M. Składniki mieszano, aż do całkowitego rozpuszczenia kurdlanu, tj. otrzymania jednolitego roztworu o stężeniu 5%. Otrzymany roztwór umieszczono w formie o kształcie koła o średnicy 2,2 cm, a następnie wkroplono 4 ml roztworu chlorku wapnia o stężeniu 20 g/l i poddawano dializie przez 2 godziny w temperaturze 25°C. Otrzymany hydrożel β-1,3-glukanowy (kurdlanowy) wyjęto z formy i umieszczono w wodzie dejonizowanej na 15 minut. Następnie hydrożel umieszczono w zamrażarce -20°C na 2 dni, a potem w zamrażarce -80°C na 2 godziny. Zamrożony biomateriał poddano suszeniu poprzez liofilizację w czasie 24 godzin. Po wysuszeniu biomateriał umieszczono w foliowych rękawach i poddano sterylizacji poprzez tlenek etylenu w temperaturze 55°C, 3 godziny, a następnie prowadzono 15-godzinną wentylację próbki w celu odprowadzenia resztek tlenu etylenu po procesie sterylizacji. Otrzymany w ten sposób biomateriał wykazuje pożądane właściwości, tj. posiada zdolność do pochłaniania dużej ilości płynów, uwalnia jony wapnia w środowisku wodnym, umożliwia transmisję pary wodnej, wzmacnia żywotność i sprzyja procesom proliferacji fibroblastów skóry *in vitro*.

#### Przykład 2

0,8 g kurdlanu dodano do 10 ml roztworu NaOH o stężeniu 0,3 M. Składniki mieszano, aż do całkowitego rozpuszczenia kurdlanu, tj. otrzymania jednolitego roztworu o stężeniu 8%. Otrzymany roztwór umieszczono w formie o kształcie koła o średnicy 2,2 cm, a następnie wkroplono 4 ml roztworu chlorku wapnia o stężeniu 50 g/l i poddawano dializie przez 3 godziny w temperaturze 25°C. Otrzymany hydrożel β-1,3-glukanowy (kurdlanowy) wyjęto z formy i umieszczono w wodzie dejonizowanej na 15 minut. Następnie hydrożel umieszczono w zamrażarce -20°C na 2 dni, a potem w zamrażarce -80°C na 2 godziny. Zamrożony biomateriał poddano suszeniu poprzez liofilizację w czasie 19 godzin. Po wysuszeniu biomateriał umieszczono w foliowych rękawach i poddano sterylizacji poprzez tlenek etylenu (55°C, 3 godziny, a następnie 15-godzinna wentylacja próbki w celu odprowadzenia resztek tlenu etylenu po procesie sterylizacji). Otrzymany w ten sposób biomateriał wykazuje pożądane właściwości, tj. posiada zdolność do pochłaniania dużej ilości płynów, uwalnia jony wapnia w środowisku wodnym, umożliwia transmisję pary wodnej, wzmacnia żywotność i sprzyja procesom proliferacji fibroblastów skóry *in vitro*.

#### Przykład 3

1,1 g kurdlanu dodano do 10 ml roztworu NaOH o stężeniu 0,3 M. Składniki mieszano, aż do całkowitego rozpuszczenia kurdlanu, tj. otrzymania jednolitego roztworu o stężeniu 11%. Otrzymany roztwór umieszczono w formie o kształcie koła o średnicy 4 cm, a następnie wkroplono 8 ml roztworu chlorku wapnia o stężeniu 20 g/l i poddawano dializie przez 3 godziny w temperaturze 25°C. Otrzymany hydrożel β-1,3-glukanowy (kurdlanowy) wyjęto z formy i umieszczono w wodzie dejonizowanej na 15 minut. Następnie hydrożel umieszczono w zamrażarce -20°C na 2 dni, a potem w zamrażarce -80°C na 2 godziny. Zamrożony biomateriał poddano suszeniu poprzez liofilizację w czasie 24 godzin. Po

wysuszeniu biomateriał umieszczono w foliowych rękawach i poddano sterylizacji poprzez tlenek etylenu (55°C, 3 godziny, a następnie 15-godzinna wentylacja próbki w celu odprowadzenia resztek tlenu etylenu po procesie sterylizacji). Otrzymany w ten sposób biomateriał wykazuje pożądane właściwości, tj. posiada zdolność do pochłaniania dużej ilości płynów, uwalnia jony wapnia w środowisku wodnym, umożliwia transmisję pary wodnej, wzmacnia żywotność i sprzyja procesom proliferacji fibroblastów skóry *in vitro*.

Wyniki badań dla biomateriału kurdlanowego 11% (w/v) wytworzonego według wynalazku przedstawiono w Tabeli 1.

