



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **20134** (13) **U**
(51) МПК (2006)
A61L 27/00МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ**ОПИС
ДО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ**видається під
відповідальність
власника
патенту**(54) ПОЛІМЕРНИЙ ГІДРОГЕЛЬ БІОМЕДИЧНОГО ПРИЗНАЧЕННЯ**

1

2

(21) u200607474

(22) 05.07.2006

(24) 15.01.2007

(46) 15.01.2007, Бюл. № 1, 2007 р.

(72) Самченко Юрій Маркович, Лукаш Любов Леонідівна, Косенко Ольга Олександрівна, Ульберг Зоя Рудольфівна, Рубан Тетяна Опанасівна, Козинець Георгій Павлович

(73) Самченко Юрій Маркович, Лукаш Любов Леонідівна, Косенко Ольга Олександрівна, Ульберг Зоя Рудольфівна, Рубан Тетяна Опанасівна, Козинець Георгій Павлович

(57) 1. Полімерний гідрогель біомедичного призначення, що містить ланки гідрофільного мономера і дисперсійне середовище, який **відрізняється** тим, що додатково містить зшиті ланки гідрофобних

мономерів, ненасичених кислот та лікарські препарати, а як дисперсійне середовище - культуральне середовище при наступному вмісті компонентів, мас. %:

зшитий кополімер на основі гідрофільного мономера, гідрофобного мономера, ненасиченої кислоти та біфункціонального мономера	2,0-70,0
лікарський препарат	0,001-5
культуральне середовище з мікрооб'єктами	решта до 100.

2. Полімерний гідрогель біомедичного призначення за п. 1, який **відрізняється** тим, що як мікрооб'єкти використовують стовбурові мезенхімальні клітини ссавців у концентрації 10^5 - 10^6 /мл культурального середовища.

Корисна модель відноситься до області медицини й стосується рецептури біосумісного гідрогелю, здатного сорбувати значні кількості рідин різної природи, зокрема, культуральних рідин з включеними мікрооб'єктами, та який може застосовуватися для культивування мікроорганізмів і клітин ссавців (зокрема, диференційованих і стовбурових) з метою подальшого застосування в якості лікарського засобу у медичній практиці. Наприклад, запропонований гідрогель із включеними мезенхімальними стовбуровими клітинами та/або диференційованими клітинами шкіри може використовуватись в якості ефективного тимчасового штучного замітника шкіри при лікуванні опіків, особливо великих за площею (понад 70%) та глибоких, що зачіпають підшкірні тканини, а також інших уражень шкіри.

Як відомо, раневі покриття у вигляді гелів володіють рядом переваг: прозорість, щільний контакт із ранною, висока поглинаюча здатність стосовно раневого ексудату, можливість аерації й переміщення продуктів метаболізму, безболісність видалення. Однак, наявні гідрогелеві покриття часто малоефективні через низьку механічну міцність, схильність до пересихання, недостатню сорбційну здатність [Парамонов Б.А., Порембский Я.О., Яблонский В.Г. Опіки. - Санкт-Петербург, Спецлит, 2000. - 488 с.].

Відоме застосування широкого кола полімерів

для культивування мікроорганізмів і клітин ссавців (як *in vitro*, так і *in vivo*). При цьому використовуються природні й синтетичні полімери, як гідрофобні, так і гідрофільні. Застосування кожного з перерахованих класів полімерів володіє рядом переваг й недоліків. Однак дотепер не створено універсального матеріалу, придатного для використання на всіх фазах процесу загоєння опіків різної глибини.

Так, у патентній літературі [US 3,949,073] описане застосування природного полімеру, що підлягає біодеградації, - розчинного колагену, що зараз досить широко використовується в якості природного покриття при лікуванні опікових ран. У зазначеній роботі спочатку в організм за допомогою ін'єкції вводився сам полімер, а потім його заселяли клітинною популяцією.

