



Sposób wytwarzania reagującej na zmiany pH matrycy zeolitowo-polimerowej na bazie zeolitu wapniowo-magnezowego CaMg-X jako nośnika substancji leczniczej z grupy bisfosfonianów

Przedmiotem wynalazku jest sposób wykorzystania zeolitu Ca-X o typie struktury faujazytu (FAU) otrzymanego z wodnego roztworu odpadowego po syntezy zeolitów syntetycznych z popiołów lotnych poddanego wymianie jonowej do formy wapniowo-magnezowej CaMg-X do produkcji matrycy zeolitowo-polimerowej reagującej na zmiany pH jako nośnika substancji leczniczej z grupy bisfosfonianów.

Definicja zeolitów według Smitha i Brecka została opisana w Breck D.W., Zeolite Molecular Sieves, Structure Chemistry and Use, John Wiley & Sons, 1974. To glinokrzemiany o trójwymiarowym krystalicznym szkieletie tetraedrycznym zawierającym puste kanały i komory, w których znajdują się kationy i cząsteczki wody. w miejscu centralnym każdego tetraedru znajduje się atom krzemu lub glinu (zwany T-atomem). Tetraedry łączą się ze sobą za pośrednictwem atomów tlenu ułożonych w narożach każdego z nich. Ogólny wzór chemiczny zeolitu ma postać:



gdzie: M – kation metalu o wartościowości z; x – ilość tetraedrów AlO_4 ; T – ilość wszystkich tetraedrów (suma liczby tetraedrów AlO_4 i SiO_4); y – ilość cząsteczek wody.

Zeolit o strukturze faujazytu (FAU) charakteryzuje się szkieletem typu D6R i zbudowany jest z jednostek sodalitowych połączonych między sobą podwójnymi pierścieniami sześcioczłonowymi D6R. Ułożenie to tworzy superkomory o średnicy około 1,3 nm, które łączą się ze sobą czterema 12-członowymi pierścieniami o średnicy około 0,74 nm, będącymi porami wewnętrznymi struktury krystalicznej jak podaje Międzynarodowa Organizacja Zeolitowa – International Zeolite Association (<http://www.iza-structure.org/databases/>). Dla zachowania elektroobojętności ładunek glinu i krzemu zubożniany jest pozasieciowymi kationami, najczęściej Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} . Kationy te ze względu na swoją mobilność bardzo łatwo ulegają wymianie.

Wykorzystywany zeolit Na-X powstaje w wyniku zagospodarowania wodnego roztworu odpadowego po produkcji zeolitów syntetycznych z popiołów lotnych na podstawie zgłoszenia patentowego PL436212A1.

Chitozan (CH) jest naturalnym biopolimerem kationowym otrzymywanym w wyniku deacetylacji chityny w wyniku chemicznej lub enzymatycznej obróbki. Jest on rozpuszczalny w kwaśnym pH, a w większości przypadków jako rozpuszczalnik stosuje się wodne roztwory kwasu octowego. Wartość pKa chitozanu zawiera się pomiędzy pKa=6,3 a 7. Oznacza to, że powyżej pH = 7 grupy aminowe chitozanu nie są już protonowane, a on sam staje się nierozpuszczalny w roztworach wodnych. Ze względu na swoje właściwości chitozan jest powszechnie wykorzystywany w wielu gałęziach przemysłu oraz nauki, m.in. w farmacji, inżynierii materiałowej czy budownictwie.

Leczenie osteoporozy jest ważnym zadaniem w światowym systemie opieki zdrowotnej. Ponieważ choroba wpływa bezpośrednio na kości człowieka, nieleczona może spowodować znaczne pogorszenie narządu ruchu, obniżając jakość życia pacjenta. Przeprowadzone przez Kraljević Pavelić S., Krpan D., Žuvić M., Eisenwagen S., Pavelić K., Front. Med. 9 (2022),

