



Implant kostny na bazie kurdlanu oraz czułego na zmiany pH kompleksu zeolitowo-chitozanowo-bisfosfonianowego oraz sposób jego wytwarzania

Przedmiotem wynalazku jest implant kostny na bazie czułego na zmiany pH kompleksu zeolitowo-chitozanowo-bisfosfonianowego, kurdlanu (β -1,3-glukan) i bioceramiki fosforanowo-wapniowej 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 hamował aktywność osteoklastów (komórek kościogubnych).

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 implanty kostne na bazie czułego na zmiany pH kompleksu zeolitowo-chitozanowo-bisfosfonianowego, kurdlanu i bioceramiki fosforanowo-wapniowej do zastosowań w leczeniu złamań osteoporotycznych, które będą hamować resorpcję kości przez osteoklasty oraz wspierać regenerację tkanki w miejscu implantacji. Przedmiotem wynalazku jest implant kostny zawierający w swoim składzie ryzedronian sodu (bisfosfonian należący do grupy leków antyresorpcyjnych), który został przyłączony do zeolitu Na-X za pomocą linkera (łącnika) chitozanowego, wrażliwego na niskie wartości pH, które występują podczas resorpcji kości za pośrednictwem osteoklastów.

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 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).

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

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.

Z opisów patentowych PL206394B1 i EP2421570A2 znany jest bioaktywny ceramiczno-polimerowy materiał kompozytowy wytworzony z bioceramiki fosforanowo-wapniowej i kurdlanu. Sposób produkcji biomateriału polega na tym, że do wodnej zawiesiny kurdlanu dodaje się bioceramikę fosforanowo-wapniową w postaci mikroporowatych granul o rozmiarze 0,1-1,0 mm i o porowatości otwartej 50-70% i miesza się dokładnie, i kolejno po umieszczeniu w formie, ogrzewa przez 5-30 minut w temperaturze $80-100^{\circ}\text{C}$.

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 Na-X za pomocą wrażliwego na niskie wartości pH chitozanowego linkera. Zatem w sytuacji nadmiernej aktywności osteoklastów (które obniżą miejscowo pH do wartości ok. ~4,0-4,5), linker chitozanowy ulegnie rozpuszczeniu, uwalniając lek (ryzedronian) do środowiska w miejscu implantacji oraz hamując proces resorpcji kości.

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

za pomocą chitozanu (Na-X-chitozan), kurdlanu i bioceramiki fosforanowo-wapniowej oraz sposób jego otrzymywania.

Istotą implantu kostnego według wynalazku jest to, że stanowi go kurdlan, bioceramika fosforanowo-wapniowa (HA, TCP, modyfikowany HA, BCP) w postaci granul, korzystnie o rozmiarze < 1,0 mm, kompleks Na-X-chitozan-ryzedronian w postaci proszku lub nanoproszku, otrzymany w ten sposób, że przygotowuje się matrycę, w której skład wchodzi:

-sproszkowany zeolit Na-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 mieli otrzymując Na-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 oddziela się osad od roztworu i suszy się w temperaturze poniżej 70°C do otrzymania stałej masy, a następnie matrycę Na-X-chitozan-ryzedronian rozdrabnia się;

oraz zeolit Na-X sfunkcjonalizowany za pomocą chitozanu (Na-X-chitozan) w postaci proszku lub nanoproszku, otrzymany w ten sposób, że przygotowuje się matrycę, w której skład wchodzi:

-sproszkowany zeolit Na-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 mieli otrzymując Na-X-chitozan;

rozprowadzone w wodzie dejonizowanej, przy czym proporcje wagowe stałych komponentów wynoszą odpowiednio 8% (w/v) kurdlanu, 40% (w/v) bioceramiki fosforanowo-wapniowej (HA, TCP, modyfikowany HA, BCP) w postaci granul, korzystnie o rozmiarze < 1,0 mm, 10% (w/v) kompleksu Na-X-chitozan-ryzedronian w postaci proszku lub nanoproszku oraz 10% (w/v) zeolitu Na-X-chitozan w postaci proszku lub nanoproszku w odniesieniu do wody dejonizowanej.

