

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10)

PL 242473 B1

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **430457**

(22) Data zgłoszenia: **2019.07.01**

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

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2023.02.27 WUP 09/2023**

(51) MKP:

A61L 15/28 (2006.01)

A61L 15/42 (2006.01)

A61L 15/44 (2006.01)

A61L 15/60 (2006.01)

A61P 17/02 (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,
Kolonja Miłoszewice, PL**

(74) Pełnomocnik:

Anna Bełz, Lublin, PL

(54) Tytuł:

Kriożelowy materiał opatrunkowy na rany na bazie chitozanu i agarozy oraz sposób jego wytwarzania

PL 242473 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest kriożelowy, piankowy materiał opatrunkowy na rany na bazie chitozanu i agarozy do zastosowań w medycynie regeneracyjnej oraz sposób jego wytwarzania.

Gojenie ran jest dynamicznym i złożonym procesem, który wymaga odpowiedniego środowiska wspierającego proces regeneracji. W zależności od typu rany należy zastosować odpowiedni materiał opatrunkowy, który będzie spełniać stosowne wymagania, m.in.: zapewniać i utrzymywać wilgotne środowisko, stymulować migrację naskórka, wspierać angiogenezę i syntezę tkanki łącznej, umożliwiać wymianę gazową między zranioną tkanką a środowiskiem zewnętrznym, zapewniać ochronę przed infekcjami bakteryjnymi. Ponadto opatrunek powinien być nietoksyczny, nie uczulać oraz nie przylegać (przysychać) dołożyska rany (Dhivya i wsp., *BioMedicine*, 2015, 5(4):22; Gonzalez i wsp., *An Bras Dermatol*, 2016, 91(5):614–20).

Wraz z rozwojem technologii i nauki, na rynku farmaceutycznym pojawiły się różnorodne rodzaje materiałów opatrunkowych (biologiczne, syntetyczne, biologiczno-syntetyczne). Bardzo często strategię opracowywania nowych materiałów opatrunkowych opierają się na wykorzystaniu naturalnych polisacharydów ze względu na ich cenne właściwości biologiczne oraz szeroką dostępność. Chitozan jest naturalnym kationowym polimerem otrzymywanym z chityny. Chitozan jest rozpuszczalny w kwaśnym środowisku wodnym i często wykorzystywany do przygotowania hydrożeli, folii, włókna lub gąbek – zatem większości biomateriałów stosowanych w inżynierii biomedycznej, dla której biokompatybilność jest cechą kluczową. Do najważniejszych cech chitozanu zalicza się: biokompatybilność, brak toksyczności, biodegradowalność, zdolność przyspieszania procesu gojenia ran, zdolność zatrzymywania płynów oraz właściwości przeciwbakteryjne (Rinaudo, *Prog Polym Sci*, 2006, 31(7):603–32). Ponadto, chitozan jest w stanie tworzyć wiązania wodorowe z innymi polimerami ze względu na obecność grup polarnych takich jak -OH i -NH₂ (Chaudhary i wsp., *ACS App Mater Interface*, 2015, 7(44):24957–62). Z tego względu chitozan został również z powodzeniem wykorzystany w kombinacji z różnymi naturalnymi i syntetycznymi polimerami, takimi jak alginy, kolagen, kwas hialuronowy, agaroza, celuloza, skrobia, żelatyna, polikaprolakton, kwas polimlekowy i alkohol poliwinylowy (Lewandowska i wsp., *Inter J Biol Macromol*, 2014, 65:534–41; Zheng i wsp., *Macromol Biosci*, 2014, 14(5):655–66; Lewandowska i wsp., *J Molec Liq*, 2015, 212:879–84). Agaroza to naturalny polisacharyd, który charakteryzuje się biokompatybilnością, biodegradowalnością, brakiem immunogenności oraz wysoką zdolnością absorpcji cieczy. Ponadto, struktura usieciowanej agarozy zapewnia odpowiednie przenikanie gazów, w tym tlenu. Wymienione powyżej właściwości agarozy, sprawiają, że stanowi ona godny zainteresowania naturalny polisacharyd do zastosowań jako matryca materiału opatrunkowego (Zarrintaj P. i wsp., *Carbohydr Polym*, 2018, 187:66–84).