T a b e l a 1. Wybrane właściwości fizykochemiczne i biologiczne biomateriału kurdlanowego wytwarzanego według wynalazku.

| Cecha                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | Biomateriał kurdlanowy wytwarzany według wynalazku                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Zdolność do pochłaniania płynów, na przykładzie płynu symulującego wysięk z rany (SWF). Zdolność tą wyrażono jako ilość (g) pochłoniętego płynu SWF przez gram biomateriału w trakcie 24 godz. inkubacji.                                                                                                                      | 7,93 ± 1,44 g/g<br>(dostępne na rynku biomateriały wykazują zdolność do pochłaniania płynów na poziomie od 5 g/g do 13 g/g [Adv. Skin. Wound. Care 2012, 25, 215-320])                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| Zdolność do uwalniania jonów wapnia do środowiska wodnego po 24-godz. inkubacji, na przykładzie płynu hodowlanego dedykowanego fibroblastom skóry. Ekstrakt z biomateriału przygotowano wg normy ISO 10993-5:2009.                                                                                                             | 242,30 ± 5,60 mg/l<br>(stężenie jonów wapnia ok. 4 razy wyższe niż w płynie hodowlanym)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| Zdolność do transmisji pary wodnej. Zdolność tą wyrażono jako ilość gram przepuszczanej pary wodnej przez m <sup>2</sup> biomateriału przez okres 1 dnia.                                                                                                                                                                      | 2091,00 ± 48,41 g/m <sup>2</sup> /dzień<br>(dla opatrunków umożliwiających odpowiednie gojenie zaleca się transmisję pary wodnej na poziomie 2000-2500 g/m <sup>2</sup> /dzień [J. Tissue Viability 2010, 19, 54-66])                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| Zdolność do wspierania żywotności fibroblastów skóry <i>in vitro</i> . Zdolność tą wyrażono jako procent żywotności komórek po inkubacji z ekstraktem pozyskanym z biomateriału wg normy ISO 10993-5:2009. Wynik na podstawie testu MTT.                                                                                       | 120,60% ± 3,70%                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| Zdolność do wspierania procesów proliferacji fibroblastów skóry <i>in vitro</i> . Zdolność tą oceniono poprzez barwienie cytoszkieletu (barwnik – falloidyna) oraz jąder komórkowych (barwnik – Hoechst33342) fibroblastów skóry po 3- i 5-dniowej inkubacji z ekstraktem pozyskanym z biomateriału wg normy ISO 10993-5:2009. | Obserwacje mikroskopowe wykazały, że morfologia fibroblastów skóry po 3- i 5-dniowej inkubacji z ekstraktem pozyskanym z biomateriału wytwarzanego według wynalazku była prawidłowa. Komórki były rozplaszczone, miały podłużny kształt i posiadały duże jądra oraz rozbudowany system cytoszkieletu.<br>Na podstawie obserwacji mikroskopowych stwierdza się również, że ilość komórek zarówno po 3- i 5-dniowej inkubacji z ekstraktem pozyskanym z biomateriału wytwarzanego według wynalazku była znacząco wyższa w porównaniu do ilości komórek rosnących w płynie hodowlanym. |

Przedstawione w Tabeli 1. wyniki wskazują, że wytworzony wg wynalazku biomateriał kurdlanowy, zapewnia dogodne warunki do gojenia się ran, stanowiąc nośnik jonów wapniowych. Wynalazek może być stosowany w medycynie regeneracyjnej, jako biomateriał opatrunkowy na sączące się rany.

### Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania wysoko chłonnego biomateriału opatrunkowego do zastosowań biomedycznych z wykorzystaniem roztworu  $\beta$ -1,3-glukanu (kurdlanu) w roztworze zasady sodowej, **znamienny tym**, że najpierw przygotowuje się 6–20% (w/v) roztwór  $\beta$ -1,3-glukanu, korzystnie 11% (w/v) w 0,1–0,5 M roztworze zasady sodowej (NaOH), korzystnie 0,3 M, po czym otrzymany roztwór poddaje się dializie w roztworze soli wapniowej o stężeniu od 5 g/l do 150 g/l, korzystnie 20 g/l w czasie 1–24 godziny/godziny, w temperaturze 19–30°C, a następnie umieszcza się w wodzie destylowanej lub dejonizowanej na 10–30 minut korzystnie na około 15 minut, tak otrzymany hydrożel  $\beta$ -1,3-glukanu umieszcza się w zamrażarce w temperaturze od -5°C do -40°C w czasie 2–5 dni, a następnie w temperaturze od -60°C do -195°C w czasie

- 2–8 godzin, po czym zamrożony biomateriał poddaje się suszeniu poprzez liofilizację, a następnie sterylizacji gazowej.
2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że hydrożel  $\beta$ -1,3-glukanu umieszcza się w temperaturze  $-20^{\circ}\text{C}$  w czasie 2 dni, a następnie w temperaturze  $-80^{\circ}\text{C}$ .
  3. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że liofilizację prowadzi się w czasie od 15–30 godzin korzystnie 19 do 26 godzin.
  4. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że przy prowadzeniu dializy stosuje się roztwory rozpuszczalnych w wodzie soli wapniowych jak:  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ,  $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Ca}$ .
  5. Sposób według wynalazku, **znamienny tym**, że otrzymany roztwór  $\beta$ -1,3-glukanu przed dializą umieszcza się w formach o pożądanym kształcie.
  6. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że dializę prowadzi się w temperaturze  $25^{\circ}\text{C}$  przez 3 godziny.
  7. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że sterylizację prowadzi się tlenkiem etylenu ( $55^{\circ}\text{C}$ ) korzystnie przez około 3 godziny.