- <https://doi.org/10.3389/fmed.2022.870962>, testy kliniczne pozwoliły dowieść pozytywnego wpływu zeolitów w procesie leczenia kości u pacjentów chorych na osteoporozę. Na ich podstawie możliwe jest wyciągnięcie wniosków, że zastosowanie zeolitów jako rozpuszczalnej formy krzemionki korzystnie wpływa na regenerację kości i proces ich przebudowy. Fabiano i wsp. w pracy Fabiano A., Piras A.M., Calderone V., Testai L., Flori L., Puppi D., Chiellini F., Zambito Y., *Nutrients* 11 (2019) 2467, <https://doi.org/10.3390/nu11102467>, potwierdzili, że naturalny zeolit (klinoptylolit) może być skutecznie stosowany jako system dostarczania wapnia charakteryzujący się jego przedłużonym uwalnianiem i zmniejszonymi skutkami ubocznymi. Badania na zwierzętach wykazały, że bogate w wapń granulki zeolitu można stosować w profilaktyce osteoporozy ze względu na zwiększenie poziomu osteokalcyny, która jest związana z procesami przebudowy kości.
- W pracy Sandomierski M., Adamska K., Ratajczak M., Voelkel A., *International Journal of Biological Macromolecules* 223 (2023) 812-820 opisano syntezę scaffoldu zawierającego nośnik w postaci zeolitu X, do którego przyłączono bezpośrednio substancję leczniczą (ryzedronian sodu), a uwalnianie zachodziło na skutek wymiany jonowej w pH 7.4.
- Opisany w artykule Sandomierski M., Jakubowski M., Ratajczak M., Pokora M., Zielińska M., Voelkel A., *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 111 (2023) 1005-1014, mechanizm polegał na syntezie nośnika zeolitowego z wymienionymi w strukturze jonami dwuwartościowymi przy czym uwalnianie substancji leczniczej następowało również na skutek wymiany jonowej w pH równym 7.4.
- W artykule Sandomierski M., Zielińska M., Voelkel A., *International Journal of Pharmaceutics* 578 (2020) 119117, opisali syntezę nośników zeolitowych w formie wapniowej (zeolit a i X) do uwalniania ryzedronianu sodowego w pH=7.4. Uwalnianie zachodziło na zasadzie wymiany jonowej ze względu, że substancja czynna była bezpośrednio przyłączona do zeolitu.
- W pracach Sandomierski M., Zielińska M., Voelkel A., *Materials Chemistry Frontiers* 5 (2021) 5718-5725 i Sandomierski M., Stachowicz W., Patalas A., Grochalski K., Graboń W., Voelkel A., *Materials* 16 (2023) 1710, ukazano możliwość modyfikacji implantów tytanowych przy pomocy powłok zawierających wapniowe, magnezowe i cynkowe formy sodalitu jako materiał umożliwiający uwalnianie ryzedronianu sodu w celach leczniczych.
- Z opisu patentowego [PL242079B1](#) znana jest metoda wytwarzania materiału tytanowego z warstwą zeolitową i przyłączonym lekiem (bisfosfonianem, w postaci ryzedronianu). Materiał tytanowy umieszcza się w mieszaninie glinianu sodu, krzemianu sodu i wodorotlenku sodu w podwyższonej temperaturze. Materiał poddaje się wymianie jonowej z jonami dwuwartościowymi (wapnia). Następnie przyłącza się bisfosfonian do powierzchni stopu umieszczając materiał tytanowy po wymianie jonowej w roztworze ryzedronianu na tydzień w temperaturze 35°C.
- Z aktualnego stanu wiedzy nie jest znany sposób wytwarzania reagującej na zmiany pH matrycy zeolitowo-polimerowej na bazie zeolitu wapniowo-magnezowego CaMg-X jako nośnika substancji leczniczej z grupy bisfosfonianów. Istniejące dane literaturowe i patentowe nie ukazują procesu wytwarzania matrycy zeolitowo-chitozanowej zawierającej lek z grupy bisfosfonianów reagującej na zmiany pH w celu kontrolowanego uwalniania. w wyniku oddziaływań chemicznych pomiędzy zeolitem zmodyfikowanym chitozanem a ryzedronianem dochodzi do utworzenia trójskładnikowego kompleksu

wrażliwego na zmiany pH. Tego typu rozwiązanie pozwala na uzyskanie materiału jako inteligentnego nośnika uwalniającego lek w zależności od pH miejscowego środowiska. Umożliwia to nacelowane dostarczanie leku w zależności od zapotrzebowania. w pH powyżej 7 chitozan występuje w formie nierozpuszczalnej, a w wyniku obniżenia pH w zakresie 4-7 obserwuje się stopniowe rozpuszczalnie łącznika chitozanowego i uwolnienie leku.

Celem wynalazku jest wytworzenie matrycy zeolitowo-polimerowej na bazie zeolitu wapniowo-magnezowego CaMg-X zawierającej ryzedronian sodu jako substancję leczniczą z grupy bisfosfonianów.