Wynalazek rozwiązuje zagadnienie otrzymywania kriożelowego, piankowego, porowatego, chłonnego biomateriału na bazie chitozanu i agarozy, który będzie absorbował wysięk z rany oraz zatrzymywał go w obrębie struktury opatrunku.

Dotychczas nie został opracowany kriożelowy materiał opatrunkowy na bazie chitozanu i agarozy, mający postać chłonnej, cienkiej pianki. W dostępnej literaturze naukowej z zakresu medycyny regeneracyjnej istnieją wyłącznie doniesienia opisujące sposób produkcji oraz przypuszczalne zastosowanie materiałów na bazie chitozanu i agarozy, mających postać kriożelowych trójwymiarowych rusztowań, hydrożeli do miejscowych wstrzykiwań lub hydrożelowych nośników leków. Celem wynalazku jest otrzymanie kriożelowego, piankowego materiału opatrunkowego na rany na bazie chitozanu i agarozy, który – ze względu na cenne właściwości biologiczne wchodzących w jego skład polisacharydów – będzie wspierał proces gojenia.

Z chińskiego opisu patentu nr CN107096062 (A) znany jest sposób otrzymywania materiału opatrunkowego na bazie agarozy i karageniny do zastosowań w leczeniu powierzchniowych ran. Sposób otrzymywania polega na rozprowadzeniu karageniny w roztworze wodnym agarozy o temperaturze 75–90°C, a następnie suszeniu lub zamrożeniu i liofilizacji.

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 bandaży 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.

Znany jest sposób otrzymywania kriożelowego, trójwymiarowego rusztowania z chitozanu i agarozy przeznaczonego do naprawy tkanek miękkich. Sposób otrzymywania biomateriału polega na tym, że do wodnego roztworu agarozy o temperaturze 95°C dodaje się roztwór chitozanu przygotowany w 2% kwasie octowym, otrzymaną masę przekłada się do formy, zamraża w -20°C i liofilizuje (Felfel i wsp., *Carbohydr Polym*, 2019, 204:59–67).

Znany jest sposób wytwarzania trójwymiarowego rusztowania na bazie chitozanu, agarozy i żelatyny do zastosowań w inżynierii tkankowej, w tym do regeneracji tkanki chrzęstnej. Sposób produkcji biomateriału obejmuje rozpuszczenie chitozanu w 1% wodnym roztworze kwasu octowego, dodanie żelatyny, zmieszanie powstałego roztworu z wodnym roztworem agarozy o temperaturze 50°C, a następnie dodanie aldehydu glutarowego (środka sieciującego). Powstały roztwór przelewa się do strzykawek i inkubuje 16 godzin w łaźni chłodzącej w temperaturze -12°C. Po inkubacji żele rozmraża się w wodzie dejonizowanej w temperaturze pokojowej, przemywa wodą dejonizowaną i suszy na powietrzu (Bhat i wsp., *J R Soc Interface*, 2010, 8(57):540–54; Bhat i wsp., *J Biosci Bioeng*, 2012, 114(6): 663–70).

Znany jest sposób wytwarzania kriożelowego rusztowania na bazie chitozanu i agarozy do zastosowań w inżynierii tkanki chrzęstnej, polegający na dodaniu roztworu chitozanu w kwasie octowym do wodnego roztworu agarozy przygotowanego w temperaturze 90°C, a następnie zamrożeniu otrzymanej mieszaniny w temperaturze -80°C i liofilizacji (Merlin Rajesh Lal i wsp., *J Biomed Mater Res Part A*, 2017, 105A: 1845–55).