Як правило, саме колаген застосовують у біотехнології для одержання гелю з метою формування "дермального еквівалента" і "живого еквівалента шкіри" [Парамонов Б.А., Порембский Я.О., Яблонский В.Г. Опіки. - Санкт-Петербург, Спецлит, 2000. - 488 з]. При цьому готують складні клітинні композиції з розчином колагену й культуральним середовищем. Отримані суміші при низьких температурах залишаються рідкими, а при нанесенні на рану при температурі тіла полімеризуються в гель. Незважаючи на безліч цінних властивостей колагену як природного покриття, що підлягає біо-

(13) **U**(11) **20134**(19) **UA**

деградації, йому властиві й недоліки, що виявляються у цілому ряді робіт. Так, існують труднощі ідентифікації цього природного полімеру: структура колагену, а також відповідно і його властивості, змінюються залежно від конкретного джерела його одержання (див., наприклад, [EP 0681846]). Серед інших недоліків покриттів на основі колагену слід зазначити його високу ціну, складність виділення й обробки, схильність до заселення хвороботворними мікроорганізмами й неможливість парової стерилізації внаслідок денатурації при підвищених температурах. Крім того, плівкам колагену не притаманна достатня міцність на розрив. Тому використання колагену для загоєння ран і опіків обмежується внаслідок збільшення ризику додаткового інфікування ран, а також можливості імунних реакцій.

Для виготовлення синтетичних покриттів можуть використовуватись гідрофобні полімери, наприклад, полістирол [Имобилизованные клетки и ферменты. Методы. Под ред. Дж. Вудворда. Москва. «Мир». 1988. 215 с.] або кополімер етилену з вінілацетатом [EP 0681846]. Є дані про те, що такі гідрофобні полімерні покриття не інгібують ріст клітин різного походження та не володіють цитотоксичністю. Зазначеним покриттям притаманний низький рівноважний водовміст (близько 5-7%), внаслідок чого вони мають підвищену твердість і жорсткість. Проте саме це перешкоджає використанню їх у якості протипошкочувальних покриттів, де важливо протилежні властивості: еластичність, м'якість, здатність відтворювати рельєф рани, а також атравматичність при застосуванні й біосумісність, що збільшується по мірі росту рівноважного водовмісту.

Інший гідрофобний двошаровий матеріал на основі поліуретану застосовують для виготовлення тимчасового штучного раневого покриття [JP 6104116 B4]. Матеріал являє собою синтетичний полімерний шар, насичений культуральним середовищем, і шар з клітинами. Недоліком вказаного матеріалу внаслідок його гідрофобності є низька поглинаюча здатність стосовно раневого ексудату. Крім того, внаслідок низької термостабільності, матеріал не витримує термостерилізації, що створює загрозу його заселення мікроорганізмами.

Відомо також застосування гідрофільних синтетичних покриттів для культивування клітин. Найбільше широко описане застосування гідрогелів на основі поліакриламідів. Найбільш близьким за технічним рішенням є метод одержання поліакриламідного гелю для медико-біологічних цілей, у тому числі й для культивування клітин [SU 977466], який був обраний нами в якості найближчого аналога. Гелеутворення акриламідів здійснюється у фізіологічному розчині, у присутності зшиваючого агента та ініціаторів полімеризації з наступним відмиванням від непрореагованих низькомолекулярних домішок та інкубацією клітинних культур. Отриманий сітчастий полімер не токсичний (за умов якісно виконаного відмивання від токсичних мономерів), має високу еластичність та прозорість. Взагалі, поліакриламідний гель володіє високим рівноважним водовмістом (може досягати значень порядку 95-97%) і, як наслідок, унікальної біосумісності,

однак, його механічна міцність дуже низька [Kondo T., Muramatsu N. In: Microencapsulation (Nixon J.R., ed), p. 67, Marsel Dekker, Inc., New York, 1976], що не дозволяє використовувати його для виготовлення протипошкочувальних покриттів, які, крім забезпечення необхідних умов для культивування клітин, повинні надійно захищати уражену поверхню від інфікування ззовні. Крім того, у випадку недостатньої механічної міцності покриття існує висока ймовірність того, що його дрібні фрагменти із гнійно-некротичними виділеннями залишатимуться на поверхні рани.

