



Makroporowaty implant kostny na bazie zeolitu wapniowo-magnezowego CaMg-X sfunkcjonalizowanego za pomocą chitozanu oraz sposób jego wytwarzania

Przedmiotem wynalazku jest stymulujący regenerację makroporowaty implant kostny na bazie zeolitu sfunkcjonalizowanego za pomocą chitozanu, hydroksyapatytu, agarozy oraz chitozanu do zastosowań w medycynie regeneracyjnej kości oraz sposób jego otrzymywania. Otrzymany według wynalazku biomateriał może znaleźć zastosowanie jako implant kostny do leczenia złamań kości o różnej etiologii, który będzie wspierał adhezję osteoblastów (komórek kościotwórczych) i ich aktywność kościotwórczą.

W rozwijającej i starzejącej się populacji wciąż występuje wiele przypadków ciężkich złamań kości, które wymagają interwencji chirurgicznej z zastosowaniem biomateriału wspierającego regenerację tkanki w miejscu implantacji. Dotychczas nie zostały opracowane i opisane w dostępnej literaturze naukowej implanty kostne zawierające w swoim składzie zeolity sfunkcjonalizowane za pomocą chitozanu, bioceramikę fosforanowo-wapniową, agarozę oraz chitozan. Przedmiotem wynalazku jest implant kostny zawierający w swoim składzie zeolit CaMg-X (zeolit otrzymany poprzez wymianę jonów sodu (Na^+) na jony wapnia (Ca^{2+}) i magnezu (Mg^{2+}) w strukturze zeolitu Na-X) sfunkcjonalizowany za pomocą chitozanu (CaMg-X-chitozan), hydroksyapatyt, agarozę oraz chitozan. Zastosowanie zeolitu CaMg-X-chitozan do produkcji implantu kostnego pozwoli usprawnić proces kościotworzenia poprzez uwalnianie do środowiska implantacji jonów Ca^{2+} i Mg^{2+} i tym samym stymulację adhezji osteoblastów (komórek kościotwórczych) i ich aktywności kościotwórczej. Chitozan to polimer pochodzenia naturalnego stosowany w wielu aplikacjach medycznych ze względu na cenne biologiczne właściwości, takie jak brak toksyczności, biokompatybilność, biodegradowalność, hydrofilowość oraz działanie bakteriostatyczne, bakteriobójcze i przeciwgrzybicze (Chung Y.C., Chen C.Y., Bioresource Technology, 99 (8), 2806–2814, 2008). Istnieje jednak potrzeba poprawy jego właściwości mechanicznych, zwłaszcza w zastosowaniach inżynierii tkankowej kości. Osiągane jest to poprzez łączenie chitozanu z bioceramiką fosforanowo-wapniową (Raz M. i wsp., Silicon, 10(2), 277-286, 2018). Bioceramika fosforanowo-wapniowa obecna w rusztowaniach kostnych wpływa również korzystnie na potencjał osteokonduktywny oraz bioaktywny biomateriałów (Dhivya S. i wsp., Journal of Nanobiotechnology, 13:40, 2015).

Z opisu patentu [PL242079B1](#) znany jest materiał w postaci stopu tytanu Ti6Al4V z przeznaczeniem na implant kostny, który został pokryty warstwą zeolitową zawierającą bisfosfonian w postaci ryzedronianu. Sposób otrzymywania charakteryzuje się tym, że materiał tytanowy pokrywa się zeolitem poprzez umieszczenie w mieszaninie glinianu sodu, krzemianu sodu i wodorotlenku sodu w podwyższonej temperaturze, po czym materiał tytanowy poddaje się wymianie jonowej z jonami Ca^{2+} , a następnie po wymianie jonowej, materiał tytanowy umieszcza się w roztworze ryzedronianu na jeden tydzień w temperaturze 35°C .

Znany jest sposób otrzymywania rusztowania kostnego złożonego z chitozanu, zeolitu zawierającego jony Ca^{2+} , hydroksyapatytu oraz ryzedronianu sodu. Sposób produkcji biomateriału polega na wymieszaniu roztworu chitozanu w kwasie octowym z hydroksyapatytem oraz zeolitem o strukturze Ca-X, który otrzymano w wyniku wymiany jonowej z zeolitu komercyjnego Na-X.