Przedmiotem wynalazku jest kriożelowy, piankowy materiał opatrunkowy na rany otrzymany z chitozanu i agarozy, charakteryzujący się tym, że chitozan jest rozpuszczony w 0,5% (v/v) wodnym roztworze kwasu octowego a agarozę w 0,1% (w/v) wodnym roztworze zasady sodowej, przy czym proporcje wagowe stałych komponentów wynoszą odpowiednio 2–4% korzystnie 3% (w/v) chitozanu w odniesieniu do kwasu octowego i 4% (w/v) agarozy w odniesieniu do zasady sodowej a ponadto komponenty przygotowane w odpowiednich roztworach są ze sobą zmieszane w stosunku 1:1 (v:v), dając końcowe stężenie w finalnym produkcie 1–2% (w/v) chitozanu i 2% (w/v) agarozy.

Korzystnie, gdy wynalazek zawiera dodatkowo oprócz chitozanu i agarozy, w ilościach wcześniej opisanych, substancje bioaktywne takie jak witaminy, antybiotyki, hydrokortyzon, kurkuminę. Korzystnie gdy wynalazek jako witaminy zawiera witaminę C oraz witaminę E, zaś jako antybiotyki zawiera wankomycynę, gentamycynę, daptomycynę, tygocyklinę.

Sposób wytwarzania piankowego materiału opatrunkowego według wynalazku polega na tym, że do 2–4% korzystnie 3% (w/v) roztworu chitozanu przygotowanego w 0,5% (v/v) wodnym roztworze kwasu octowego dodaje się w stosunku 1:1 (v:v) 4% (w/v) zawiesinę agarozy przygotowaną w 0,1% (w/v) wodnym roztworze zasady sodowej, całość miesza się na mieszadło magnetycznym z płytą grzejącą w temperaturze 70–90°C, korzystnie 75°C, przez 10–25 minut lub do całkowitego rozpuszczenia agarozy, a następnie mieszaninę przekłada się do formy, studzi w temperaturze 4–8°C, ostudzoną próbkę umieszcza się w zamrażarce w temperaturze od -60 do -80°C na okres 1–2 godzin, po czym zamrożony materiał poddaje się procesowi liofilizacji do momentu całkowitego wysuszenia próbki.

Korzystnie, gdy do powstałej mieszaniny komponentów dodaje się związki bioaktywne jak witaminy, antybiotyki, hydrokortyzon, kurkuminę. Korzystnie gdy stosuje się witaminę C (kwas askorbinowy) w ilości 0,05–2 mg na 1 ml mieszaniny chitozan/agaroza lub/i witaminę E w ilości 0,05–2 mg na 1 ml mieszaniny chitozan/agaroza lub/i hydrokortyzon w ilości 1–20 µg na 1 ml mieszaniny chitozan/agaroza lub/i kurkuminę w ilości 0,5–50 mg na 1 ml mieszaniny chitozan/agaroza lub/i gentamycynę w ilości 1–20 µg na 1 ml mieszaniny chitozan/agaroza lub/i wankomycynę w ilości 1–20 µg na 1 ml mieszaniny chitozan/agaroza lub/i daptomycynę w ilości 0,5–10 µg na 1 ml mieszaniny chitozan/agaroza lub/i tygocyklinę w ilości 0,5–10 µg na 1 ml mieszaniny chitozan/agaroza.

Otrzymany według wynalazku biomateriał może znaleźć zastosowanie jako porowaty, chłonny opatrunek na rany z obfitym wysiękiem, którego powierzchnia kontaktowa nie przysycha dołożyska rany, minimalizując ryzyko uszkodzenia nowo powstałych tkanek.