Варто також підкреслити, що відсутність іоногенних функціональних груп у поліакриламідному гелі обмежує можливість його збагачення елементами культурального середовища та їх тривалого закріплення, що не сприяє якійсь імобілізації клітин на поверхні [Immoblised cells and enzymes. A practical approach. Woodward J., ed IRL Press. Oxford. Washington. 1985].

Крім того, як відомо з літературних даних, здатність поліакриламідного гелю до імобілізації й пролонгованого вивільнення лікарських речовин у край низька [К.А. Макаров, С.А. Кибардин. Имобилизованные биопрепараты в медицине. Москва. Медицина. 1980]. Задовільна ефективність імобілізації досягалася лише у випадку ферментів з високою молекулярною масою, що долають стеричні перешкоди при дифузії крізь часто шиту макромолекулярну сітку гідрогелю. Однак високий ступінь зшивки в поліакриламідному гелі негативно позначається на культивуванні клітин [Имобилизованные клетки и ферменты. Методы. Под ред. Дж. Вудворда. Москва. «Мир». 1988. 215 с.].

З огляду на викладене, використання вказаних гідрогелевих покриттів з адресним пролонгованим вивільненням комплексу лікарських препаратів поряд із клітинною терапією не є ефективним.

Завданням даної розробки є одержання багатофункціонального гідрогелю медичного призначення, що має оптимальні експлуатаційні характеристики й високий лікувальний ефект стосовно уражень шкіри.

Поставлене завдання вирішується шляхом удосконалення структури біосумісного гідрогелю, зміною співвідношення інгредієнтів, додаткового введення в гель культурального середовища й стовбурових мезенхімальних клітин макроорганізмів у певній концентрації.

Гідрогель медичного призначення містить у мас. %

зшитого кополімеру на основі гідрофільного мономеру, гідрофобного мономеру, ненасиченої кислоти та біфункціонального мономеру	2,0-70,0
лікарського препарату	0,001-5
культурального середовища з мікрооб'єктами	решта до 100

Одержують його за допомогою кополімеризації гідрофільного мономеру (наприклад, N-вінілпіролідону, 2-гідрооксипропілметакрилату, акриламідів, метакриламідів), гідрофобного мономеру (наприклад, метилакрилату, етилакрилату, метилметакрилату, акрилонітрилу, метакрилонітрилу), ненасиченої кислоти (наприклад, акрилової кисло-

ти, метакрилової кислоти, кротонової кислоти, 2-акриламід-2-метилпропансульфонової кислоти) та біфункціонального мономеру (наприклад, етиленглікольдиметакрилату, N,N'-метилден-біс-акриламід, 1,4-діакрилоїлпиперазину).

Зазначений зшитий кополімер одержують при наступних концентраціях комономерів, мас. %:

гідрофільний мономер	3,5-60
гідрофобний мономер	0,5-30
ненасичена кислота	0,05-5
біфункціональний мономер	0,001-1

з наступним відмиванням гелю в апірогенній воді, висушуванням, стерилізацією, насиченням культуральним середовищем й нанесенням на його поверхню клітинної суспензії, що містить в 1 мл не менш ніж 10^5 клітин.

Отриманий гідрогель набуває властивостей, що притаманні гідрофільним полімерам (підвищена біосумісність, висока поглинаюча здатність по відношенню до раневого ексудату й культурального середовища), а також властивостей, що притаманні гідрофобним полімерам (достатня міцність й зумовлена присутністю в гідрогелевій структурі іоногенних груп здатність зв'язувати та пролонговано вивільняти лікарські препарати).

Кополімеризація гідрофобних й гідрофільних мономерів дозволяє досягати того гідрофільно-гідрофобного балансу, при якому створюються оптимальні умови для культивування клітин (адгезія, розпластування, розмноження, утворення моношару) та забезпечується комплекс необхідних фізико-хімічних властивостей покриття (сорбційна здатність стосовно раневого ексудату, паро- та киснепроникність, міцність, еластичність, атравматичність при застосування).