Istotą sposobu wytwarzania reagującej na zmiany pH matrycy zeolitowo-polimerowej na bazie zeolitu wapniowo-magnezowego CaMg-X jest to, że przygotowuje się matrycę, w której skład wchodzi sproszkowany zeolit Ca-X, który poddaje się dwukrotnej wymianie jonowej dodając w proporcji 1 część proszku do 20 części (w/o) wodnego roztworu chlorku magnezu o stężeniu 1 M, ciągle mieszając, w temperaturze poniżej 60°C, po czym otrzymany zeolit wapniowo-magnezowy CaMg-X suszy się i rozdrabnia. Sproszkowany zeolit CaMg-X miesza się w proporcji 1 część proszku do 20 części (w/o) 1% roztworu chitozanu w kwasie octowym o stężeniu 0,1 M, po czym mieszając dodaje się wodnego roztworu wodorotlenku sodu o stężeniu 1 M w ilości 20 ml do uzyskania pH=9. w dalszej kolejności zmodyfikowany zeolit odsącza się z roztworu, suszy i rozdrabnia otrzymując CaMgXCH. Następnie dodaje się wodny roztwór ryzedronianu sodu o stężeniu 7,5 mg/ml w proporcji 1 część proszku do 20 części roztworu (w/o) - mieszając w temperaturze pokojowej, po czym osad oddziela się i suszy w temperaturze poniżej 70°C do otrzymania stałej masy, następnie matrycę CaMgXCHRIS rozdrabnia się.

Korzystnym skutkiem zastosowania wynalazku jest otrzymanie matrycy umożliwiającej kontrolowane uwalnianie substancji leczniczej w zależności od pH środowiska. Zastosowany linker w postaci chitozanu pozwala kontrolować uwalnianie ryzedronianu w odpowiedzi na zmiany pH. Znanym jest fakt, że rozpuszczalność chitozanu zależy pośrednio od stopnia deacetylacji chityny oraz bezpośrednio od pH otoczenia. Chitozan nie jest rozpuszczalny w wodzie, natomiast jest rozpuszczalny w kwasach nieorganicznych i organicznych. Najczęściej wykorzystuje się kwas octowy. w środowisku kwaśnym grupy aminowe obecne w łańcuchu polimerowym ulegają protonowaniu w wyniku czego wzrasta hydrofilowość makromolekuł, a sam polimer staje się rozpuszczalny. Wykorzystanie tej właściwości pozwala na zaprojektowanie nośnika, w którym chitozan pełni rolę łącznika pomiędzy ciałem stałym a lekiem. w pH powyżej pKa chitozanu - powyżej 7, polimer znajdujący się na powierzchni jest nierozpuszczalny. Obniżenie pH prowadzi do protonacji grup aminowych oraz stopniowego rozpuszczania chitozanu. Skutkuje to uwolnieniem leku. Schematyczny przebieg procesu ukazano na Fig. 1. Kolejną zaletą wynalazku jest fakt, że wykorzystywany zeolit powstał z materiału odpadowego jakim był roztwór po produkcji zeolitów popiołowych na podstawie opisu zgłoszenia patentowego PL436212A1.

Wyniki pomiarów sposobu wytwarzania reagującej na zmiany pH matrycy zeolitowo-polimerowej zostały przedstawione na rysunku, na którym poszczególne figury przedstawiają:

Fig. 1 – Schemat ukazujący proces uwalniania leku w zależności od pH mikrośrodowiska.

Fig. 2 – Porównanie widm FTIR-PAS zeolitu CaMg-X oraz modyfikowanego chitozanem CaMgXCH.

5 Fig. 3 – Porównanie zawartości składników materiału wyjściowego modyfikowanego chitozanem (CaMgXCH) oraz materiału modyfikowanego chitozanem oraz ryzedronianem (CaMgXCHRIS).

Fig. 4 – Profile uwalniania ryzedronianu z matrycy CaMgXCHRIS w pH 4; 5,5 oraz 7,4.

Przykład

10 Etap 1: w szklanej zlewce o objętości 0,5 l umieszczono 10 g sproszkowanego poprzez utarcie w moździerz agatowym przez 3 minuty zeolitu Ca-X oraz 0,2 l roztworu chlorku magnezu o stężeniu 1 M. Tak przygotowaną suspensję mieszano przy użyciu mieszadła magnetycznego IKA C-MAG HS 7 przy 500 rpm przez 4 godziny w temperaturze 60°C. Po upływie czasu rozdzielono suspensję poprzez odwirowanie w wirówce laboratoryjnej MPW-351 przez 5 minut przy
15 10 000 rpm, a otrzymany osad wysuszono w temperaturze 70°C w suszarce laboratoryjnej POL-EKO, model SLW przez 24 h. Następnie osad ucierano w moździerz agatowym przez 3 minuty. Procedurę powtórzono jeszcze jeden raz. Tak otrzymany produkt – zeolit CaMg-X – wykorzystano w kolejnym etapie syntezy

