

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10) **PL 246527 B1**

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **432700**

(22) Data zgłoszenia: **2020.01.27**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2021.08.02 BUP 18/2021**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2025.02.10 WUP 06/2025**

(51) MKP:

C08L 67/04 (2006.01)

C08K 9/04 (2006.01)

C08K 3/32 (2006.01)

(73) Uprawniony z patentu:

POLITECHNIKA WROCŁAWSKA, Wrocław, PL

(72) Twórca(-y) wynalazku:

MAŁGORZATA GAZIŃSKA, Jeszkowice, PL

ANNA KROKOS, Wrocław, PL

MILENA MOROWIAK, Wrocław, PL

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Anna Meissner, Wrocław, PL

(54) Tytuł:

Kompozyty polimerowo-ceramiczne oraz sposób ich wytwarzania

PL 246527 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku są kompozyty polimerowo-ceramiczne znajdujące zastosowanie w inżynierii tkanki kostnej.

Przedmiotem wynalazku jest również sposób wytwarzania kompozytów polimerowo-ceramicznych.

Z literatury znane są metody wytwarzania biokompozytów polimerowo-ceramicznych z zastosowaniem hydroksyapatytu jako napełniacza oraz biopolimerów takich jak polilaktyd i kopolimery laktydu z glikolidem lub kaprolaktonem. W artykule Zhongkui Hong i innych pt.: Nano-composite of poly(L-lactide) and surface grafted hydroxyapatite: Mechanical properties and biocompatibility (Biomaterials, 2005, 26(32), 6296–6304) opisano sposób wytwarzania nanokompozytów poprzez szczepienie poli(L-laktydu) do powierzchni cząstek nanohydroksyapatytu, a następnie wprowadzenie funkcjonalizowanego hydroksyapatytu do matrycy polimerowej z poli(L-laktydu). Kompozyt poli(L-laktydu) z dodatkiem modyfikowanych powierzchniowo cząstek hydroksyapatytu ma lepsze właściwości wytrzymałościowe niż czysty PLLA. Dodatkowo szczepienie makrocząsteczek PLLA do powierzchni HAP poprawia adhezję na granicy faz pomiędzy cząstkami ceramicznymi i matrycą polimerową. Udowodniono, że obecność modyfikowanego hydroksyapatytu w kompozycie zwiększa adhezję i proliferację chondrocytów na folii kompozytowej.

W publikacji Ignjatović N. i innych pt.: Synthesis and properties of hydroxyapatite/poly-L-lactide composite biomaterials (Biomaterials, 1999, 20(9), 809–816) autorzy opisują chemiczną syntezę hydroksyapatytu i poli(L-laktydu) w celu wytworzenia biomateriału kompozytowego Hap/PLLA metodą prasowania pod ciśnieniem na zimno i gorąco. Według autorów takie biokompozyty znajdują potencjalne zastosowanie w implantologii.

W inżynierii tkankowej znane są również trójwymiarowe, porowate rusztowania tkankowe (skafoldy). W publikacji Zhang P. i innych pt.: In vivo mineralization and osteogenesis of nanocomposite scaffold of poly(lactide-co-glycolide) and hydroxyapatite surface-grafted with poly(L-lactide) (Biomaterials, 2009, 30(1), 58–70) przedstawiono sposób otrzymywania trójwymiarowych porowatych skafoldów składających się z kopolimeru PLGA oraz z hydroksyapatytu powierzchniowo szczepionego poli(L-laktydem) (g-HAP/PLGA). Kompozyty wytwarzano z zastosowaniem metody rozpuszczalnikowej. Badania wykazały, że po modyfikacji powierzchniowej HAP zaobserwowano bardziej równomierny rozkład modyfikowanych cząstek HAP w matrycy, ale mniejszą ekspozycję na wapń na powierzchni biokompozytu. Badania implantacji domięśniowej wykazały, iż skafoldy z modyfikowanym HAP są bardziej stabilne niż sama matryca PLGA oraz wykazują podobną mineralizację i biodegradowalność do kompozytu kontrolnego HAP/PLGA. Co więcej, biokompozyt g-HAP/PLGA wykazuje szybką i wydajniejszą mineralizację oraz lepsze właściwości osteokonduktywne, a włączenie białek morfogenetycznych kości (BMP-2) mogłoby wzmocnić proces osteogeny implantu kompozytowego.