Мікробіологічні дослідження показали, що на гідрофільних поверхнях (наприклад, поверхня гомополіакриламідного гелю) не спостерігається пригнічення росту клітин, однак ні розпластування клітин, ні утворення моношару при цьому не виявлено. У випадку надмірної гідрофобності кополімерного покриття клітини погано прикріплюються до поверхні, крім того, внаслідок непрозорості матеріалу спостереження за ростом клітин та за процесом загоєння рани ускладнюється. Надмірна твердість такого матеріалу не дозволяє виготовляти з нього атравматичні протипікові покриття.

Таким чином, оптимальні експлуатаційні параметри гідрогелевих покриттів у поєднанні з найкращими умовами для культивування клітин досягаються саме у випадку застосування помірно гідрофільних і одночасно помірно гідрофобних гідрогелів, що одержуються в процесі кополімеризації гідрофільних і гідрофобних мономерів. Додаткове введення в зазначений кополімерний гідрогель мономерів з іоногенними групами (наприклад, ненасичених кислот) сприяє кращому насиченню покриття культуральним середовищем й закріпленню з наступною пролонгацією вивільнення лікарських засобів, що використовуються при лікуванні опіків та інших уражень шкіри.

Тестування гідрогелевих матриць в якості покриттів для культивування клітин здійснювали в такий спосіб. Сухі гідрогелеві зразки покриттів помі-

щали в чашки Петрі (фірма "Anumbra", діаметр 35мм) й заливали культуральним середовищем на 5-12 годин для набухання. Потім надлишок рідини видаляли й наносили клітинну суспензію (10^5 клітин в 1 мл культурального середовища). Для приготування клітинних суспензій використовували мезенхімальні стовбурові клітини лінії 4BL2, отримані з периферійної донорської крові. Клітини 4BL2 культивували in vitro у стандартному середовищі DMEM (фірма "Sigma") з додаванням 5% сироватки новонароджених особин великої рогатої худоби (фірма "Sigma"), а також антибіотиків пеніциліну й стрептоміцину по 100 ОД/мл. Для одержання клітинних суспензій моношарову культуру на поверхні скляних флаконів або чашок Петрі обробляли розчином трипсину й версену [Бужиевская Т.И., Лукаш Л.Л., Подольская С.В. Экспериментальные модели для изучения мутагенеза и трансформации, индуцированных вирусами и нуклеиновыми кислотами // Методы молекуляр. Биологии. - Киев: Наук. Думка, 1986. - С. 147-158].

В якості контролю клітини висівали на поверхню стандартних чашок Петрі. Інкубацію клітинних культур проводили при температурі 37°C. Спостереження за клітинами проводили під інвертованим мікроскопом щодня протягом тижня. При цьому досліджувалися здатність клітин до іммобілізації на гідрогелевих зразках, агрегація, адгезивні властивості, ріст і розмноження, а також морфологічні властивості.

Через добу після посіву клітин на більшості із досліджуваних гідрогелевих зразків спостерігалось прикріплення клітин до поверхні, часткове розпластування, а також утворення агрегатів різної величини (Фіг.1). Лише при використанні помірно гідрофобних і одночасно помірно гідрофільних покриттів спостерігалось прикріплення, ефективне розпластування, розмноження й ріст клітин з утворенням моношару (Фіг.2).

Надалі суть корисної моделі ілюструється прикладами конкретного виконання. Отримані гідрогелеві зразки покриттів аналізувалися за такими показниками, як міцність на розрив, тривалість вивільнення введених хіміотерапевтичних засобів та характер взаємодії клітин та гідрогелевого зразку.

Для оцінки швидкості вивільнення лікарських засобів гідрогелеві зразки покриттів поміщали в дистильовану воду при температурі 25°C й спостерігали за зміною інтенсивності смуги поглинання в УФ-області, що визначалась з використанням спектрофотометра "SPECORD-M40".