Etap 2: w zlewce szklanej o objętości 0,5 l zawierającej 0,2 l 1% roztworu chitozanu w kwasie octowym o stężeniu 0,1 M umieszczono 10 g zeolitu CaMg-X sproszkowanego poprzez utarcie w moździerz agatowym przez 3 minuty. Tak przygotowaną substancję mieszano przy użyciu mieszadła magnetycznego IKA C-MAG HS 7 przy 500 rpm przez 5 godzin w temperaturze pokojowej w zakresie 20-25°C. Następnie dodawano wodny roztwór wodorotlenku sodu o stężeniu 1 M w ilości 20 ml aby uzyskać pH suspensji wynoszące 9 zmierzone przy pomocy pH-metru Elmetron CP-501.
25 Tak przygotowaną mieszaninę przesączono pod zmniejszonym ciśnieniem przy użyciu kolby ssawkowej, lejka Büchnera oraz sączka papierowego jakościowego o średnicy 150 mm firmy Ahlstrom Munktell. Uzyskany w ten sposób materiał w postaci serowatego osadu przepłukano przy użyciu 1 l wody destylowanej do pH supernatantu zawierającego się pomiędzy pH=6-7. Pomiaru pH dokonano przy użyciu laboratoryjnego papierka wskaźnikowego pH-Fix 0-14 firmy Macherey-Nagel. Osad
30 umieszczono na szklanej szalce i wstawiono do suszarki laboratoryjnej POL-EKO, model SLW rozgrzanej do temperatury 70°C. Temperaturę utrzymywano przez 12 h. Po wyjęciu produkt CaMgXCH ucierano w moździerz agatowym przez 3 minuty.

Etap 3: Następnie w zlewce szklanej o objętości 0,1 l zawierającej 0,04 l wodnego roztworu ryzedronianu sodu o stężeniu 7,5 mg/ml umieszczono 2 g utartego w moździerz agatowym na proszek sfunkcjonalizowanego chitozanem zeolitu CaMgXCH. Substancję mieszano przy użyciu mieszadła magnetycznego IKA C-MAG HS 7 przy 500 rpm przez 5 godzin w temperaturze pokojowej w zakresie 20-25°C. Następnie oddzielono osad od roztworu poprzez odwirowanie w wirówce laboratoryjnej MPW-351 przez 5 minut przy 10 000 rpm. Roztwór z nad osadu usunięto, a osad umieszczono na szklanej szalce i wstawiono do suszarki laboratoryjnej POL-EKO, model SLW rozgrzanej do temperatury 70°C.

Temperaturę utrzymywano przez 12 h. Po wyjęciu matrycę CaMgXCHRIS ucierano w moździerz agatowym przez 3 minuty.

5 Uzyskany materiał poddano badaniom. Widma FTIR-PAS (Fig. 2) otrzymano przy pomocy spektrometru Nicolet 8700 firmy Thermo Scientific z przystawką fotoakustyczną MTEC Model 300 stosując procedurę zawartą w instrukcji. Na widmach po modyfikacji zaobserwowano charakterystyczne drgania rozciągające C-H 2875 cm^{-1} pochodzące od grup alkilowych łańcucha polimerowego chitozanu (Fig. 2). Ponadto zaobserwowano charakterystyczne pasma odpowiadające drganiom: pasmo amidowe II 1547 cm^{-1} , C-H 1420 cm^{-1} , C-O 1375 cm^{-1} , C-N 1315 cm^{-1} świadczące o skutecznej modyfikacji zeolitu chitozanem. Modyfikację materiału przy użyciu leku – ryzedronianu sodu – potwierdzono na podstawie 10 obecności fosforu w próbce wykorzystując fluorescencyjną analizę rentgenowską przy pomocy spektrometru Epsilon 3x Panalytical stosując procedurę zawartą w instrukcji (Fig. 3). Zaobserwowano wzrost zawartości fosforu świadczący o efektywnej modyfikacji materiału przez ryzedronian sodu. Uwalnianie ryzedronianu sodu z wyprodukowanej matrycy przeprowadzono w trzech wartościach pH: 7,4 (w buforowanej fosforanem soli fizjologicznej do hodowli komórkowych z solami wapnia i magnezu, 15 DPBS), 5.5 (w buforze cytrynianowym) oraz 4 (w buforze cytrynianowym). Na podstawie badań potwierdzono, że otrzymana matryca umożliwia uwalnianie leku w sposób kontrolowany w zależności od pH otoczenia (Fig. 4). w pH 7,4 możliwe było uwolnienie tylko ok. 30% leku związanego bezpośrednio z powierzchnią zeolitu, bądź też wytrąconego podczas syntezy. w przypadku pH 5,5 po upływie około 120 minut uwolnione zostało ok. 80-90% leku. Wynikało to z zaprojektowanej struktury matrycy 20 polegającej na rozpuszczeniu łącznika chitozanowego w kwaśnym pH. Obniżenie pH do wartości 4,0 umożliwiło uwolnienie ok. 80-90% leku już po 10 minutach.

RZECZNIK PATENTOWY

Maciej Nowicki
mgr inż. Maciej Nowicki
Nr wp. 3476