

(19)



URZĄD  
PATENTOWY  
RZECZYPOSPOLITEJ  
POLSKIEJ

(10) **PL 244455 B1**

(12)

## Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **435104**

(22) Data zgłoszenia: **2020.08.26**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2022.02.28 BUP 09/2022**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2024.01.29 WUP 05/2024**

(51) MKP:

**A61L 27/12** (2006.01)

**A61L 27/20** (2006.01)

**A61L 27/24** (2006.01)

**A61L 27/52** (2006.01)

**A61L 27/54** (2006.01)

**A61P 19/10** (2006.01)

:

(73) Uprawniony z patentu:

**UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI, Kraków, PL**

(72) Twórca(-y) wynalazku:

**JOANNA LEWANDOWSKA-ŁAŃCUCKA,**

**Wolbrom, PL**

**MARIA NOWAKOWSKA, Kraków, PL**

**ADRIANA GILARSKA, Lutków, PL**

(74) Pełnomocnik:

**rzecz. pat. Rafał Witek, Wrocław, PL**

(54) Tytuł:

**Wielofunkcyjny, hydrożelowy materiał hybrydowy, sposób jego otrzymywania oraz zastosowanie w leczeniu ubytków kostnych**

**PL 244455 B1**

## Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest wielofunkcyjny materiał hybrydowy o potencjale terapeutycznym, sposób otrzymywania takich materiałów hydrożelowych oraz ich zastosowanie w medycynie regeneracyjnej, w szczególności w leczeniu ubytków kostnych spowodowanych osteoporozą.

Niniejszy wynalazek dotyczy wielofunkcyjnego, wstrzykiwalnego hydrożelowego materiału hybrydowego przydatnego do odbudowy tkanki kostnej, w szczególności niewielkich ubytków kostnych spowodowanych osteoporozą. Materiał ten można w sposób precyzyjny i mało inwazyjny wprowadzić do miejsca stanowiącego ubytek, gdzie utworzy rusztowanie umożliwiające odbudowę tkanki kości. Kompozycja tego materiału umożliwia jego biointegrację, tworzy dogodną biomatrycę dla zasiedlania przez komórki osteoblastyczne (biomimetyczny skład), posiada pożądane właściwości mechaniczne (matryca polimerowa wzbogacona fazą mineralną), a także posiada wysoki potencjał terapeutyczny (obecność cząstek krzemionkowo-apatytowych z przyłączonym lekiem – alendronianem). Tak skonstruowane biopolimerowe rusztowania, sieciowane chemicznie substancją pochodzenia naturalnego, pełni dodatkowo funkcję układu do kontrolowanego, zlokalizowanego dostarczania substancji aktywnej (alendronianu) odgrywającej kluczową rolę w terapii osteoporozy w miejscu uszkodzenia tkanki kostnej. Rozwiązanie to zapewnia nieinwazyjną lokalizację rusztowania w miejscu implantacji, przy jednoczesnym zachowaniu struktury, właściwości biologicznych i ograniczeniu potencjalnych, niekorzystnych skutków ubocznych terapii.

W literaturze opisano różne typy nośników alendronianu w tym nanocząstki [Posadowska, U., et al., (2015), *Int. J. Pharm.*, 485(1–2), 31–40], mikrokapsuły [Mondal, T. et al., (2012), *Mater. Sci. Eng. C*, 32(4), 697–706], cement kostny [van Houdt, C. I., et al., (2018), *Sci Rep*, 8(1), 1–13], materiały mezooporowate [Cicco, S. R., et al., (2019), *Mater. Sci. Eng. C*, 104, 109897; Manzano, M., et al., (2009), *Expert Opin. Drug Deliv*, 6(12), 1383–1400], termoczule hydrożele chitozanowe [Nafee, N., et al., (2018), *J. Drug Target*, 26(7), 563–575] czy hydrożelowe materiały hybrydowe typu kolagen – hydroksyapatyt [Ma X., et al., *Colloids Surf B Biointerfaces* 143 (2016) 81–87].