Міцність на розрив синтезованих гідрогелів визначали з використанням розривної машини «FP 100/1» (Німеччина).

Параметри гідрогелів різної сполуки наведені в Таблиці 1.

Приклад 1

В 100мл апірогенної води з температурою 25°C розчиняють 45,0г N-вініл-піролідону (всі використані реактиви - виробництва фірми "Sigma", для біомедичних цілей), 2,5г метилакрилату, 0,5г метакрилової кислоти, 0,2г етиленглікольдиметакрилату, 0,15г персульфату амонію й 0,15г тетраметилетилендіаміну. Отриманий розчин відфільт-

ровують крізь бактерицидний фільтр із розміром пор 0,45мкм, продувають газоподібним азотом й розливають для проведення полімеризації в плоскo-паралельні прес-форми для одержання пластин з товщиною 0,7мм. Прес-форми витримують при температурі 25°C протягом 2-х годин. Потім матеріал виймають із прес-форм і піддають відмиванню в апірогенній воді при температурі 75°C (співвідношення гідрогелю й води 1:3) протягом 7 діб з щоденною заміною води. Гідрогелеві покриття після хроматографічного контролю залишкового вмісту мономерів висушують при температурі 40°C, пакують в полімерну плівку, стерилізують, насичують культуральним середовищем, що містить 5% бактерицидного препарату хлорексидину біглюконату й наносять клітинну суспензію, що містить 10⁵ клітин в 1мл культурального середовища (процес інкубації клітин описаний вище). Визначали міцність на розрив гідрогелевих покриттів, тривалість вивільнення введенного лікарського препарату й спостерігали за характером поведінки клітин на поверхні. Результати зведені в Таблицю 1.

Приклад 2

В 100г апірогенної води з температурою 25°C розчиняють 90,0г акриламід, 10г акрилонітрилу, 1г акрилової кислоти, 0,2г N,N'-метиле-н-біс-акриламід, 0,1г персульфату калію й 0,125г метабісульфіту натрію. Надалі обробку отриманого гідрогелю здійснюють аналогічно прикладу 1. Використовують культуральне середовище, що містить 5% анестетику лідокаїну гідрохлориду. Визначали параметри, що перераховані в прикладі 1. Результати зведені в Таблицю 1.

Приклад 3

В 100г апірогенної води з температурою 25°C розчиняють 70г акриламід, 30г акрилонітрилу, 2г акрилової кислоти, 1г N,N'-метиле-н-біс-акриламід, 0,05г персульфату амонію й 0,1г метабісульфіту натрію. Надалі обробку отриманого гідрогелю здійснювали аналогічно прикладу 1. Використовують культуральне середовище, що містить 5%

анестетику лідокаїну гідрохлориду. Визначали параметри, що перераховані в прикладі 1. Результати зведені в Таблицю 1.

Приклад 4

В 100г апірогенної води з температурою 25°C розчиняють 35г акриламід, 55г акрилонітрилу, 10г метакрилової кислоти, 2г N,N'-метиле-н-біс-акридамід, 0,125г персульфату калію й 0,125г 3-диметиламінопропіонітрил. Надалі обробку отриманого гідрогелю здійснювали аналогічно прикладу 1. Використовують культуральне середовище, що містить 5% антибіотику лінкоміцину гідрохлориду. Визначали параметри, що перераховані в прикладі 1. Результати зведені в Таблицю 1.

Приклад 5 (порівняльний)

В 100г апірогенної води з температурою 25°C розчиняють 2,0г акриламід, 0,1г акрилонітрилу, 0,15г метакрилової кислоти, 0,05г N,N'-метиле-н-біс-акриламід, 0,125г персульфату калію й 0,125г 3-метабісульфіту натрію. Внаслідок низької концентрації комономерів гідрогель не утвориться.