Znanych jest wiele metod otrzymywania kompozytów poli(L-laktydu) PLLA i poli(L-laktydu-co-glikolidu) PLLGA z zastosowaniem hydroksyapatytu jako napełniacza. Znane są także kompozyty PLLA i PLLGA z hydroksyapatytem modyfikowanym poli(glikolem etylenowym) lub aminokwasem egzogennym jakim jest L-lizyna. Z literatury znane są także materiały apatytowe funkcjonalizowane tylko poli(glikolem etylenowym) o różnych ciężarach cząsteczkowych. W artykule Liu Q. i innych pt.: Surface modification of nanoapatite by grafting organic polymer (Biomaterials, 1998, 19(11–12), 1067–1072) autorzy opracowali skuteczną metodę modyfikacji powierzchni cząstek hydroksyapatytu poli(glikolem etylenowym) o ciężarze cząsteczkowym $M_w = 1500$ z użyciem diizocyjanianu heksametylenu jako czynnika sprzęgającego, jednocześnie stwierdzając reaktywność powierzchniowych grup hydroksylowych hydroksyapatytu względem grup izocyjanianowych. W publikacji Liuyun J. i innych pt.: Effect of L-lysine assisted grafting for nano-hydroxyapatite on mechanical properties and in vitro bioactivity of poly(lactic acid-co-glycolic acid) (J. Biomater. Appl., 30(6), 750–758, 2016) autorzy zaproponowali szczepienie aminokwasu L-lizyny do powierzchni nanohydroksyapatytu w dimetyloformamidzie DMF. Następnie zaproponowano sposób otrzymywania kompozytów metodą rozpuszczalnikową zawierających matrycę poli(L-laktyd-co-glikolid) PLGA i 10% oraz 20% napełniacza w postaci nanohydroksyapatytu modyfikowanego L-lizyną. Nie są znane kompozyty polimerowo-ceramiczne, w których część ceramiczną stanowią modyfikowane powierzchniowo cząstki hydroksyapatytu i sposób ich wytwarzania polegający na szczepieniu cząsteczek poli(glikolu etylenowego) do powierzchni hydroksyapatytu za pośrednictwem L-lizyny.

Z rosyjskiego opisu patentowego RU2631890 (C1) pt.: Polymer composite with shape memory effect for 3D-printing of medical of medical equipment znane są materiały kompozytowe z pamięcią kształtu przeznaczone do druku 3D w zastosowaniach medycznych. Materiały te składają się hydroksyapatytu o wielkości cząstek od 100 do 1000 nm oraz polilaktydu i poli(glikolu etylenowego) oraz kilku części wagowych środka sieciującego. Kompozyty według wynalazku RU2631890 (C1) charakteryzują się usieciowaną strukturą dla zachowania dobrych właściwości mechanicznych. Materiał znajduje zastosowanie w technologii druku 3D do produkcji sprzętu medycznego.

Istnieją zastrzeżone rozwiązania dotyczące otrzymywania kompozytów hydroksyapatyt/polilaktyd. Między innymi wynalazek numer KR101678956 (B1) pt.: Biodegradable composites for bone fixation using polylactide and hydroxyapatite manufacturing method thereof dotyczy biodegradowalnego kompozytu do osteosyntezy z zastosowaniem polilaktydu PLA i hydroksyapatytu oraz sposób ich otrzymywania poprzez formowanie wtryskowe po kalcynowaniu hydroksyapatytu celem polepszenia jego dyspergowalności. Materiał taki znajduje zastosowanie do przeszczepów kości w stomatologii oraz chirurgii.

