



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 82583

(13) C2

(51) МПК (2006)

A61K 31/74

A61K 35/12

A61L 15/00

A61L 27/00

A61P 17/02 (2007.01)

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ**

**ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ**

ОПИС

ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(54) БІОСУМІСНИЙ ГІДРОГЕЛЬ МЕДИЧНОГО ПРИЗНАЧЕННЯ ТА СПОСІБ ЙОГО ОДЕРЖАННЯ

1

2

(21) a200607473

(22) 05.07.2006

(24) 25.04.2008

(46) 25.04.2008, Бюл.№ 8, 2008 р.

(72) САМЧЕНКО ЮРІЙ МАРКОВИЧ, УА, ЛУКАШ
ЛЮБОВ ЛЕОНІДІВНА, УА, КОСЕНКО ОЛЬГА
ОЛЕКСАНДРІВНА, УА, УЛЬБЕРГ ЗОЯ
РУДОЛЬФІВНА, УА, РУБАН ТЕТЯНА
ОПАНАСІВНА, УА, КОЗИНЕЦЬ ГЕОРПІЙ
(73) САМЧЕНКО ЮРІЙ МАРКОВИЧ, УА, ЛУКАШ
ЛЮБОВ ЛЕОНІДІВНА, УА, КОСЕНКО ОЛЬГА
ОЛЕКСАНДРІВНА, УА, УЛЬБЕРГ ЗОЯ
РУДОЛЬФІВНА, УА, РУБАН ТЕТЯНА
ОПАНАСІВНА, УА, КОЗИНЕЦЬ ГЕОРПІЙ

(56) 04.04.2004, 15.03.2004

UA 14050 U, 17.04.2006

RU 2003107927 A, 20.09.2004

RU 2 067 873 C1, 20.10.1996

US 5 941 909 A, 24.08.1999

EP 0 784 987, A2, 23.07.1997

WO 2006/050091A, 11.05.2006

CA 2 541 317 A1, 21.04.2005

(57) 1. Біосумісний гідрогель медичного призначення, що є зшитим співполімером з дисперсійним середовищем, який **відрізняється** тим, що він додатково містить лікарський препарат, а співполімер містить ланки гідрофобних та гідрофільних мономерів, а також ненасичених кислот, при цьому як дисперсійне середовище використовується культуральне середовище з біологічними мікрооб'єктами.

2. Гідрогель за п.1, який **відрізняється** тим, що зазначені компоненти містяться при наступному співвідношенні, у мас. %:

зшитий співполімер на основі гідрофільного мономеру, гідрофобного мономеру, ненасиченої кислоти та біфазної дисперсії	2,0-70,0
мультисередовище з мікроб'єктами	0,001-5
	решта до 100.

3. Гідрогель за п. 1 або 2, який **відрізняється** тим, що як мікрооб'єкти культурального середовища використовують стовбурові клітини ссавців у концентрації 10^5 - 10^6 /мл.

4. Спосіб одержання гідрогелю за будь-яким з пп.1-3, що включає співполімеризацію мономерів у присутності зшиваючого агента та ініціаторів полімеризації з наступним відмиванням від компонентів, що не прореагували, і насиченням культуральним середовищем з мікрооб'єктами, який **відрізняється** тим, що проводять одночасно співполімеризацію гідрофобних та гідрофільних мономерів, ненасичених кислот та біфункціональних мономерів при такій **концентрації мономерів:** 3-5-60

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

з подальшим насиченням отриманого співполімеру лікарськими препаратами й культуральним середовищем з мікрооб'єктами в концентрації 10^5 - 10^6 /мл.

мікроорганізмів і клітин ссавців (зокрема, диференційованих і стовбурових) з метою подальшого застосування як лікарський засіб у медичній практиці. Наприклад, пропонується гідрогель із включеними мезенхімальними стовбуровими клітинами та/або

C2₍₁₃₎

(11) 82583

UA⁽¹⁹⁾

диференційованими клітинами шкіри може використатися в якості ефективного тимчасового штучного заміника 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 раною, 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 БА., Порембский Я.О., Яблонский В.Г. Опіки.-Санкт-Петербург, Спецлит, 2000.-488 с.].

Винахід відноситься до способу одержання зшитого кополімерного гідрогелю на основі акрилових мономерів, що володіє комплексом властивостей, які створюють оптимальні умови для культивування на його поверхні та в об'ємі клітин, у тому числі мезенхімальних стовбурових, і призначеного для використання в медицині, насамперед, для одержання противоопікових покриттів. По функціональному призначенню зазначений гідргель відноситься до захисних покриттів, по стійкості - до біоінертних або недеградуючих синтетичних матеріалів, по механізму дії - до сорбуючих покриттів, що запобігають випаровуванню ексудату. Завдяки розробці способу одержання зазначеного гідрогелю будуть поліпшені захисні, сорбційні, лікувальні, транспортні й технологічні властивості синтезованого винаходу. Відповідно до цього здійснюється насичення зазначеного гідрогелю культуральним середовищем, в якому містяться біологічні мікрооб'єкти, що забезпечує оптимальні умови для їх імобілізації, життєдіяльності, росту й розмноження *in vitro* та *in vivo*. Використання мезенхімальних стовбурових клітин як клітинного компоненту гідрогелевої мембрани є перспективним, тому що у відповідному мікрооточенні вони здатні диференціюватися в різні типи клітин, у тому числі епітеліальні, м'язеві та клітини сполучної тканини й інші [Jiang Y. et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow // Nature.-2002.-418.-P.41-49].

