

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10) **PL 243349 B1**

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **433194**

(22) Data zgłoszenia: **2020.03.11**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2021.09.13 BUP 24/2021**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2023.08.07 WUP 32/2023**

(51) MKP:

A61L 27/50 (2006.01)

A61L 27/54 (2006.01)

A61L 27/20 (2006.01)

C12N 5/02 (2006.01)

(73) Uprawniony z patentu:

POLITECHNIKA ŁÓDZKA, Łódź, PL

(72) Twórca(-y) wynalazku:

IRENEUSZ MAJSTEREK, Łódź, PL

ZOFIA MODRZEJEWSKA, Łódź, PL

KATARZYNA PIEKLARZ, Łódź, PL

MICHAŁ TYLMAN, Bełchatów, PL

(74) Pełnomocnik:

Ewa Kaczur-Kaczyńska, Łódź, PL

(54) Tytuł:

Sposób wytwarzania żeli chitozanowych formujących się w temperaturze ciała ludzkiego, przeznaczonych na rusztowania iniekcyjne do hodowli komórek nerwowych

PL 243349 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania żeli chitozanowych formujących się w temperaturze ciała ludzkiego, przeznaczonych na rusztowania iniekcyjne do hodowli komórek nerwowych.

Żele chitozanowe formujące się pod wpływem temperatury są atrakcyjnym materiałem, który może być wykorzystany jako rusztowanie do hodowli komórek nerwowych. Zainteresowanie tego typu rusztowaniami wynika z faktu, że przejście fazowe z zolu w żel następuje w fizjologicznej temperaturze ciała ludzkiego, co umożliwi wprowadzenie rusztowania w trudnodostępne miejsca drogą iniekcji.

Znane jest wytwarzanie hydro żeli chitozanowych, których przejście z zolu w żel następuje w fizjologicznej temperaturze ciała ludzkiego, z niskolepkich roztworów soli chitozanu, przy użyciu beta-glicerofosforanu sodu (Na- β -GP), alkoholu poliwinylowego oraz kwaśnego węgla sodu (czasopisma: *Chenite*2004, *Carbohydr Polymers* doi:10.1016/j.carbpol.015), *International Journal of Pharmaceutics* 414:6–15.

Żele tworzą również w oparciu o związki glukozy-1-fosforanu (G1-P) i glukozy-6-fosforanu (G6-P), a także z wolną od polioliu solą fosforanową, Na₂HPO₄ (czasopismo *Langmuir* 2013 29(32):10229–37. doi: 10.1021/la401993q).

Znane jest również wytwarzanie hydro żeli chitozanowych, których przejście z zolu w żel następuje w fizjologicznej temperaturze ciała ludzkiego, metodą enzymatyczną w wyniku obecności w roztworze soli chitozanowych mocznika i ureazy (czasopismo *Carbohydrate Polymers* doi: 10.1016/j.carbpol.2005.12.010).

W opisie patentowym PL 219576 ujawniono sposób wytwarzania termowrażliwego hydrożelu chitozanowego zawierającego wapń i fosfor, przeznaczonego na materiał na rusztowania, także wszczepialny, polegający na tym, że roztwór wodny chlorku, octanu, mleczanu, glutamianu lub mrówczanu chitozanu, otrzymany z chitozanu o stopniu deacetylacji powyżej 70%, o temperaturze poniżej 10°C łączy się w trakcie o mieszania z roztworem wodnym chlorku, azotanu lub fosforanu wapnia także o temperaturze poniżej 10°C i następnie z roztworem wodnym α , β lub α , β -glicerofosforanu, po czym odpowietrza i wytworzony żel odmywa się w wodzie lub w buforze o pH powyżej 6, o temperaturze powyżej 30°C bądź też schłodzony roztwór wodny soli chitozanu łączy się ze schłodzonym roztworem wodnym glicerofosforanu, odpowietrza i otrzymany żel po odmyciu w wodzie lub buforze umieszcza się w roztworze wodnym soli wapnia, po czym odmywa buforem o pH powyżej 6.

