



Dwufunkcyjny, makroporowaty implant kostny na bazie czułego na zmiany pH kompleksu zeolitu wapniowo-magnezowego/chitozan/bisfosfonian oraz sposób jego wytwarzania

Przedmiotem wynalazku jest dwufunkcyjny, makroporowaty implant kostny na bazie czułego na zmiany pH kompleksu zeolitowo-chitozanowo-bisfosfonianowego do zastosowań w medycynie regeneracyjnej kości oraz sposób jego otrzymywania. Otrzymany według wynalazku biomateriał może znaleźć zastosowanie jako implant kostny do leczenia złamań osteoporotycznych, gdzie będzie zarówno hamował aktywność osteoklastów (komórek kościogubnych), jak i wspierał adhezję osteoblastów (komórek kościotwórczych) i ich aktywność kościotwórczą.

Tkanka kostna podlega ciągłej przebudowie, podczas której kość jest degradowana przez osteoklasty i zastępowana nową tkanką przez osteoblasty. Zaburzenie równowagi pomiędzy resorpcją kości a kościotworzeniem powoduje rozwój osteoporozy. Osteoporoza jest najczęściej występującą ogólnoustrojową chorobą metaboliczną kości w której przebiegu ma miejsce postępujący ubytek masy kostnej, a tym samym osłabienie struktury przestrzennej kości i wysokie ryzyko złamań (T. Sozen et al., Eur. J. Rheumatol. 4, 2017, 46–56). Podstawową formą leczenia osteoporozy są terapie mające na celu zahamowanie aktywności osteoklastów i procesu resorpcji kości. Bisfosfoniany są powszechnie stosowanymi lekami zapobiegającymi nadmiernej resorpcji kości. Ich mechanizm działania polega na hamowaniu rekrutacji i różnicowania osteoklastów oraz indukcji ich apoptozy, czyli tzw. „zaprogramowanej śmierci”. W praktyce klinicznej bisfosfoniany stosuje się głównie doustnie. Niemniej jednak długotrwałe stosowanie bisfosfonianów podczas terapii farmakologicznej wiąże się z poważnymi powikłaniami, m.in. z zaburzeniami żołądkowo-jelitowymi, hipokalcemią i niewydolnością nerek. Ponadto ładunek bisfosfonianów ogranicza ich przenikanie przez błony komórkowe powodując bardzo niską absorpcję w jelitach (ok. 1-10%) (M.T. Drake et al., Mayo Clin. Proc. 83, 2008, 1032–1045). Co więcej, w rozwijającej i starzejącej się populacji wciąż występuje wiele przypadków ciężkich złamań osteoporotycznych, które wymagają interwencji chirurgicznej z zastosowaniem biomateriału wspierającego regenerację tkanki w miejscu implantacji.

Dotychczas nie zostały opracowane i opisane w dostępnej literaturze naukowej dwufunkcyjne implanty kostne na bazie czułego na zmiany pH kompleksu zeolitowo-chitozanowo-bisfosfonianowego do zastosowań w leczeniu złamań osteoporotycznych, które będą jednocześnie hamować resorpcję kości przez osteoklasty oraz wspomagać regenerację tkanki kostnej. Przedmiotem wynalazku jest makroporowaty implant kostny zawierający w swoim składzie ryzedronian sodu (bisfosfonian należący do grupy leków antyresorpcyjnych), który został przyłączony do zeolitu wapniowo-magnezowego CaMg-X (zeolit otrzymany poprzez wymianę jonów  $\text{Na}^+$  na jony  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{Mg}^{2+}$  w strukturze zeolitu typu X – Na-X) za pomocą linkera (łącznika) chitozanowego, wrażliwego na niskie wartości pH, które występują podczas resorpcji kości za pośrednictwem osteoklastów. Co istotne, zastosowanie zeolitu CaMg-X do produkcji implantu kostnego pozwoli usprawnić proces kościotworzenia poprzez uwalnianie do środowiska implantacji jonów  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{Mg}^{2+}$  i tym samym stymulację adhezji osteoblastów (komórek kościotwórczych) i ich aktywności kościotwórczej.