Opracowana według wynalazku metoda wytwarzania kriożelowego materiału opatrunkowego, wykorzystująca neutralizację kwaśnego roztworu chitozanu za pomocą zasadowej zawiesiny agarozy, jest metodą dotychczas niestosowaną w procesie tworzenia biomateriałów, ze względu na dobrze znany mechanizm żelowania i wytrącania się kwaśnego roztworu chitozanu w środowisku zasado-

wym. Wszystkie opisane dotychczas metody produkcji materiałów agarozowo-chitozanowych zakładają zmieszanie wodnego roztworu agarozy z kwaśnym roztworem chitozanu lub dodanie proszku agarozowego do kwaśnego roztworu chitozanu. Sposób produkcji materiału według wynalazku zakłada dodanie zawiesiny agarozy w zasadzie sodowej do kwaśnego roztworu chitozanu. Sposób produkcji jest unikatowy, ponieważ uwzględnia takie stężenia poszczególnych komponentów (chitozanu i agarozy) oraz rozpuszczalników (kwasu octowego i zasady sodowej), które umożliwiają neutralizację kwaśnego roztworu chitozanu z jednoczesnym zachowaniem jednolitej mieszaniny bez znamion strącenia/zżelowania chitozanu. Nowością jest również możliwość dodawania (immobilizowania metodą pułapkowania) na etapie produkcji związków bioaktywnych: antybiotyków, hormonów, witamin czy ekstraktów roślinnych.

Zaletą opracowanego według wynalazku sposobu wytwarzania piankowego materiału opatrunkowego na rany jest otrzymanie porowatego, chłonnego biomateriału, który będzie absorbował wysięk z rany oraz zatrzymywał go w obrębie struktury opatrunku, co będzie zapewniać odpowiednią wilgotność środowiska rany, zapobiegając tworzeniu się strupów. Ponadto porowata struktura kriożelowego materiału będzie ułatwiać wymianę gazową między zranioną tkanką a środowiskiem zewnętrznym. Ważną cechą materiału opatrunkowego według wynalazku, jest jego biodegradowalność, brak toksyczności w stosunku do komórek eukariotycznych oraz powierzchnia materiału uniemożliwiająca adhezję fibroblastów skóry, dzięki czemu opatrunek może być usunięty bez naruszenia łożyska rany, zapobiegając tworzeniu się nieestetycznych blizn. Ponadto, alternatywny sposób produkcji piankowego materiału opatrunkowego, umożliwia stopniowe uwalnianie substancji bioaktywnych (np. witamina C, witamina E, kurkumina, antybiotyki, hydrokortyzon) w miejscu zranienia, znacząco przyspieszając regenerację skóry oraz chroniąc łożysko rany przed infekcjami.

Kriożelowy materiał opatrunkowy będący przedmiotem wynalazku, ze względu na swoje właściwości strukturalne i biologiczne będzie zapewniał odpowiednie warunki wspierające gojenie rany. Opracowany materiał opatrunkowy może znaleźć zastosowanie w medycynie regeneracyjnej jako chłonny, piankowy opatrunek na rany wysiękowe, którego zastosowanie jest szczególnie pożądane w fazie oczyszczania i silnego wydzielania z rany. Powierzchnia kontaktowa materiału opatrunkowego według wynalazku nie sprzyja adhezji fibroblastów, zatrzymuje wysięk oraz utrzymuje wilgotne środowisko, dzięki czemu nie będzie przysychać do łożyska rany, minimalizując ryzyko uszkodzenia nowo powstałych tkanek podczas zmiany opatrunku.

Przedmiot wynalazku ilustrują przedstawione poniżej przykłady:

Przykład I

Do 0,06 g chitozanu dodano 2 ml 0,5% (v/v) wodnego roztworu kwasu octowego i mieszano do uzyskania jednolitej masy. Do 0,08 g agarozy dodano 2 ml 0,1% (w/v) zasady sodowej i mieszano w celu uzyskania jednolitej masy. Oba przygotowane roztwory połączono i mieszano przez 15 minut na mieszadle magnetycznym w temperaturze 75°C, po czym masę umieszczono w płaskiej formie (o powierzchni 6 cm² i grubości 2,5 mm), ostudzono w temperaturze 6°C, po czym próbkę umieszczono w zamrażarce w temperaturze -80°C na okres 1 godziny. Zamrożoną próbkę poddano procesowi liofilizacji w średniej próżni (6×10^{-2} mbar) przez okres 16 godzin.