W opisie zgłoszenia patentowego P. 423822 ujawniono sposób wytwarzania termoodwracalnych żeli chitozanowych przeznaczonych na rusztowania iniekcyjne do hodowli osteoblastów, przechodzące z zolu w żel na skutek wzrostu temperatury (optymalnie w fizjologicznej temperaturze ciała ludzkiego), natomiast wraz ze spadkiem temperatury ponownie przechodzące w zol. Sposób otrzymywania tych żeli polega na tym, że do schłodzonego do temperatury 4°C roztworu wodnego octanu chitozanu, o stężeniu 1–2%, otrzymanego z chitozanu o masie cząsteczkowej 500 000 – 700 000, wprowadza się kroplami schłodzony do temperatury 4°C roztwór wodny β -glicerofosforanu wapnia o stężeniu 15–30%, po czym całość miesza się i odpowietrza w temperaturze poniżej 10°C w czasie 24 godzin. Roztwór octanu chitozanu sporządza się z chitozanu o stopniu deacetylacji 80–90%.

Z czasopisma *Procedia Engineering*, 59, 2013, 226–232 znane są także żele do regeneracji rdzenia kręgowego, formujące się w temperaturze ciała ludzkiego, wytwarzane z mleczanu chitozanu z udziałem β -glicerofosforanu sodu.

W publikacji w czasopiśmie internetowym *Scientific Reports*, 2019; 9: 6402. doi: 10.1038/s41598-019-42848 do regeneracji rdzenia kręgowego wykorzystano żele chitozanowe wytwarzane z chlorku chitozanu z udziałem β -glicerofosforanu sodu z immobilizowanymi komórkami macierzystymi.

W procesie regeneracji nerwów często wykorzystuje się związki urydyny i cytydyny. Nukleotydy bądź ich kombinacje są związkami stosowanymi do regeneracji nerwów poprzez dozowanie doustne (czasopisma: *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2011 oraz *Neuroscience and Behavioral Physiology* 45(7):S20-S25, 2015 DOI: 10.1007/s11055-015-0149-xJ Pain Res. 2017 Feb 15;10:397–404. doi:10.2147/JPR.S 123045;). Z czasopisma *Brain Research Reviews*, 2006, 52(2):389–97) wiadomo, iż przyczyniają się one do syntezy fosfatydylocholin i fosfatydyloetanolaminy.

Z czasopisma *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 2016;35(3): 114–29. doi: 10.1080/15257770.2015.1114132 znane jest wytwarzanie żeli chitozanowych z pochodnymi urydyny (oUrd) i monofosforanu urydyny (oUMP), połączonymi z aldehydem glutarowym (AG), ale są to żele nie wykazujące zdolności przejścia z zolu w żel pod wpływem temperatury i wymagają zastosowania dodatkowego środka sieciującego AG. Nukleotyd w postaci monofosforanu cytydyny został wykorzystany

do tworzenia żeli z hydroksytlenkiem żelaza β -FeOOH (czasopismo *New Journal of Chemistry*, 2019 DOI: 10.1039/c9nj02949d).

Natomiast z czasopisma *Macromolecular Research*, 2006, 14, 4 wiadomo, iż badany był proces adsorpcji monofosforanu cytydyny na pochodnej β -cyklodekstryny (karboksymetylo- β -cyklodekstrynie) syntetyzowanej z chitozanem.

Z opisu zgłoszenia patentowego P. 424971 jest znany sposób wytwarzania żeli chitozanowych, formujących się w temperaturze ciała ludzkiego, przeznaczonych na rusztowania iniekcyjne do hodowli komórek nerwowych, polegający na wprowadzeniu do schłodzonego do temperatury 4°C roztworu wodnego octanu, chlorku, mleczanu chitozanu, o stężeniu 2–5% wagowych, sporządzonego z chitozanu o stopniu deacetylacji powyżej 70% i o masie cząsteczkowej 500 000 – 700 000 u, kroplami schłodzonego także do temperatury 4°C roztworu wodnego pochodnej kwasu fosforowego w postaci roztworu wodnego soli disodowej 5'-monofosforanu urydyny o stężeniu 80–100% wagowych, użytego w ilości 1–2 ml na 16 ml roztworu soli chitozanu, zmieszaniu składników i odpowietrzeniu w temperaturze 4°C w czasie 24 godzin powstałego zolu przechodzącego w postać żelu w temperaturze ciała ludzkiego. Do roztworu soli chitozanu, przed wprowadzeniem roztworu soli 5'-monofosforanu urydyny, wprowadza się także środki wspomagające regenerację nerwów, jak kobalamina, kwas liponowy, tlenek grafenu.