Istotą sposobu wytwarzania implantu kostnego według wynalazku jest to, że do 8% (w/v) roztworu kurdlanu przygotowanego w wodzie dejonizowanej, dodaje się kolejno 40% (w/v) bioceramiki fosforanowo-wapniowej (HA, TCP, modyfikowany HA, BCP) w postaci granul, korzystnie o rozmiarze < 1,0 mm, 10% (w/v) kompleksu Na-X-chitozan-ryzedronian w postaci proszku lub nanoproszku i 10% (w/v) zeolitu Na-X sfunkcjonalizowanego za pomocą chitozanu (Na-X-chitozan) w postaci proszku lub nanoproszku, otrzymaną zawiesinę miesza się do uzyskania jednolitej masy i przekłada do formy odpornej na wysoką temperaturę, zaś formę inkubuje się w łaźni wodnej w temperaturze 80-100°C, korzystnie 95°C, przez 5-30 minut, korzystnie 20 minut, a następnie studzi się do temperatury pokojowej, wyjmuje z formy i poddaje suszeniu na powietrzu.

Korzystnym skutkiem wynalazku jest to, że poprzez uwalnianie ryzedronianu sodu z kompleksu zeolitowo-chitozanowo-ryzedronianowego będzie hamować aktywność komórek kościogubnych, a ze względu na swoje bardzo dobre właściwości biologiczne i poręczność chirurgiczną, otrzymany według wynalazku implant kostny będzie mógł znaleźć zastosowanie

w leczeniu złamań osteoporotycznych, gdzie będzie wspierał procesy regeneracyjne w miejscu implantacji poprzez hamowanie resorpcji tkanki kostnej.

Przedmiot wynalazku ilustrują przedstawione poniżej przykłady:

5 **Przykład I**

Do 0,16 g kurdlanu dodano 2 ml wody dejonizowanej i mieszano. Do uzyskanej zawiesiny kurdlanu dodano 0,8 g hydroksyapatytu (HA) w postaci granul o rozmiarze w zakresie 0,1-1,0 mm, 0,2 g kompleksu Na-X-chitozan-ryzedronian w postaci proszku, otrzymanego w ten sposób, że przygotowuje się matrycę, w której skład wchodzi:

10 -sproszkowany zeolit Na-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 mieli otrzymując Na-X-chitozan, zaś w dalszej kolejności dodaje się wodny roztwór ryzedronianu sodu o stężeniu 7,5 mg/ml w proporcji 1 część
15 proszku do 20 części roztworu (w/v) mieszając w temperaturze pokojowej, po czym oddziela się osad od roztworu i suszy się w temperaturze poniżej 70°C do otrzymania stałej masy, a następnie matrycę Na-X-chitozan-ryzedronian rozdrabnia się;
oraz 0,2 g zeolitu Na-X-chitozan w postaci proszku, otrzymanego w ten sposób, że przygotowuje się matrycę, w której skład wchodzi:

20 -sproszkowany zeolit Na-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 mieli otrzymując Na-X-chitozan.
Całość mieszano do uzyskania jednolitej masy, po czym otrzymaną masę umieszczono w formie
25 odpornej na działanie wysokiej temperatury. Formę inkubowano w łaźni wodnej w temperaturze 95°C przez 15 minut, a następnie ostudzono do temperatury pokojowej. Ostudzony biomateriał wyjęto z formy i suszono w temp. pokojowej przez 24 godziny na powietrzu.

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
30 otrzymany implant kostny jest nietoksyczny (żywołność komórek ekspozowanych przez okres 24 godzin na ekstrakt z implantu wynosiła 82% 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).

35 **Przykład II**

Do 0,16 g kurdlanu dodano 2 ml wody dejonizowanej i mieszano. Do uzyskanej zawiesiny kurdlanu dodano 0,8 g α -fosforanu trójwapniowego (α -TCP) w postaci granul o rozmiarze w zakresie 0,1-1,0 mm, 0,2 g kompleksu Na-X-chitozan-ryzedronian w postaci nanoproszku, otrzymanego w ten sposób, że przygotowuje się matrycę, w której skład wchodzi:

-sproszkowany zeolit Na-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 mieli otrzymując Na-X-chitozan, zaś w dalszej

5 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 oddziela się osad od roztworu i suszy się w temperaturze poniżej 70°C do otrzymania stałej masy, a następnie matrycę Na-X-chitozan-ryzedronian rozdrabnia się;

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

-sproszkowany zeolit Na-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 mieli otrzymując Na-X-chitozan.

15 Całość mieszano do uzyskania jednolitej masy, po czym otrzymaną masę umieszczono w formie odpornej na działanie wysokiej temperatury. Formę inkubowano w łaźni wodnej w temperaturze 95°C przez 20 minut, a następnie ostudzono do temperatury pokojowej. Ostudzony biomateriał wyjęto z formy i suszono w temp. pokojowej przez 24 godziny na powietrzu.

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 20 otrzymany implant kostny jest nietoksyczny (żywołność komórek ekspozowanych 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 25 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