



УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **102170**

(13) **U**

(51) МПК

**A61K 38/46** (2006.01)

**A61K 31/194** (2006.01)

**A61K 31/79** (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: <b>u 2015 01595</b>	(72) Винахідник(и): <b>Декіна Світлана Сергіївна (UA), Романовська Ірина Ігорівна (UA), Овсепян Ані Місаківна (UA)</b>
(22) Дата подання заявки: <b>24.02.2015</b>	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: <b>26.10.2015</b>	(73) Власник(и): <b>ФІЗИКО-ХІМІЧНИЙ ІНСТИТУТ ІМ. О.В. БОГАТСЬКОГО НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ, Люстдорфська дорога, 86, м. Одеса, 65080 (UA)</b>
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: <b>26.10.2015, Бюл.№ 20</b>	

## (54) АНТИМІКРОБНИЙ МУКОАДГЕЗИВНИЙ МАТЕРІАЛ

### (57) Реферат:

Антимікробний мукоадгезивний матеріал, що містить лізоцим, гідрогелеву полімерну матрицю і воду, причому як гідрогелеву полімерну матрицю він містить кріогель полівінілового спирту, додатково містить хлоргексидину біглюконат і динатрієву сіль етилендіамінтетраоцтової кислоти з наступним співвідношенням вказаних компонентів, мас. %:

лізоцим	0,2-5,0
хлоргексидину біглюконат	0,001-0,005
динатрієва сіль	
етилендіамінтетраоцтової	0,01-0,03
кислоти	
полівініловий спирт	5,0-7,0
вода	решта.

UA 102170 U



Корисна модель належить до медицини, зокрема до стоматології, оториноларингології та ін., для виготовлення перев'язувальних засобів, що можуть використовуватись в терапії запальних процесів слизових оболонок. Описано антимікробний матеріал, який виконано у вигляді полімерного гідрогелевого покриття з іммобілізованим гідролітичним ферментом лізоцимом з додаванням допоміжних антимікробних речовин.

Гідрогелева матриця являє собою кріогель полівінілового спирту, що належить до макропористих гелей, максимальний діаметр пор яких знаходиться в межах 1-2 мкм. Роль пороутворювачів при формуванні кріогелю виконують полікристали замороженого розчинника, після плавлення яких в матеріалі залишаються порожнини, заповнені розтапою рідиною [див. В.И. Лозинский, Е.С. Вайнерман, Л.В. Домотенко, А.Л. Блюменфельд, В.В. Рогов, Е.Н. Барковская, Э.И. Федин, С.В. Рогожин. Характерные особенности замерзания концентрированных водных растворов поливинилового спирта; взаимосвязь со свойствами гидрогелей, получающихся после оттаивания.// Коллоидн. журн., т. 51, № 4, с. 685-690, 1989].

Відомо медичний полімерний гідрогелевий матеріал, що як ранозагоювальний засіб може бути застосованим у лікуванні ран, ушкоджень шкіри, включаючи термічні (опіки, відмороження), трофічні виразки різної етіології (діабетичні, венозні, посттравматичні та інші), для нанесення аплікацій онкологічно хворим після опромінювання. Опис наведений у патенті України на винахід № 84507, МПК (2008) А61К38/46, 31/194, 31/79, 9/19, А61Р17/02.

Вказаний матеріал містить водорозчинний полімер, полі-N-вінілпіролідон, модифікований золем полікремнієвої кислоти, що надає йому структури гідрогелю. До складу матеріалу також входять лимонна кислота, триетиленгліколь, лізоцим (або лізоцим і протеаза) та вода.

Матеріал має добру гемостатичність і сприяє регенерації, підтримує оптимальний баланс вологи, газів і температури. Він здатний захистити рану ззовні від інфекцій.

Але вказаний матеріал має такі недоліки:

По-перше, і це головне, матеріал має низьку адгезію до слизових оболонок. Використання його утруднено через рухливість слизової тканини, її велику зволоженість, що заважає закріпленню матеріалу.