Otrzymaną masę poddano zamrożeniu i kolejno liofilizacji. Następnie zliofilizowany biomateriał poddano moczeniu w roztworze ryzedronianu sodu w celu jego adsorpcji na powierzchni rusztowania (M. Sandomierski i wsp., Int J Biol Macromol 223:812-820, 2022).

5 Z opisu patentu PL217897B1 znany jest sposób otrzymywania kompozytowych materiałów implantacyjnych opartych na fosforanie trójwapniowym (α -TCP) i chitozanie. Sposób charakteryzuje się tym, że do roztworu chitozanu w wodnym roztworze kwasu octowego, wprowadza się w jego skład modyfikujące jony Ca^{2+} , Mg^{2+} i/lub PO_4^{3-} , a następnie tak sporządzony roztwór dodaje się do wyjściowego proszku α -TCP.

10 Z opisu patentu PL235822B1 znany jest sposób otrzymywania makroporowatego rusztowania kostnego na bazie chitozanu w roztworze kwasu octowego oraz bioceramiki fosforanowo-wapniowej, które charakteryzuje się tym, że stanowi go chitozan, agarozą oraz bioceramika fosforanowo-wapniowa w postaci proszku lub nanoproszku, rozproszona w 0,5 - 3% wodnym roztworze kwasu octowego, przy czym proporcje wagowe stałych komponentów wynoszą odpowiednio 0,5 - 4% (w/v) chitozanu, 0,5 - 5% (w/v) agarozy oraz 1 - 70% (w/v) bioceramiki fosforanowo-wapniowej w odniesieniu do kwasu octowego.

15 Z opisu patentu PL227996B1 znany jest sposób wytwarzania materiału kompozytowego na bazie chitozanu, hydroksyapatytu i krzemionki, przeznaczonego na substytuty kości. Sposób otrzymywania materiału kompozytowego polega na tym, że roztwór wodny soli chitozanowej miesza się z nanoproszkiem hydroksyapatytowym oraz ewentualnie z glicerofosforanem wapnia za pomocą ultradźwięków do uzyskania homogenicznej pasty, którą wprowadza się następnie do zolu kwasu metakrzemowego.

20 Znany jest sposób wytwarzania rusztowania na bazie chitozanu i agarozy. Sposób obejmuje przygotowanie roztworu chitozanu w wodnym roztworze kwasu octowego oraz wodnego roztworu agarozy przygotowanego w temperaturze 90°C . Następnie do roztworu agarozy, dodawano roztwór chitozanu i całość zamrażano w temperaturze -80°C . Po zamrożeniu biomateriał liofilizowano. Otrzymany w ten sposób biomateriał zastosowano w inżynierii tkanki chrzęstnej (Merlin Rajesh Lal L.P. i wsp., Society For Biomaterials, 105(7), 1845-1855, 2017).

30 Przedmiotem wynalazku jest stymulujący regenerację makroporowatą implant kostny na bazie zeolitu CaMg-X sfunkcjonalizowanego za pomocą chitozanu (CaMg-X-chitozan), hydroksyapatytu, agarozy i chitozanu oraz sposób jego otrzymywania.

Istotą makroporowatego implantu kostnego według wynalazku jest to, że stanowi go chitozan, agarozą, hydroksyapatyt w postaci proszku lub nanoproszku oraz zeolit CaMg-X sfunkcjonalizowany za pomocą chitozanu - CaMg-X-chitozan w postaci proszku lub nanoproszku, otrzymany w ten sposób, że przygotowuje się matrycę, w której skład wchodzi:

35 -sproszkowany zeolit Ca-X, który poddaje się dwukrotnej wymianie jonowej dodając w proporcji 1 część proszku do 20 części (w/v) 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, który miesza się w proporcji 1 część proszku do 20 części (w/v) 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 a następnie zmodyfikowany zeolit odsącza się z roztworu, suszy i rozdrabnia otrzymując CaMg-X-chitozan;

5 rozprowadzone w 2% (v/v) wodnym roztworze kwasu octowego, przy czym proporcje wagowe stałych komponentów wynoszą odpowiednio 2% (w/v) chitozanu, 5% (w/v) agarozy, 20% (w/v) hydroksyapatytu w postaci proszku lub nanoproszku oraz 20% (w/v) zeolitu CaMg-X-chitozan w postaci proszku lub nanoproszku w odniesieniu do kwasu octowego.