Z opisu patentu [CN111544655A](#) znany jest sposób wytwarzania implantów kostnych na bazie samokoagulujących soli wapniowych, takich jak krzemian trójwapniowy, krzemian dwuwapniowy,

cytrynian wapnia, alginian wapnia, wodorofosforan wapnia, oraz bisfosfonianów w postaci soli wapniowych, które otrzymano w wyniku wymiany jonowej (alendronian wapnia, nerydronian wapnia, opadronian wapnia, ryzedronian wapnia, ibandronian wapnia lub pamidronian wapnia) do zastosowań w leczeniu złamań osteoporotycznych. Sposób otrzymywania charakteryzuje się tym, że bisfosfoniany w postaci soli wapniowej miesza się z co najmniej dwoma różnymi solami wapniowymi i kolejno rozprowadza się mieszaninę w wodzie.

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  $\text{Ca}^{2+}$ , a następnie po wymianie jonowej, materiał tytanowy umieszcza się w roztworze ryzedronianu na jeden tydzień w temperaturze  $35^{\circ}\text{C}$ . Założono, że uwalnianie leku z powierzchni tego materiału ma przebiegać stopniowo pod wpływem płynów ustrojowych.

Z opisu patentu [KR20020080018A](#), znany jest materiał wszczepialny na bazie biodegradowalnych polimerów (m.in. kwas alginowy, skrobia, dekstryna, dekstran, kwas polimlekowy, kwas poliglikolowy) oraz bisfosfonianów (np. etydronian, klodronian, pamidronian, alendronian, ryzedronian) charakteryzujący się powolnym uwalnianiem leku wraz z jego biodegradacją w miejscu podania. Sposób otrzymywania materiału opiera się na wymieszaniu roztworu polimeru z roztworem leku.

Znany jest sposób otrzymywania rusztowania kostnego złożonego z chitozanu, zeolitu zawierającego jony  $\text{Ca}^{2+}$ , 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 liofilizowany 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).

W przeciwieństwie do opisanych wyżej biomateriałów, implant kostny będący przedmiotem wynalazku będzie uwalniał lek (ryzedronian sodu) w sposób inteligentny wyłącznie w przypadku nadmiernej aktywności osteoklastów (komórek kościogubnych), ponieważ w swoim składzie zawiera czuły na zmiany pH kompleks zeolitowo-chitozanowo-ryzedronianowy. W kompleksie tym ryzedronian sodu został przyłączony do zeolitu CaMg-X za pomocą wrażliwego na niskie wartości pH chitozanowego linkera. Zatem w sytuacji nadmiernej aktywności osteoklastów (które obniżają miejscowo pH do wartości ok.  $\sim 4,0-4,5$ ), linker chitozanowy ulegnie rozpuszczeniu, uwalniając lek (ryzedronian) do środowiska w miejscu implantacji oraz hamując proces resorpcji kości. Ponadto, w kontakcie z płynami ustrojowymi ze struktury zeolitu CaMg-X uwalniane będą jony  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{Mg}^{2+}$ , usprawniając proces kościotworzenia za pośrednictwem osteoblastów (komórek kościotwórczych).

Przedmiotem wynalazku jest dwufunkcyjny implant kostny zbudowany z czułego na zmiany pH kompleksu zeolitowo-chitozanowo-bisfosfonianowego (CaMg-X-chitozan-ryzedronian), zeolitu

CaMg-X sfunkcjonalizowanego za pomocą chitozanu (CaMg-X-chitozan), hydroksyapatytu, chitozanu i agarozy oraz opracowana metoda jego otrzymywania.

Istotą dwufunkcyjnego, makroporowatego implantu kostnego według wynalazku jest to, że stanowi go chitozan, agaroz, hydroksyapatyt w postaci proszku lub nanoproszku, kompleks CaMg-X-chitozan-ryzedronian w postaci proszku lub nanoproszku, otrzymany 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 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, zaś w dalszej kolejności dodaje się wodny roztwór ryzedronianu sodu o stężeniu 7,5 mg/ml w proporcji 1 część proszku do 20 części roztworu (w/v) mieszając w temperaturze pokojowej, po czym osad oddziela się i suszy w temperaturze poniżej 70°C do otrzymania stałej masy, następnie matrycę CaMg-X-chitozan-ryzedronian rozdrabnia się;

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:

-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;

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, 10% (w/v) kompleksu CaMg-X-chitozan-ryzedronian w postaci proszku lub nanoproszku oraz 10% (w/v) zeolitu CaMg-X-chitozan w postaci proszku lub nanoproszku w odniesieniu do kwasu octowego.