Dotychczas nie odkryto sposobu otrzymywania kompozytów biopolimerowych z napełniaczem bioceramicznym w postaci powierzchniowo modyfikowanych cząstek hydroksyapatytu aminokwasem egzogennym jakim jest L-lizyna oraz pochodną poli(glikolu etylenowego) o masie cząsteczkowej 600 g/mol oraz 2000 g/mol.

Istotą rozwiązania według wynalazku są kompozyty polimerowo-ceramiczne charakteryzujące się tym, że są to kompozyty, w których matrycę stanowią poli(L-laktyd) PLLA lub poli(L-laktyd-co-glikolid) PLLGA, a fazą ceramiczną są cząstki hydroksyapatytu modyfikowanego aminokwasem egzogennym – L-lizyną oraz pochodną poli(glikolu etylenowego) z karboksylową grupą końcową o ciężarach cząsteczkowych 600 g/mol oraz 2000 g/mol szczepioną do powierzchni hydroksyapatytu za pośrednictwem L-lizyny, przy czym kompozyt zawiera napełniacz w ilości 10% wag.

Istotą rozwiązania według wynalazku jest również sposób wytwarzania kompozytów polimerowo-ceramicznych z poli(L-laktydu) PLLA i poli(L-laktydu-co-glikolidu) PLLGA oraz hydroksyapatytu modyfikowanego L-lizyną i pochodną poli(glikolu etylenowego) w postaci folii metodą rozpuszczalnikową, polegający na tym, że w pierwszym etapie przyłącza się kowalencyjnie pochodną poli(glikolu etylenowego) z karboksylową grupą końcową do pierwszorzędowych grup aminowych L-lizyny na powierzchni hydroksyapatytu z zastosowaniem czynnika sprzęgającego 1,1'-karbonyldiimidazolu z utworzeniem wiązania amidowego a w drugim etapie do dyspersji modyfikowanych powierzchniowo cząstek HAP dodaje się roztwór poli(L-laktydu) lub poli(L-laktydu-co-glikolidu) w dichlorometanie i otrzymuje się kompozyty polimerowo-ceramiczne z zawartością napełniacza w ilości 10% wag.

Zaletą kompozytów polimerowo-ceramicznych składających się z powierzchniowo modyfikowanych cząstek hydroksyapatytu L-lizyną oraz pochodną poli(glikolu etylenowego) oraz matrycy poli(L-laktydu) lub poli(L-laktydu-co-glikolidu) jest to, że materiał taki nie jest toksyczny i może być z powodzeniem wykorzystywany w dziedzinie inżynierii tkankowej do regeneracji tkanek twardych. Istotne znaczenie ma zastosowanie L-lizyna, ponieważ L-lizyna wpływa na poprawę aktywności biologicznej materiału, promuje adhezję osteoblastów zwiększa ich aktywność proliferacyjną [Yoshikawa M., Kakigi H., Maeda H., Nishikawa L, Ikenaga H., Bone Formation in a Scaffold Composed of Cylindrical Hydroxyapatite and Tryptophan- or Lysine-Coated Sponge in Vivo, J. Biomed. Sci. Eng., 2015, 8(6), 389–398] jak również potencjał osteogeniczny komórek macierzystych kości [Yoshikawa, M., Yasunori Shimomura, Hideyuki Kakigi, Norimasa Tsuji, Takayoshi Yabuuchi, Hiroyuki Hayashi Effect of L-lysine in culture medium on nodule formation by bone marrow cells, J. Biomed. Sci. Eng., 2012, 5(10), 587–592] – parametry istotne podczas regeneracji tkanki kostnej. Ponadto udowodniono, że L-lizyna zwiększa mineralną gęstość kości, przez co zmniejsza zachorowalność na osteoporozę [A. Jennings, A. MacGregor, T. Spector, A. Cassidy, Amino Acid Intakes Are Associated With Bone Mineral Density and Prevalence of Low Bone Mass in Women: Evidence From Discordant Monozygotic Twins, J. Bone Miner. Res. 2016, 31, 326–335]. Ponadto, szczepienie pochodnej poli(glikolu etylenowego) do cząstek hydroksyapatytu za pośrednictwem L-lizyny jest korzystniejsze w porównaniu do stosowanych często toksycznych czynników sprzęgających takich jak (3-Aminopropyl) trietoksyilan (APTS) czy diizocyjaniny. Zastosowanie w modyfikacji cząstek hydroksyapatytu pochodnej poli(glikolu etylenowego) z karboksylową grupą końcową korzystnie wpływa na poprawę adhezji na granicy faz polimer i napełniacz. Poli(glikol etylenowy) jest mieszalny z PLLA i PEG o odpowiednim ciężarze cząsteczkowym oraz jest znanym plastyfikatorem PLLA [Kuliński Z., Piórkowska E, Crystallization, Structure and Properties of Plasticized Poly(L-Lactide), Polymer, 2005, 46, 10290–10300, Chieng B.W., Ibrahim N., Zin W., Yunus W., Hussein