Otrzymany biomateriał charakteryzuje się porowatą, chłonną strukturą, jest biodegradowalny, nietoksyczny oraz zapobiega adhezji fibroblastów skóry do jego powierzchni.

Przykład II

Do 0,02 g chitozanu dodano 1 ml 0,5% (v/v) wodnego roztworu kwasu octowego i mieszano do uzyskania jednolitej masy. Do 0,04 g agarozy dodano 1 ml 0,1% (w/v) zasady sodowej i mieszano w celu uzyskania jednolitej masy. Oba przygotowane roztwory połączono i mieszano przez 10 minut na mieszadle magnetycznym w temperaturze 70°C. Mieszaninę ostudzono do temperatury 45°C, dodano 25 µl roztworu witaminy C (kwasu 3-o-etylo-L-askorbinowego) o stężeniu 24 mg/ml (końcowe stężenie w materiale 300 µg/ml) i 5 µl roztworu hydrokortyzonu o stężeniu 4 mg/ml (końcowe stężenie w materiale 10 µg/ml), po czym masę umieszczono w płaskiej formie (o powierzchni 3 cm² i grubości 2,5 mm), ostudzono w temperaturze 8°C, po czym próbkę umieszczono w zamrażarce w temperaturze -75°C na okres 2 godzin. Zamrożoną próbkę poddano procesowi liofilizacji w średniej próżni (6×10^{-2} mbar) przez okres 16 godzin.

Otrzymany biomateriał charakteryzuje się porowatą, chłonną strukturą, uwalnia związki bioaktywne, jest biodegradowalny, nietoksyczny oraz zapobiega adhezji fibroblastów skóry do jego powierzchni.

Przykład III

Do 0,03 g chitozanu dodano 1 ml 0,5% (v/v) wodnego roztworu kwasu octowego i mieszano do uzyskania jednolitej masy. Do 0,04 g agarozy dodano 1 ml 0,1% (w/v) zasady sodowej i mieszano w celu uzyskania jednolitej masy. Oba przygotowane roztwory połączono i mieszano przez 15 minut na mieszadle magnetycznym w temperaturze 75°C. Mieszaninę ostudzono do temperatury 50°C, dodano 3 mg witaminy E (końcowe stężenie w materiale 1,5 mg/ml) i 5 µl roztworu antybiotyku (wankomycyny, gentamycyny, daptomycyny lub tygecykliny) o stężeniu 4 mg/ml (końcowe stężenie w materiale 10 µg/ml), po czym masę umieszczono w płaskiej formie (o powierzchni 3 cm² i grubości 2,5 mm), ostudzono w temperaturze 6°C, po czym próbkę umieszczono w zamrażarce w temperaturze -80°C na okres 1 godziny. Zamrożoną próbkę poddano procesowi liofilizacji w średniej próżni (6×10^{-2} mbar) przez okres 16 godzin.

Otrzymany biomateriał charakteryzuje się porowatą, chłonną strukturą, uwalnia związki bioaktywne, jest biodegradowalny, nietoksyczny oraz zapobiega adhezji fibroblastów skóry do jego powierzchni.

Przykład IV

Do 0,03 g chitozanu dodano 1 ml 0,5% (v/v) wodnego roztworu kwasu octowego i mieszano do uzyskania jednolitej masy. Do 0,04 g agarozy dodano 1 ml 0,1% (w/v) zasady sodowej i mieszano w celu uzyskania jednolitej masy. Oba przygotowane roztwory połączono i mieszano przez 10 minut na mieszadle magnetycznym w temperaturze 80°C. Mieszaninę ostudzono do temperatury 60°C, dodano 30 mg kurkuminy (końcowe stężenie w materiale 15 mg/ml), po czym masę umieszczono w płaskiej formie (o powierzchni 3 cm² i grubości 2,5 mm), ostudzono w temperaturze 4°C, po czym próbkę umieszczono w zamrażarce w temperaturze -70°C na okres 2 godzin. Zamrożoną próbkę poddano procesowi liofilizacji w średniej próżni (6×10^{-2} mbar) przez okres 16 godzin.