W publikacji Larsen, C., et al., (2009), *Expert Opin. Drug Deliv*, 6(12), 1283–1295 dokonano przeglądu literaturowego, w którym ujawniono możliwość wykorzystania mezooporowatej krzemionki jako nośnika dla alendronianu. Prowadzone badania obejmowały zastosowanie różnych typów matryc mezooporowatych, jak również ich modyfikacji grupami aminopropylowymi. Wykazano, iż załadunek leku w matrycy mezooporowatej wzrasta wraz ze zwiększającą się powierzchnią materiału. Ujawniono również, iż obecność grup aminowych w modyfikowanej mezooporowatej krzemionce istotnie poprawia wydajność załadunku leku, co wyjaśniono jako efekt silnych oddziaływań pomiędzy grupami aminowymi matrycy i grupami fosforanowymi alendronianu.

W pracy Cicco, S. R., et al., (2019), *Mater. Sci. Eng. C*, 104, 109897 wykazano, że obecność mezooporowatej biokrzemionki hamuje efekt cytotoksyczny samego alendronianu. Zaproponowany modelowy układ (materiał na podłożu) nie zapewnia jednak zlokalizowanej implantacji w sposób nieinwazyjny.

W publikacji Ma X., et al., *Colloids Surf B Biointerfaces* 143 (2016) 81–87 ujawniono dwuetapowy proces otrzymywania biomimetycznych hybrydowych hydrożeli jako potencjalnych rusztowań do inżynierii tkankowej, zawierających kolagen, hydroksyapatyt i alendronian. Hydroksyapatyt pokryty alendronianem (4,0% wag.) zawieszono w kolagenie usieciowanym za pomocą genipiny w warunkach fizjologicznych. Autorzy otrzymali układ HAp-ALN wykorzystując opisane w literaturze powinowactwo leku do hydroksyapatytu [Neamtu, J., et al., (2017), *J. Therm. Anal. Calorim*, 127(2), 1567–1582], przy czym zastosowali dostępny komercyjnie HAp. Zaobserwowano poprawę właściwości mechanicznych a także brak efektu cytotoksycznego względem linii osteoklastycznej MG-63. W pracy tej nie ujawniono badań, które wykazałyby efekt terapeutyczny jak również poprawę biointegracji.

W polskim zgłoszeniu patentowym nr P.428993 opisano sposób otrzymywania hydrożelowego materiału hybrydowego zawierającego cząstki krzemionki modyfikowane powierzchniowo grupami aminowymi rozproszone w mieszaninie biopolimerów (kolagen, chitozan, kwas hialuronowy o stosunku wagowym 50:40:10) sieciowanych genipiną. Do otrzymania tego materiału zastosowano dostępny komercyjnie kwas hialuronowy (nie poddawano go żadnym modyfikacjom) i stanowił on 10% wag mieszaniny biopolimerowej. Materiał ten nie zawierał w swoim składzie alendronianu i nie posiadał właściwości terapeutycznych.

Analogiczny materiał do ujawnionego w zgłoszeniu patentowym nr P.428993 został także opisany w artykule Joanny Lewandowskiej-Łańcuckiej i wsp. opublikowanym w *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 136, 25 czerwca 2019, strony 1196–1208.

Przebudowa tkanki kostnej jest procesem warunkującym prawidłowe funkcjonowanie układu szkieletowego i tym samym całego organizmu. Proces ten zostaje zapoczątkowany w momencie przerwania ciągłości (powstania mikropęknięcia) kanalików tworzonych przez wypustki cytoplazmatyczne osteocytów, które zapewniają osteocytom łączność między sobą oraz z osteoblastami w stanie spoczynku (tzw. komórkami wyścielającymi). W konsekwencji dochodzi do apoptozy osteocytów, co jest zarazem sygnałem dla komórek wyścielających o miejscu i zakresie uszkodzenia tkanki. W kolejnym etapie komórki wyścielające uwalniają czynniki lokalne stanowiące sygnał dla komórek prekursorowych osteoklastów do rozpoczęcia procesu migracji w uszkodzone miejsce i różnicowania w osteoklasty (osteoklastogeneza). Dojrzałe osteoklasty resorbują macierz kostną wraz z mikropęknięciem, drażąc tzw. jamę resorpcyjną. Faza ta określana fazą resorpcji trwa około 2–4 tygodni i kończy się apoptozą osteoklastów. Po tym okresie następuje krótka faza odwrotu, w trakcie której jama resorpcyjną zostaje ponownie wyścielona komórkami kościotwórczymi (osteoblastami). Następnie dochodzi do trwającej około 4–6 miesięcy fazy kościotworzenia, w trakcie której osteoblasty produkują osteoid, który jest stopniowo mineralizowany prowadząc do wypełnienia ubytku w pełni zmineralizowaną kością.