Istotą sposobu wytwarzania dwufunkcyjnego, 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, 10% (w/v) kompleksu CaMg-X-chitozan-ryzedronian w postaci proszku lub nanoproszku oraz 10% (w/v) zeolitu CaMg-X sfunkcjonalizowanego za pomocą chitozanu (CaMg-X-chitozan) w postaci proszku lub nanoproszku, a następnie otrzymaną zawiesinę miesza się do

uzyskania jednolitej masy, zaś do otrzymanej masy dodaje się 2% (w/v)  $\text{NaHCO}_3$ , 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 okres 12 godzin, zaś zamrożoną próbkę poddaje się procesowi liofilizacji ( $10^{-2}$ - $10^{-3}$  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.

10

Korzystnym skutkiem wynalazku jest to, że poprzez uwalnianie jonów  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{Mg}^{2+}$  ze struktury zeolitu CaMg-X-chitozan będzie tworzyć korzystne mikrośrodowisko dla procesów kościotwórczych, zaś uwolniony ryzedronian będzie hamował aktywność komórek kościogubnych, a zatem ze względu na swoje bardzo dobre właściwości mikrostrukturalne i biologiczne, otrzymany według wynalazku dwufunkcyjny, makroporowaty implant kostny będzie mógł znaleźć zastosowanie w leczeniu złamań osteoporotycznych, gdzie będzie zarówno sprzyjał procesom regeneracyjnym w miejscu implantacji, jak i hamował resorpcję tkanki kostnej.

15

Przedmiot wynalazku ilustrują przedstawione poniżej przykłady:

20

#### **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 hydroksyapatytu w postaci nanoproszku, 0,2 g kompleksu CaMg-X-chitozan-ryzedronian w postaci proszku, otrzymanego w ten sposób, że przygotowuje się matrycę, w której skład wchodzi:

25

-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;

30

-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, zaś w dalszej kolejności dodaje się wodny roztwór ryzedronianu sodu o stężeniu 7,5 mg/ml w proporcji 1 część proszku do 20 części roztworu (w/v) - mieszając w temperaturze pokojowej, po czym osad oddziela się i suszy w temperaturze poniżej 70°C do otrzymania stałej masy, następnie matrycę CaMg-X-chitozan-ryzedronian rozdrabnia się;

35

oraz 0,2 g zeolitu CaMg-X-chitozan w postaci proszku, otrzymanego w ten sposób, że przygotowuje się matrycę, w której skład wchodzi:

40

-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;

-sposzkowany 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.

Całość mieszano do uzyskania jednolitej masy. Następnie dodano 0,04 g NaHCO<sub>3</sub>, 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 liofilizacji w średniej próżni ( $6 \times 10^{-2}$  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  $\mu$ m, 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 84% 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).

### **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 hydroksyapatytu w postaci nanoproszku, 0,4 g kompleksu CaMg-X-chitozan-ryzedronian w postaci nanoproszku otrzymanego w ten sposób, że przygotowuje się matrycę, w której skład wchodzi:

-sposzkowany 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;

-sposzkowany 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, zaś w dalszej kolejności dodaje się wodny roztwór ryzedronianu sodu o stężeniu 7,5 mg/ml w proporcji 1 część proszku do 20 części roztworu (w/v) mieszając w temperaturze pokojowej, po czym osad oddziela się i suszy w temperaturze poniżej 70°C do otrzymania stałej masy, następnie matrycę CaMg-X-chitozan-ryzedronian rozdrabnia się;

oraz 0,4 g zeolitu CaMg-X-chitozan 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 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.

Całość mieszano do uzyskania jednolitej masy. Następnie dodano 0,08 g NaHCO<sub>3</sub>, 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 liofilizacji w średniej próżni ( $6 \times 10^{-3}$  mbar) przez okres 18 godzin. Biomateriał wyciągnięto z formy, moczo 15 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  $\mu$ m, 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 86% 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