Це пов'язано з природою полімерної матриці, що у ході модифікації втрачає адгезію завдяки утворенню множинних водневих зв'язків з золем полікремнієвої кислоти.

По-друге, гідролітичний фермент лізоцим ефективний переважно відносно грам-позитивних бактерій.

Це пояснюється різним складом клітинної стінки грам-позитивних і грам-негативних бактерій і механізмом дії ензиму, який руйнує Р-1-4-глікозидні зв'язки у пептидоглікані клітинних стінок грам-позитивних бактерій.

Найближчим до корисної моделі, що заявляється, є склад ранозагоювального засобу, що містить наступні компоненти, мас. %:

лимонна кислота	0,68-3,19
триетиленгліколь	0,06-3,04
полі-N-вінілпіролідон	9,63-13,90
золь полікремнієвої кислоти	15,80-22,20
вода	решта.

При цьому як полімерна матриця використовується полі-N-вінілпіролідон (див. Пат. України на винахід №84507, МПК (2008) А61К38/46, 31/194, 31/79, 9/19, А61Р17/02, опубл. 27.10.08 р.).

Склад даного матеріалу вибрано прототипом.

Прототип і корисна модель, що заявляється, мають такі спільні компоненти:

гідрогелева полімерна матриця;  
гідролітичний фермент лізоцим;  
вода.

Описаний ранозагоювальний засіб забезпечує збереження ферментативної антибактеріальної дії. Але даний продукт не має адгезивних властивостей до слизової оболонки, що є бажаними при лікуванні ран і спектр антимікробної дії не поширюється на грам-негативні бактерії, гриби тощо.

В основу корисної моделі поставлено задачу розробити антибактеріальний гідрогелевий матеріал, в якому шляхом заміни полімерної матриці забезпечується наявність адгезії матеріалу до слизових оболонок і розширюється спектр антимікробної дії препарату за рахунок додавання нових антимікробних речовин.

Поставлена задача вирішена в антимікробному матеріалі, що містить лізоцим, гідрогелеву полімерну матрицю і воду, згідно з корисною моделлю як гідрогелеву полімерну матрицю він містить кріогель полівінілового спирту, додатково містить хлоргексидину біглюконат і династрієву

сіль етилендіамінтетраоцтової кислоти з наступним співвідношенням вказаних компонентів, мас. %:

лізоцим	0,2-5,0
хлоргексидину біглюконат	0,001-0,005
динатрієва сіль етилендіамінтетраоцтової кислоти	0,01-0,03
полівініловий спирт	5,0-7,0
вода	решта.

Новим у корисній моделі є те, що замість полі-N-вінілпіролідону за прототипом, використовують полівініловий спирт і розширюють спектр антимікробної дії додаванням біглюконату хлоргексидину і динатрієвої солі етилендіамінтетраоцтової кислоти.

Причинно-наслідковий зв'язок між сукупністю заявлених ознак і досягнутим технічним результатом можна пояснити наступним.

Заміна полімерної матриці приводить до появи мукоадгезивних властивостей препарату, що дозволяє закріпити його на рухливих слизових оболонках порожнини рота або інших слизових оболонках.

Додаткове введення біглюконату хлоргексидину і динатрієвої солі етилендіамінтетраоцтової кислоти дозволяє розширити спектр антимікробної дії препарату на грам-негативні бактерії, гриби.

Кількісний склад компонентів антибактеріального засобу підібрано експериментально.

Зменшення масової концентрації лізоциму приводить до неможливості кількісного визначення активності ферменту через пролонгованість виходу з плівкового покриття і зменшення бактеріолітичної активності.

Збільшення масової концентрації лізоциму призводить до нерівномірного включення ферменту в матрицю і, як наслідок, - погіршення фізичних і біохімічних характеристик плівки.

Додавання до складу препарату динатрієвої солі етилендіамінтетраоцтової кислоти у співвідношенні лізоцим: динатрієва сіль етилендіамінтетраоцтової кислоти: 1:0,08-0,006, приводить до дестабілізації зовнішнього ліпополісахаридного шару поверхневих клітинних структур грам-негативних бактерій за рахунок утворення хелатних комплексів з двовалентними іонами металів, наприклад з кальцієм або магнієм, що полегшує доступність пептидоглікану бактеріальної стінки для лізоциму.