Sposób według wynalazku rozwiązuje problem wprowadzenia do struktury żelu chitozanowego zamiast bądź oprócz monofosforanu urydyny zawierającego jako zasadę pirymidynową uracyl czyli związek zawierający grupy aminowe NH, związku zawierającego zasadę pirymidynową zawierającą grupę aminową NH₂ oraz o jeden więcej atom azotu niż uracyl. Obecność tych grup wpływa korzystnie na wzrost aksonów, co wynika z badań nad funkcjonalizowaniem rusztowań białkami. Aplikacja do organizmu pacjenta rusztowania modyfikowanego aminokwasami powoduje stopniowe uwalnianie aminokwasów, które są dla komórek substancjami odżywczymi oraz wpływają na zwiększoną adhezję komórek do materiału, (m.in. publikacja *Trendy i rozwiązania technologiczne: odpowiedź na potrzeby współczesnego społeczeństwa t. 1, 2017*, Wydawnictwo Naukowe TYGIEL, ISBN 978-83-65598-58-5, 232 s. *Polidepsipeptydy w inżynierii tkankowej*).

Sposób wytwarzania żeli chitozanowych, formujących się w temperaturze ciała ludzkiego, przeznaczonych na rusztowania iniekcyjne do hodowli komórek nerwowych, polegający na wprowadzeniu do schłodzonego do temperatury 4°C roztworu wodnego soli chitozanu, jak octan, chlorek lub mleczan chitozanu o stężeniu 2–5% wagowych, sporządzonej z chitozanu o stopniu deacetylacji 75–90% i o masie cząsteczkowej 500 000 – 700 000, najpierw środka wspomagającego regenerację nerwów, jak kobalamina w ilości 30–70 μ g/ml roztworu soli chitozanu, kwas liponowy w ilości 0,005–0,015 g/ml roztworu soli chitozanu lub tlenek grafenu w ilości 0,002–0,003 mg/ml roztworu soli chitozanu, a następnie kroplami schłodzonego także do temperatury 4°C roztworu wodnego soli disodowej nukleotydu o stężeniu 80–100% wagowych w ilości 1–2 ml na 16 ml roztworu soli chitozanu, zmieszaniu składników i odpowietrzeniu w temperaturze 4°C w czasie 24 otrzymanej w postaci zolu mieszaniny roztworu soli chitozanu z roztworem nukleotydu, wykazującej zdolność przejścia w postać żelu w temperaturze ciała ludzkiego, **według wynalazku** charakteryzuje się tym, że jako roztwór wodny soli disodowej nukleotydu stosuje się roztwór wodny soli disodowej 5'-monofosforanu cytydyny lub roztwór wodny mieszaniny soli disodowej 5'-monofosforanu cytydyny z solą disodową 5'-monofosforanu urydyny zawierającej 0,09–1 g soli cytydyny / 1 g mieszaniny soli cytydyny i soli urydyny.

Sposób według wynalazku ilustrują poniższe przykłady.