10 Istotą sposobu wytwarzania makroporowatego implantu kostnego według wynalazku jest to, że do 2% (w/v) roztworu chitozanu przygotowanego w 2% (v/v) wodnym roztworze kwasu octowego, dodaje się kolejno 5% (w/v) agarozy, 20% (w/v) hydroksyapatytu w postaci proszku lub nanoproszku oraz 20% (w/v) zeolitu CaMg-X sfunkcjonalizowanego za pomocą chitozanu w postaci proszku lub nanoproszku, a następnie otrzymaną zawiesinę miesza się do uzyskania jednolitej masy, zaś do
15 otrzymanej masy dodaje się 2% (w/v) NaHCO₃, całość miesza się i przekłada do formy odpornej na wysoką i ultra-niską temperaturę, zaś formę inkubuje się w łaźni wodnej w temperaturze 90-95°C, korzystnie 95°C, przez 15-25 minut, korzystnie 15 minut, a następnie studzi w łaźni lodowej w temperaturze 4°C, zaś ostudzoną próbkę umieszcza się w zamrażarce w temperaturze -80°C na
20 okres 12 godzin, zaś zamrożoną próbkę poddaje się procesowi liofilizacji (10⁻²-10³ mbar) przez okres 18 godzin lub do momentu całkowitego wysuszenia próbki, zaś po liofilizacji, biomateriał wyciąga się z formy i zanurza w buforowanym roztworze soli fizjologicznej (PBS) na 5-15 minut lub do momentu całkowitego namoczenia próbki, a następnie biomateriał poddaje się suszeniu na powietrzu w temperaturze pokojowej.

25 Korzystnym skutkiem wynalazku jest to, że poprzez uwalnianie jonów Ca²⁺ i Mg²⁺ ze struktury zeolitu CaMg-X-chitozan będzie tworzyć korzystne mikrośrodowisko dla procesów kościotwórczych, zatem ze względu na swoje bardzo dobre właściwości mikrostrukturalne i biologiczne, otrzymany implant kostny może znaleźć zastosowanie w leczeniu złamań kości o różnej etiologii, gdzie będzie sprzyjał procesom regeneracyjnym w miejscu implantacji.

30

Przedmiot wynalazku ilustrują przedstawione poniżej przykłady:

Przykład I

Do 0,04 g chitozanu dodano 2 ml 2% (v/v) wodnego roztworu kwasu octowego i mieszano. Do uzyskanej masy dodano 0,1 g agarozy, całość zmieszano, a następnie dodano 0,4 g
35 hydroksyapatytu w postaci nanoproszku oraz 0,4 g zeolitu CaMg-X sfunkcjonalizowanego chitozanem w postaci proszku, otrzymanego w ten sposób, 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/v) wodnego roztworu chlorku magnezu o stężeniu 1 M, ciągle mieszając, w temperaturze poniżej 60°C, po czym otrzymany zeolit wapniowo-magnezowy CaMg-X
40 suszy się i rozdrabnia;

-sproszkowany zeolit CaMg-X, który miesza się w proporcji 1 część proszku do 20 części (w/v) 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 a następnie zmodyfikowany zeolit odsącza się z roztworu, suszy i rozdrabnia otrzymując CaMg-X-chitozan.

5 Całość mieszano do uzyskania jednolitej masy. Następnie dodano 0,04 g NaHCO₃, starannie wymieszano, po czym otrzymaną masę umieszczono w formie odpornej na działanie wysokiej i ultraniskiej temperatury. Formę inkubowano w łaźni wodnej w temperaturze 95°C przez 15 minut, a następnie ostudzono w łaźni lodowej w temperaturze 4°C. Ostudzony biomateriał umieszczono w zamrażarce w temperaturze -80°C na okres 12 godzin. Zamrożoną próbkę poddano procesowi
10 liofilizacji w średniej próżni (6×10^{-2} mbar) przez okres 18 godzin. Biomateriał wyciągnięto z formy, moczo 7 minut w buforowanym roztworze soli fizjologicznej (PBS) i następnie pozostawiono na powietrzu w temperaturze pokojowej w celu wysuszenia.