M.Z., Plasticized poly(lactic acid) with low molecular weight poly(ethylene glycol): Mechanical, thermal, and morphology properties, J. Appl. Polym. Sci., 2013, 130(6), 4576–4580]. Zaletą zastosowania w kompozytach cząstek hydroksyapatytu modyfikowanych powierzchniowo pochodnymi poli(glikolu etylenowego) i L-lizyną jest to, że modyfikowane cząstki wykazują zarówno efekt plastyfikujący i nukleujący.

Przedmiot wynalazku został bliżej przedstawiony w przykładach jego wykonania.

Przykład 1

Otrzymywanie kompozytu poli(L-laktydu) z napełniaczem w postaci hydroksyapatytu modyfikowanego L-lizyną oraz poli(glikolem etylenowym) o ciężarze cząsteczkowym 600 g/mol:

W kolbie okrągłodennej o pojemności 50 cm³ zaopatrzonej w mieszadło magnetyczne umieszcza się 7,9 mg glikolu O-(2-karboksyetylo)-O'-metylundekanoetylenowego o ciężarze cząsteczkowym 600 g/mol (PEG600), 2,8 mg 1,1'-karbonylodiimidazolu (CDI) i dodaje się 10 ml DCM. Układ miesza się na mieszadle magnetycznym 2 h w temperaturze pokojowej w atmosferze argonu. Dysperguje się 0,05 g hydroksyapatytu funkcjonalizowanego L-lizyną w 5 cm³ DCM w czasie 5 minut z zastosowaniem ultradźwięków (parametry sonikacji: A = 0,5, cykl 0,5). Dyspersję dodaje się do roztworu PEGu i CDI. Układ miesza się 4 h w temperaturze pokojowej w atmosferze argonu. Tak przygotowaną dyspersję dodaje się do roztworu 0,45 g PLLA w 10 ml DCM. Zawartość kolby sonikuje się 10 minut następnie miesza się 10 minut na mieszadle magnetycznym i wylewa na szalkę Petriego o średnicy 9 cm i pozostawia w temperaturze pokojowej do odparowania rozpuszczalnika. Następnie kompozyt suszy się w suszarce próżniowej w temperaturze 40°C przez 4 godziny. Temperatura T_g wyznaczona metodą DSC z krzywej chłodzenia zmierzonej z szybkością 10 K/min wynosi 43,7°C, temperatura krystalizacji ze stopu (T_c) wyznaczona z krzywej chłodzenia zmierzonej z szybkością 10 K/min wynosi 104,0°C, temperatura początku zimnej krystalizacji (T_{cc}^{onset}) wyznaczona z drugiego ogrzewania wynosi 76,5°C.

Przykład 2

Otrzymywanie kompozytu poli(L-laktydu) z napełniaczem w postaci hydroksyapatytu modyfikowanego L-lizyną oraz poli(glikolem etylenowym) o ciężarze cząsteczkowym 2000 g/mol.