Przykład 1

200 mg chitozanu o stopniu deacetylacji DD=78% i masie cząsteczkowej MW=680000 rozpuszczono w 20 ml 0,1M roztworu wodnego kwasu octowego i pozostawiono na 24 godziny w temperaturze pokojowej w celu całkowitego rozpuszczenia polisacharydu, po czym dodano roztwór 500 μ g kobaltoaminy w 1 ml wody destylowanej. Uzyskany roztwór schładzano w ciągu 2-óch godzin do temperatury 4°C. Następnie przygotowano roztwór 0,4 g soli disodowej 5'-monofosforanu urydyny i 0,3 g soli disodowej 5'-monofosforanu cytydyny w 1 ml wody destylowanej i uzyskaną zawiesinę schładzano w ciągu 2 godzin do temperatury 4°C, po czym wprowadzano kropla po kropli do schłodzonego roztworu octanu chitozanu. Po dokładnym wymieszaniu całości przygotowaną próbkę pozostawiono w warunkach chłodniczych w temperaturze 4°C w czasie 24 godzin w celu całkowitego pozbycia się pęcherzy powietrznych. Otrzymana mieszanina roztworu soli chitozanu z roztworem soli disodowej 5'-monofosforanu cytydyny i roztworem soli disodowej 5'-monofosforanu urydyny miała postać zolu, który w temperaturze 37°C przybrał postać żelu. Powstały żel posiadał strukturę amorficzną, porowatość powyżej 94%, pory o rozmiarach rzędu 20 μ m.

Przykład 2

200 mg chitozanu o stopniu deacetylacji DD=90% i masie cząsteczkowej MW=420000 rozpuszczono w 20 ml 0,1M roztworu wodnego kwasu mlekowego i pozostawiono na 24 godziny w temperaturze pokojowej w celu całkowitego rozpuszczenia polisacharydu. Uzyskany roztwór schładzano w ciągu 2-óch godzin do temperatury 4°C. Następnie przygotowano roztwór 1,1 g soli disodowej 5'-monofosforanu cytydyny w 1 ml wody destylowanej i uzyskaną zawiesinę schładzano w ciągu 2 godzin do temperatury 4°C, po czym wprowadzano kropla po kropli do schłodzonego roztworu octanu chitozanu. Po dokładnym wymieszaniu całości przygotowaną próbkę pozostawiono w warunkach chłodniczych w temperaturze 4°C w czasie 24 godzin w celu całkowitego pozbycia się pęcherzy powietrznych. Otrzymana mieszanina roztworu soli chitozanu z roztworem soli disodowej 5'-monofosforanu cytydyny miała postać zolu, który w temperaturze 37°C przybrał postać żelu. Powstały żel posiadał strukturę amorficzną, porowatość powyżej 95%, pory o rozmiarach rzędu 20–50 µm.

Zastrzeżenie patentowe

1. Sposób wytwarzania żeli chitozanowych, formujących się w temperaturze ciała ludzkiego, przeznaczonych na rusztowania iniekcyjne do hodowli komórek nerwowych, polegający na wprowadzeniu do schłodzonego do temperatury 4°C roztworu wodnego soli chitozanu, jak octan, chlorek lub mleczan chitozanu o stężeniu 2–5% wagowych, sporządzonej z chitozanu o stopniu deacetylacji 75–90% i o masie cząsteczkowej 500000–700000, najpierw środka wspomagające regenerację nerwów, jak kobalamina w ilości 30–70 µg/ml roztworu soli chitozanu, kwas liponowy w ilości 0,005–0,015 g/ml roztworu soli chitozanu lub tlenek grafenu w ilości 0,002–0,003 mg/ml roztworu soli chitozanu, a następnie kroplami schłodzonego także do temperatury 4°C roztworu wodnego soli disodowej nukleotydu o stężeniu 80–100% wagowych w ilości 1–2 ml na 16 ml roztworu soli chitozanu, zmieszaniu składników i odpowietrzeniu w temperaturze 4°C w czasie 24 otrzymanej w postaci zolu mieszaniny roztworu soli chitozanu z roztworem nukleotydu, wykazującej zdolność przejścia w postać żelu w temperaturze ciała ludzkiego, **znamienny tym**, że jako roztwór wodny soli disodowej nukleotydu stosuje się roztwór wodny soli disodowej 5'-monofosforanu cytydyny lub roztwór wodny mieszaniny soli disodowej 5'-monofosforanu cytydyny z solą disodową 5'-monofosforanu urydyny zawierającej 0,09–1 g soli cytydyny / 1 g mieszaniny soli cytydyny i soli urydyny.