Otrzymany biomateriał charakteryzuje się porowatą, chłonną strukturą, uwalnia związki bioaktywne, jest biodegradowalny, nietoksyczny oraz zapobiega adhezji fibroblastów skóry do jego powierzchni.

Zastrzeżenia patentowe

1. Kriożelowy materiał opatrunkowy na bazie chitozanu i agarozy, **znamienny tym**, że stanowi go chitozan rozpuszczony w 0,5% (v/v) wodnym roztworze kwasu octowego oraz agarozę rozpuszczoną w 0,1% (w/v) wodnym roztworze zasady sodowej, przy czym proporcje wagowe stałych komponentów wynoszą odpowiednio 2–4% korzystnie 3% (w/v) chitozanu w odniesieniu do kwasu octowego i 4% (w/v) agarozy w odniesieniu do zasady sodowej a komponenty są ze sobą zmieszane w stosunku 1:1 (v:v) zachowując końcowe stężenie w finalnym produkcie 1–2% (w/v) chitozanu i 2% (w/v) agarozy.
2. Kriożelowy materiał opatrunkowy według zastrz. 1, **znamienny tym**, że zawiera substancje bioaktywne takie jak witaminy, antybiotyki, hydrokortyzon, kurkumę, gdzie jako witaminy zawiera witaminę C oraz witaminę E, zaś jako antybiotyki zawiera wankomycynę, gentamycynę, daptomycynę, tygecyklinę.
3. Sposób wytwarzania kriożelowego materiału opatrunkowego na bazie chitozanu i agarozy, **znamienny tym**, że do 2–4% korzystnie 3% (w/v) roztworu chitozanu przygotowanego w 0,5% (v/v) wodnym roztworze kwasu octowego dodaje się 4% (w/v) zawiesinę agarozy przygotowaną w 0,1% (w/v) wodnym roztworze zasady sodowej, przy czym oba komponenty występują w stosunku 1:1 (v:v), całość miesza się w temperaturze 70–90°C, korzystnie 75°C, przez 10–25 minut lub do całkowitego rozpuszczenia agarozy, a następnie mieszaninę studzi się w temperaturze 4–8°C, a ostudzoną próbkę zamraża się w temperaturze od -60 do -80°C, po czym zamrożony materiał poddaje się procesowi liofilizacji.
4. Sposób według zastrz. 3, **znamienny tym**, że otrzymaną mieszaninę komponentów doprowadza się do temperatury 45–65°C i dodaje się związki bioaktywne jak witaminy, antybiotyki, hydrokortyzon, kurkuminę, przy czym korzystnie jako witaminy stosuje się witaminę C oraz witaminę E, zaś jako antybiotyki wankomycynę, gentamycynę, daptomycynę, tygecyklinę.

5. Sposób według zastrz. 4, **znamienny tym**, że związki bioaktywne stosuje się w następujących ilościach: witaminę C (kwasu askorbinowy) w ilości 0,05–2 mg na 1 ml mieszaniny chitozan/agaroz lub/i witaminę E w ilości 0,05–2 mg na 1 ml mieszaniny chitozan/agaroz lub/i hydrokortyzon w ilości 1–20 μg na 1 ml mieszaniny chitozan/agaroz lub/i kurkuminę w ilości 0,5–50 mg na 1 ml mieszaniny chitozan/agaroz lub/i gentamycynę w ilości 1–20 μg na 1 ml mieszaniny chitozan/agaroz lub/i wankomycynę w ilości 1–20 μg na 1 ml mieszaniny chitozan/agaroz lub/i daptomycynę w ilości 0,5–10 μg na 1 ml mieszaniny chitozan/agaroz lub/i tygecyklinę w ilości 0,5–10 μg na 1 ml mieszaniny chitozan/agaroz.