Даний спосіб веде до збільшення здатності даного гідрогелю до поглинання й тривалого утримання достатньої кількості різних лікарських препаратів, культуральних середовищ, ростових факторів і спеціальних добавок, що використовуються у процесі культивування як мікроорганізмів, так і клітин ссавців з різним рівнем диференціювання.

У результаті здійснення запропонованого способу зазначеному гідрогелю надаються не лише властивості до ефективної сорбції, але й до наступного пролонгованого вивільнення різних медикаментозних препаратів (зокрема, знеболювальних, протигрибкових, бактерицидних, гормональних, гемостатичних, вітамінних, ферментативних та ін.). При використанні складних клітинних композицій з

гелю виділяються численні ростові фактори й інші речовини клітинного походження, які сприяють загоєнню рани.

Таким чином, розробленому нами гідрогелю, отриманому заявленим способом, надаються такі корисні для загоєння уражень шкіри експлуатаційні властивості, як механічна міцність, еластичність, прозорість, висока поглинаюча здатність стосовно раневого ексудату. Завдяки застосуванню технології культивування на поверхні гідрогелю мезенхімальних стовбурових клітин та/або диференційованих клітин шкіри гідргель набуває властивостей "еквіваленту шкіри".

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 та недоліків. Однак, дотепер не створено універсального матеріалу, придатного для використання на всіх фазах загоєння ран опіків різної глибини.

Так, у [патенті US 3949073] описане застосування природного біодеградуемого полімеру - 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.

Відомі випадки використання культур клітин, розміщених у матриці, що утворена при взаємодії колагену й зшиваючого агенту, біфункціонального поліетиленгліколю [WO 9526761]. У даному патенті висвітлено розробку комбінованого матриксу, що може використовуватись для ендопротезування (заміщення внутрішніх тканин організму), але непридатного для зовнішнього застосування.

Як правило, саме колаген застосовують у біотехнології для одержання гелю з метою формування "дермального еквівалента" і "живого еквівалента шкіри" [Парамонов БА., 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 піддає біодеградації 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 покриття на основі колагену слід зазначити його високу вартість, складність виділення й обробки, схильність до заселення хвороботворними мікроорганізмами й неможливість парової стерилізації внаслідок денатурації при підвищених температурах. Крім того, плівки колагену не посідають достатньої міцності на розрив. Тому

використання колагену для загоєння ран і опіків обмежується внаслідок збільшення ризику додаткового інфікування ран, а також можливості імунних реакцій.

Слід зазначити, що наведені недоліки колагенових покриттів нівілюються при використанні пропонованого нами синтетичного гідрогелевого покриття.

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 пригнічують 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 противоопікових покриттів, для яких вкрай важливі протилежні властивості: еластичність, м'якість, здатність відтворювати рельєф рани, а також атравматичність при застосуванні й біосумісність, що збільшується по мірі росту рівноважного водовмісту. Гідрофобний двошаровий матеріал на основі поліуретану застосовують для виготовлення тимчасового штучного раневого покриття [JP 6104116]. 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 застосування для організації гідрофільних синтетичних покриттів для культивування клітин. Найбільше широко описане застосування гідрогелів на основі поліакриламідів. Відоме застосування поліакриламідного гелю в якості субстрату для культивування клітин, причому спочатку гелю вводиться в організм ссавця, а потім його ін'єкційним методом заселяють клітинами [RU 2151800]. Однак, зазначений спосіб придатний лише для вакцинації всього організму ссавця й не дозволяє здійснювати адресну клітинну терапію конкретних зовнішніх уражень шкіри, зокрема, опіків. 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 прототипу. Спосіб передбачає проведення гелеутворення акриламідів 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 залишків мономерів), має високу еластичність та прозорість. Взагалі, поліакриламідний гелю володіє високим рівноважним водовмістом (може досягати значень

порядку 95-97%) і, як наслідок, унікальною біосумісністю, 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 противоопікових 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 гелю обмежує можливість його збагачення елементами культурального середовища та їх тривалого закріплення, що не сприяє якійсь імобілізації клітин на поверхні [Immobilised cells and enzymes. A practical approach. Woodward J., ed IRL Press. Oxford. Washington, 1985]. 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 зшити макромолекулярну сітку гідрогелю. Однак, високий ступінь зшивки в поліакриламідному гелю негативно позначається на культивуванні клітин [Имобилизованные клетки и ферменты. Методы. Под ред. Дж.Вудворда. Москва. "Мир". 1988. 215 с.]. Використання вказаних гідрогелевих покриттів з адресним пролонгованим вивільненням комплексу лікарських препаратів поряд із клітинною терапією не є ефективним.