W kolbie okrągłodennej o pojemności 50 cm³ zaopatrzonej w mieszadło magnetyczne umieszcza się 26,3 mg bursztynian glikolu monoetoksypolietylenowego o ciężarze cząsteczkowym 2000 g/mol (PEG2000), 2,8 mg CDI i dodaje się 10 ml DCM. Układ miesza się na mieszadle magnetycznym 2 h w temperaturze pokojowej w atmosferze argonu. Dysperguje się 0,05 g hydroksyapatytu funkcjonalizowanego L-lizyną w 5 cm³ DCM w czasie 5 minut z zastosowaniem ultradźwięków (parametry sonikacji: A = 0,5, cykl 0,5). Dyspersję dodaje się do roztworu PEGu i CDI. Układ miesza się 4 h w temperaturze pokojowej w atmosferze argonu. Tak przygotowaną dyspersję dodaje się do roztworu 0,45 g PLLA w 10 ml DCM. Zawartość kolby sonikuje się 10 minut następnie miesza się 10 minut na mieszadle magnetycznym i wylewa na szalkę Petriego o średnicy 9 cm i pozostawia w temperaturze pokojowej do odparowania rozpuszczalnika. Następnie kompozyt suszy się w suszarce próżniowej w temperaturze 40°C przez 4 godziny. Temperatura T_g wyznaczona metodą DSC z krzywej chłodzenia zmierzonej z szybkością 10 K/min wynosi 35,2°C, temperatura T_c wyznaczona z krzywej chłodzenia zmierzonej z szybkością 10 K/min wynosi 108,2°C. Na krzywej DSC z drugiego ogrzewania nie występuje efekt egzotermiczny związany z zimną krystalizacją, co potwierdza, że PLLA wykrył się podczas krystalizacji ze stopu, ponieważ cząstki hydroksyapatytu modyfikowane poli(glikolem etylenowym) o ciężarze cząsteczkowym 2000 g/mol i L-lizyną efektywnie nukleują krystalizację PLLA ze stopu.

Przykład 3

Otrzymywanie kompozytu z kopolimeru poli(L-laktydu-co-glikolidu) z napełniaczem z hydroksyapatytu modyfikowanego L-lizyną oraz poli(glikolem etylenowym) o ciężarze cząsteczkowym 600 g/mol.

W kolbie okrągłodennej o pojemności 50 cm³ zaopatrzonej w mieszadło magnetyczne umieszcza się 7,9 mg glikolu O-(2-karboksyetylo)-O'-metylundekanoetylenowego o ciężarze cząsteczkowym 600 g/mol (PEG600), 2,8 mg CDI i dodaje się 10 ml DCM. Układ miesza się na mieszadle magnetycznym 2 h w temperaturze pokojowej w atmosferze argonu. Dysperguje się 0,05 g hydroksyapatytu funkcjonalizowanego L-lizyną w 5 cm³ DCM w czasie 5 minut z zastosowaniem ultradźwięków (parametry sonikacji: A = 0,5, cykl 0,5). Dyspersję dodaje się do roztworu PEGu i CDI. Układ miesza się 4 h w temperaturze pokojowej w atmosferze argonu. Tak przygotowaną dyspersję dodaje się do roztworu 0,45 g PLLGA w 10 ml DCM. Zawartość kolby sonikuje się 10 minut następnie miesza się 10 minut na mieszadle magnetycznym i wylewa na szalkę Petriego o średnicy 9 cm i pozostawia w temperaturze pokojowej do odparowania rozpuszczalnika. Następnie kompozyt suszy się w suszarce próżniowej w temperaturze

40°C przez 4 godziny. Temperatura T_g wyznaczona metodą DSC z krzywej chłodzenia zmierzonej z szybkością 10 K/min wynosi 47,0°C. Na krzywej chłodzenia nie występuje efekt egzotermiczny związany z krystalizacją ze stopu, co oznacza, że PLLGA w obecności cząstek hydroksyapatytu modyfikowanych L-lizyną i poli(glikolem etylenowym) o ciężarze cząsteczkowym 600 g/mol nie krystalizuje ze stopu podczas chłodzenia z szybkością 10 K/min. Temperatura początku zimnej krystalizacji (T_{cc}^{onset}) wyznaczona z drugiego ogrzewania wynosi 98,4°C. Obecność efektu egzotermicznego związanego z zimną krystalizacją wskazuje, że hydroksyapatyt modyfikowany L-lizyną i poli(glikolem etylenowym) o ciężarze cząsteczkowym 600 g/mol nukleuje zimną krystalizację PLLGA.