А додавання до складу матеріалу біглюконату хлоргексидину посилює і розширює спектр антимікробної дії продукту.

Антимікробний мукоадгезивний гідрогелевий матеріал, відповідно до корисної моделі, готують у такий спосіб:

До заданої кількості 10 % водного розчину полівінілового спирту (ПВС) додають розчин лізоциму, біглюконат хлоргексидину, динатрієву сіль етилендіамінтетраоцтової кислоти. Перелічені компоненти додають при постійному перемішуванні. Отриману суміш виливають на скляну підкладку і заморожують при  $-24^{\circ}\text{C}$ , витримують 24 год. і розморожують, з подальшим повторним циклом заморожування і розморожування. Готові плівки герметично упаковують в поліетиленові пакети і зберігають в холодильнику при  $0-4^{\circ}\text{C}$ .

Приклад 1. Приготували антимікробний мукоадгезивний гідрогелевий матеріал, який містить такі компоненти, мас. %:

лізоцим	0,24
хлоргексидину біглюконат	0,0012
динатрієва сіль етилендіамінтетраоцтової кислоти	0,02
полівініловий спирт	5,34
вода	решта.

Для цього до  $11,3\text{ см}^3$  10,0 % водного розчину полівінілового спирту додали 50 мг лізоциму,  $5\text{ см}^3$  0,005 % водного розчину хлоргексидину біглюконату, 3,7 мг динатрієвої солі етилендіамінтетраоцтової кислоти і  $5\text{ см}^3$  дистильованої води. Вказані компоненти додавали при постійному перемішуванні. Отриману суміш вилили на скляну підкладку і піддали двом циклам заморожування при температурі  $-24^{\circ}\text{C}$  впродовж 24 годин і поступового розморожування. Отриманий таким чином гідрогелевий продукт запаювали в поліетиленовий пакет і зберігали при температурі  $4^{\circ}\text{C}$ .

Приклади 2-5 ілюструють одержання антимікробного матеріалу з різним кількісним і якісним складом компонентів. Дані наведені в таблиці 1.

Приклад 6. Визначали силу адгезії препарату до слизових оболонок. Для цього як модель слизової оболонки використовували поверхню тонкого кишечника свині. Перед експериментом тканину промивали фізіологічним розчином NaCl, висікали зразки слизової оболонки площею 5 см<sup>2</sup>, однорідні за морфологією. В процесі експерименту слизову тканину додатково зволожували.

Гідрогелевий матеріал з товщиною шару 0,3 мм закріплювали на рухомому штоку і з'єднували з слизовою. Фіксували навантаження на шток і час утримування (60 с). Далі під кутом 90 °С здійснювали відрив штоку з закріпленням на ньому зразком. Адгезію розраховували як силу відриву штоку з нанесеним препаратом від слизової оболонки.

Згідно отриманих результатів сила адгезії препарату до слизової оболонки дорівнює 6000-7000 Па, тоді як для мукоадгезивних препаратів величина сили адгезії знаходиться у межах 2000-9000 Па [див. Demina N.B., Larionova N.I., Kharenko E.A. Mucoadhesive drug delivery systems: quantitative assessment of interaction between synthetic and natural polymer films and mucosa. Pharmaceut. Chem. J., 2008, 42(7), P. 392-399].

В період з 01.05.2012 по 01.06.2012 р. було проведене вивчення антимікробної дії матеріалу, виготовленого відповідно заявленому винаходу, в лабораторії мікробіології [див. свідоцтво про атестацію № РО-041а/2012 ДУ "Інститут очних хвороб і тканинної терапії ім. В.П. Філатова НАМІ України"].

Як тест-штами використовували стандартні типові музейні культури мікроорганізмів:

*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 F-49;

*Pseudomonas aeruginosa* 415; *Escherichia coli* 055 K59912/4; *Candida albicans* ATCC 885-653.