Приклад 6 (порівняльний)

В 100г апірогенної води з температурою 25°C розчиняють 205г акриламід, 20г акрилонітрилу, 5г акрилової кислоти, 2,5г N,N'-метиле-н-біс-акриламід, 0,125г персульфату калію й 0,125г 3-диметиламінопропіонітрил. Внаслідок високої концентрації мономерів спостерігається бурхлива спонтанна вибухоподібна реакція гелеутворення зі вспінюванням суміші й різким погіршенням фізико-механічних властивостей полімеру.

Приклад 7 (порівняльний)

Одержують поліакриламідний гель, що містить 11,0% поліакриламід й 89,0% 0,5%-ного водного розчину хлористого натрію (відповідно до прикладу 1 та найближчого аналога - [SU 977466]). Надалі обробку отриманого гідрогелю здійснюють аналогічно прикладу 1. Використовують культуральне середовище, що містить 5% бактерицидного препарату хлорексидину біглюконату. Визначали параметри, що перераховані в прикладі 1. Результати зведені в Таблицю.

Таблиця

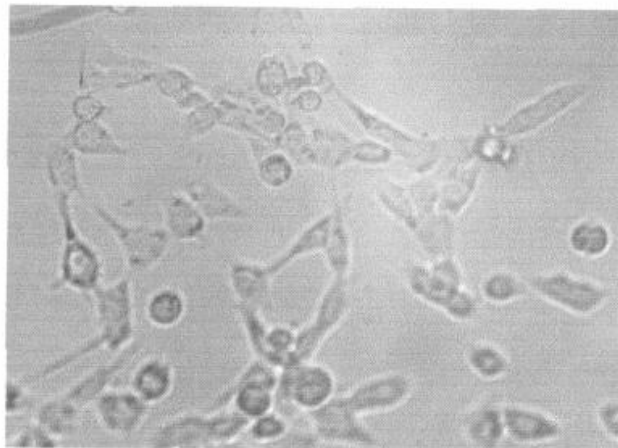
Гідрогелевий зразок згідно прикладу	Міцність на розрив, кПа	Тривалість вивільнення лікарських препаратів, г	Характер взаємодії клітин з поверхнею гідрогелевого зразку
1	180	85	Клітини розпластуються, прикріплюються до поверхні
2	245	120	Клітини розпластуються, прикріплюються до поверхні
3	420	134	Клітини розпластуються прикріплюються до поверхні, утворюють моношар
4	570	145	Клітини розпластуються прикріплюються до поверхні, утворюють моношар
5 (порівняльний)	Гель не утворюється		
6(порівняльний)	Спонтанна вибухоподібна полімеризація		
7 (порівняльний)	125	12	Клітини не розпластуються, моношар не утворюється

Таким чином, наведені приклади підтверджують, що запропонований біосумісний гідрогель

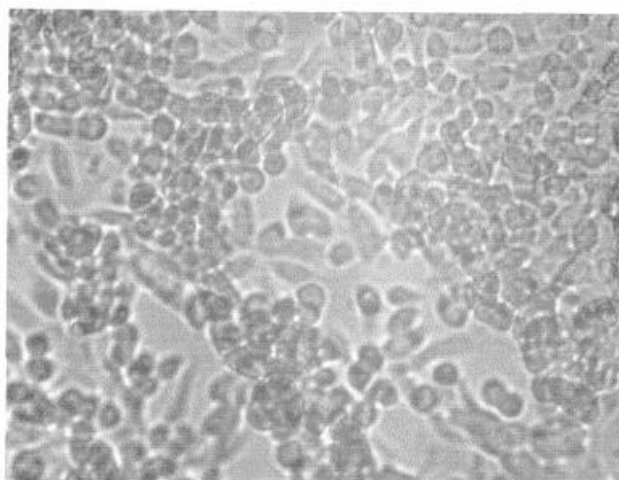
медичного призначення може бути отриманий. У порівнянні із найближчим аналогом досягається

значне зміцнення матеріалу, пролонгація вивільнення введених у його сполуку лікарських засобів, поліпшення біосумісності із клітинами, що вперше

показано на прикладі мезенхімальних стовбурових клітин людини.



Фіг.1



Фіг.2