Przykład 4

Otrzymywanie kompozytu z kopolimeru poli(L-laktydu-co-glikolidu) z napełniaczem z hydroksyapatytu modyfikowanego L-lizyną oraz poli(glikolem etylenowym) o ciężarze cząsteczkowym 2000 g/mol.

W kolbie okrągłodennej o pojemności 50 cm³ zaopatrzonej w mieszadło magnetyczne umieszcza się 26,3 mg bursztynian glikolu monoetoksypolietylenowego o ciężarze cząsteczkowym 2000 g/mol (PEG2000), 2,8 mg CDI i dodaje się 10 ml DCM. Układ miesza się na mieszadle magnetycznym 2 h w temperaturze pokojowej w atmosferze argonu. Dysperguje się 0,05 g hydroksyapatytu funkcjonalizowanego L-lizyną w 5 cm³ DCM w czasie 5 minut z zastosowaniem ultradźwięków (parametry sonikacji: A = 0,5, cykl 0,5). Dyspersję dodaje się do roztworu PEGu i CDI. Układ miesza się 4 h w temperaturze pokojowej w atmosferze argonu. Tak przygotowaną dyspersję dodaje się do roztworu 0,45 g PLLGA w 10 ml DCM. Zawartość kolby sonikuje się 10 minut następnie miesza się 10 minut na mieszadle magnetycznym i wylewa na szalkę Petriego o średnicy 9 cm i pozostawia w temperaturze pokojowej do odparowania rozpuszczalnika. Następnie kompozyt suszy się w suszarce próżniowej w temperaturze 40°C przez 4 godziny. Temperatura T_g wyznaczona metodą DSC z krzywej chłodzenia zmierzonej z szybkością 10 K/min wynosi 28,7°C. Temperatura krystalizacji PLLGA ze stopu (T_c) wyznaczona z krzywej chłodzenia zmierzonej z szybkością 10 K/min wynosi 100,9°C, temperatura początku zimnej krystalizacji (T_{cc}^{onset}) wyznaczona z drugiego ogrzewania wynosi 86,7°C.

Zastrzeżenia patentowe

1. Kompozyty polimerowo-ceramiczne **znamiennie tym**, że matrycę stanowi poli(L-laktyd) PLLA lub poli(L-laktyd-co-glikolid) PLLGA, a fazą ceramiczną są cząstki hydroksyapatytu modyfikowane powierzchniowo pochodną poli(glikolu etylenowego) z karboksylową grupą końcową o ciężarach cząsteczkowych 600 g/mol oraz 2000 g/mol szczepioną do powierzchni hydroksyapatytu za pośrednictwem L-lizyny, przy czym kompozyt zawiera napełniacz w ilości 10% wagowych.
2. Sposób wytwarzania kompozytów polimerowo-ceramicznych z poli(L-laktydu) PLLA i poli(L-laktydu-co-glikolidu) PLLGA oraz hydroksyapatytu modyfikowanego L-lizyną i pochodną poli(glikolu etylenowego) w postaci folii metodą rozpuszczalnikową, **znamiennie tym**, że w pierwszym etapie przyłącza się kowalencyjnie pochodną poli(glikolu etylenowego) z karboksylową grupą końcową do pierwszorzędowych grup aminowych L-lizyny na powierzchni hydroksyapatytu z zastosowaniem czynnika sprzęgającego 1,1'-karbonylodiimidazolu z utworzeniem wiązania amidowego a w drugim etapie do dyspersji modyfikowanych powierzchniowo cząstek HAP dodaje się roztwór poli(L-laktydu) lub poli(L-laktydu-co-glikolidu) w dichlorometanie i otrzymuje się kompozyty polimerowo-ceramiczne z zawartością napełniacza w ilości 10% wagowych.