Антимікробну дію досліджували з використанням матеріалів, отриманих відповідно до прикладів №№ 1, 4.

Приклад 7.

Антимікробну активність препаратів вивчали стандартним диско-дифузійним методом з використанням живильного середовища Мюллера-Хінтона [див. МВ 9.9.5-143-2007 Визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів. Методичні вказівки]. Живильне середовище готували згідно з інструкцією виробника, розливали в чашки Петрі. З культур мікроорганізмів готували мікробну суспензію з концентрацією 1,5·10<sup>8</sup> КУО/см<sup>3</sup>, що відповідає стандарту мутності 0,5 за МакФарландом. Контроль оптичної густини суспензії здійснювали за допомогою денситометра.

Стандартний інокулюм наносили піпеткою на поверхню чашки Петрі з живильним середовищем в об'ємі 1-2 см<sup>3</sup>. Прочинені чашки підсушували при кімнатній температурі протягом 10-15 хв.

На поверхню живильного середовища поміщали плівки з іммобілізованим лізоцимом. Аплікації проводили стерильним пінцетом. Відразу після аплікації плівок чашки Петрі поміщали в термостат догори дном і інкубували при температурі 35 °С протягом 24 год. Після інкубації чашки поміщали догори дном на темну матову поверхню так, щоб світло падало на них під кутом 45° (облік у відбитому світлі) і проводили оцінку діаметру зон затримки росту мікроорганізмів (д.з.з.р.) навколо досліджуваних препаратів. Дані експериментів піддавали статистичній обробці [див. Лапач С.Н., Чубенко А.В., Бабич П.Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel. - Киев: Морион, 2000. - 320 с].

Результати представлені у таблиці 2. На підставі наведених мікробіологічних випробувань можна прийти до висновку, що препарат має виражену антимікробну дію по відношенню до тест-штамів грам-позитивних і грам-негативних культур бактерій, грибів (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 F-49, *Pseudomonas aeruginosa* 415, *Escherichia coli* 055 K59912 /4, *Candida albicans* ATCC 885-653).

Таблиця 1

Кількісний і якісний склад антимікробного матеріалу

№№ п/п прикладу	Компонент (мас. %)				
	Полівініловий спирт	Лізоцим	Хлоргексидину біглюконат	Динатрієва сіль етилендіамінтетраоцтової кислоти	Вода
1	5,34	0,24	0,0012	0,02	94,4
2	5,0	0,5	0,0015	0,025	94,5

Продовження таблиці 1

№№ п/п прикладу	Компонент (мас. %)				
	Полівініловий спирт	Лізоцим	Хлоргексидину біглюконат	Динатрієва сіль етилендіамінтетраоцтової кислоти	Вода
3	6,0	1,0	0,002	0,01	92,9
4	6,5	3,0	0,004	0,02	90,5
5	7,0	5,0	0,005	0,03	88,0

Таблиця 2

Антимікробна дія гідрогелевого покриття з лізоцимом

Тест-штам мікроорганізму	Д.з.з.р., см ( $M \pm m$ )
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 F-49	1,7 $\pm$ 0,15
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 415	1,1 $\pm$ 0,10
<i>Escherichia coli</i> 055 K59912/4	1,2 $\pm$ 0,13
<i>Candida albicans</i> ATCC 885-653	1,3 $\pm$ 0,13
P<0,005, n=5	

#### ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

5

Антимікробний мукоадгезивний матеріал, що містить лізоцим, гідрогелеву полімерну матрицю і воду, який **відрізняється** тим, що як гідрогелеву полімерну матрицю він містить кріогель полівінілового спирту, додатково містить хлоргексидину біглюконат і динатрієву сіль етилендіамінтетраоцтової кислоти з наступним співвідношенням вказаних компонентів, мас. %:

лізоцим	0,2-5,0
хлоргексидину біглюконат	0,001-0,005
динатрієва сіль етилендіамінтетраоцтової кислоти	0,01-0,03
полівініловий спирт	5,0-7,0
вода	решта.

Комп'ютерна верстка А. Крижанівський

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601