Otrzymany implant kostny charakteryzuje się makroporowatą mikrostrukturą (\emptyset porów > 100 μ m, porowatość > 40%). Ocena cytotoksyczności w stosunku do osteoblastów linii komórkowej hFOB
15 1.19 zgodnie z normami ISO dla wyrobów medycznych (ISO 1099-5:2009 oraz ISO 10993-12:2012) wykazała, że otrzymany implant kostny jest nietoksyczny (żywołność komórek eksponowanych przez okres 24 godzin na ekstrakt z implantu wynosiła 81% w porównaniu do negatywnej kontroli cytotoksyczności). Na podstawie przeprowadzonych badań udowodniono również, że otrzymany implant sprzyja adhezji i proliferacji osteoblastów na jego powierzchni. Uwalnianie ryzedronianu
20 z implantu do środowiska zachodzi tylko pod wpływem kwaśnego pH (< 6,0).

Przykład II

Do 0,08 g chitozanu dodano 4 ml 2% (v/v) wodnego roztworu kwasu octowego i mieszano. Do uzyskanej masy dodano 0,2 g agarozy, całość zmieszano, a następnie dodano 0,8 g
25 hydroksyapatytu w postaci nanoproszku oraz 0,8 g zeolitu CaMg-X sfunkcjonalizowanego chitozanem w postaci nanoproszku, otrzymanego w ten sposób, 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/v) wodnego roztworu chlorku magnezu o stężeniu 1 M, ciągle mieszając, w temperaturze poniżej 60°C, po czym otrzymany zeolit wapniowo-magnezowy CaMg-X
30 suszy się i rozdrabnia;

-sproszkowany zeolit CaMg-X, który miesza się w proporcji 1 część proszku do 20 części (w/v) 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 a następnie zmodyfikowany zeolit odsącza się z roztworu, suszy i rozdrabnia otrzymując CaMg-X-chitozan.

35 Całość mieszano do uzyskania jednolitej masy. Następnie dodano 0,08 g NaHCO₃, starannie wymieszano, po czym otrzymaną masę umieszczono w formie odpornej na działanie wysokiej i ultraniskiej temperatury. Formę inkubowano w łaźni wodnej w temperaturze 90°C przez 20 minut, a następnie ostudzono w łaźni lodowej w temperaturze 4°C. Ostudzony biomateriał umieszczono w zamrażarce w temperaturze -80°C na okres 12 godzin. Zamrożoną próbkę poddano procesowi
40 liofilizacji w średniej próżni (6×10^{-3} mbar) przez okres 18 godzin. Biomateriał wyciągnięto z formy,

moczone 7 minut w buforowanym roztworze soli fizjologicznej (PBS) i następnie pozostawiono na powietrzu w temperaturze pokojowej w celu wysuszenia.

Otrzymany implant kostny charakteryzuje się makroporowatą mikrostrukturą (\varnothing porów > 100 μm , porowatość > 40%). Ocena cytotoksyczności w stosunku do osteoblastów linii komórkowej hFOB 1.19 zgodnie z normami ISO dla wyrobów medycznych (ISO 1099-5:2009 oraz ISO 10993-12:2012) wykazała, że otrzymany implant kostny jest nietoksyczny (żywołność komórek eksponowanych przez okres 24 godzin na ekstrakt z implantu wynosiła 83% w porównaniu do negatywnej kontroli cytotoksyczności). Na podstawie przeprowadzonych badań udowodniono również, że otrzymany implant sprzyja adhezji i proliferacji osteoblastów na jego powierzchni. Uwalnianie ryzedronianu z implantu do środowiska zachodzi tylko pod wpływem kwaśnego pH (< 6,0).

W przykładach przedstawiono jedyne możliwe zastosowanie proporcji poszczególnych składników wynalazku, które skutkuje optymalnymi właściwościami biologicznymi implantu oraz zachowaniem wysokiej żywołności komórek.

RZECZNIK PATENTOWY
Maciej Nowicki
mgr inż. Maciej Nowicki
Nr wp. 3476