У результаті проведених нами досліджень було продемонстровано, що кополімеризація гідрофобних й гідрофільних мономерів дозволяє досягти 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 застосуванні). Дослідження показали, що на гідрофільних поверхнях (наприклад, на поверхні 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, а внаслідок непрозорості матеріалу спостереження за ростом клітин та за процесом загоєння рани ускладнюється. Крім того, надмірна твердість такого матеріалу не дозволяє виготовляти з нього атравматичні противоопікові покриття.

Тестування гідрогелевих матриць як покриття для культивування клітин здійснювали в такий спосіб. Сухі гідрогелеві зразки покриття поміщали в чашки Петрі (фірма "Alumina", діаметр 35 мм) й заливали їх культуральним середовищем на 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,

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 етиленгліколдиметакрилату, 0,15г персульфату амонію й 0,15г тетраметилетилендіаміну. Отриманий розчин відфільтровують крізь бактерицидний фільтр із розміром пор 0,45мкм, продувають газоподібним азотом й розливають для проведення полімеризації в плоско-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 7дб 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 хлоргексидину біглюконату й наносять клітинну суспензію, що містить 10^5 клітин в 1мл культурального середовища (процес інкубації клітин описаний вище). Визначали міцність на розрив гідрогелевих покриттів, тривалість вивільнення введеного 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 М,К'-метилен-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'-метилен-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'-метилен-біс-акриламід, 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'-метилен-біс-акриламід, 0,125г персульфату калію й 0,125г 3-метабісульфіту натрію. Внаслідок низької концентрації комономерів гідрогель не утворюється.

Приклад 6 (порівняльний)

В 100г апірогенної води з температурою 25°C розчиняють 205г акриламід, 20г акрилонітрилу, 5г акрилової кислоти, 2,5г N,N'-метилен-біс-акриламід, 0,125г персульфату калію й 0,125г 3-диметиламінопропіонітрил. Внаслідок високої

концентрації мономерів спостерігалася 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 прототипу – [SU 977466]). Надалі обробку отриманого гідрогелю здійснюють аналогічно прикладу 1. Використовують культуральне середовище, що містить 5% бактерицидного препарату хлоргексидину біглюконату. Визначали параметри, що перераховані в прикладі 1. Результати зведені в Таблицю 1.

Таблиця 1

Гідрогелевий зразок згідно прикладу	Міцність на розрив, кПа	Тривалість вивільнення лікарських препаратів, години	Характер взаємодії клітин з поверхнею гідрогелевого зразку
1	180	85	Клітини розпластуються, прикріплюються до поверхні, утворюють моношар
2	245	120	Клітини розпластуються, прикріплюються до поверхні, утворюють моношар
3	420	134	Клітини розпластуються до поверхні, утворюють моношар
4	570	145	Клітини розпластуються 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 прототипом 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.

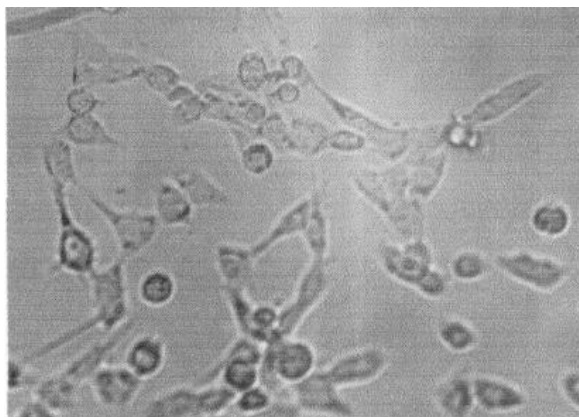


Fig. 1

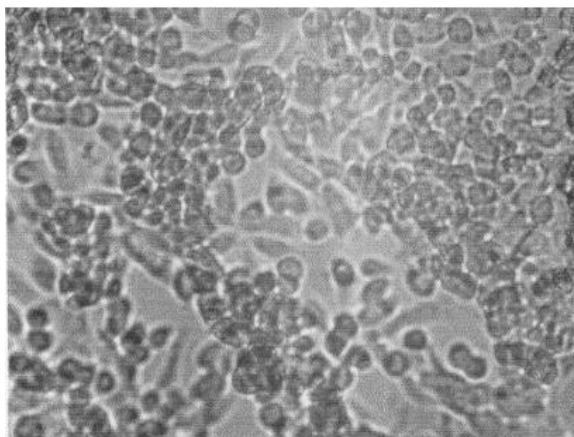


Fig. 2