Osteoporoza jest stanem chorobowym, w trakcie którego dochodzi do zaburzenia równowagi procesów resorpcji i kościotworzenia, co w efekcie prowadzi do wzmożonej resorpcji i przyspieszenia obrotu kostnego. Ponadto w miarę starzenia się organizmu procesy tworzenia kości stają się mniej wydajne, co prowadzi do zmniejszenia ilości tworzonej kości i zwiększenia ilości kości resorbowanej. Oznacza to, że każdemu cyklowi wewnętrznej przebudowy kości towarzyszy usunięcie pewnej ilości tkanki kostnej, co wiąże się z utratą masy kości i uszkodzeniem jej struktury. W efekcie obrót kostny zostaje zintensyfikowany – dochodzi do tworzenia większej ilości jam resorpcyjnych na danej powierzchni w danym momencie a czas mineralizacji kości ulega skróceniu. Najczęściej stosowaną grupą leków w leczeniu osteoporozy (u kobiet po menopauzie, osteoporozy indukowanej kortykosteroidami) są bisfosfoniany, w szczególności bisfosfoniany azotowe, np. alendronian sodu, ALN, które ze względu na powinowactwo do minerału kostnego (hydroksyapatytu) charakteryzują się wysoką selektywnością w stosunku do tkanki kostnej. Głównym celem działania tych leków jest normalizacja nadmiernej aktywności resorpcyjnej osteoklastów i podwyższonego obrotu kostnego. Bisfosfoniany azotowe doprowadzają do śmierci komórki osteoklasta w wyniku inhibicji syntazy difosforanu farnezyli (FPP – enzym szlaku mewalonowego), którego podstawową rolą jest produkcja substratów dla syntezy związków kluczowych dla prawidłowego metabolizmu komórkowego. W rezultacie dochodzi do zaburzeń cytoszkieletu osteoklastów, fałdowania błony oraz ruchu pęcherzyków transportujących, co prowadzi do utraty aktywności resorpcyjnej osteoklastów i w konsekwencji apoptozy komórki. Badania przedkliniczne wykazały, iż lek ten nie ma bezpośredniego wpływu na proces tworzenia kości, tkanka kostna wytwarzana podczas leczenia alendronianem wykazuje prawidłową budowę. Lek ten jest najczęściej podawany doustnie, co niestety wiąże się z licznymi skutkami ubocznymi (martwica kości szczęki, podrażnienie układu żołądkowo-jelitowego, nudności). Dożylnie podawanie ALN obok skutków ubocznych w postaci gorączki, objawów grypopodobnych i zaburzenia równowagi elektrolitowej niesie również ze sobą ryzyko nefrotoksyczności spowodowanej tworzeniem się kompleksów z wapniem a także akumulacją w niezwapnionych tkankach. W związku z tym układ umożliwiający miejscowe podanie i tym samym zlokalizowane działanie tego leku wydaje się być niezwykle atrakcyjnym rozwiązaniem, zapewniającym ograniczenie resorpcji kości i jednocześnie ograniczającym ogólnoustrojowe skutki uboczne w trakcie trwania całej terapii.

Zaspokajanie rosnącego zapotrzebowania na wielofunkcyjne biomateriały dla potrzeb inżynierii tkankowej o określonych właściwościach fizycznych, chemicznych i biologicznych napotyka na ograniczenia związane ze skomplikowanymi procedurami ich otrzymywania i wysokimi kosztami produkcji. Powoduje to powstanie problemów technicznych pomiędzy badaniami laboratoryjnymi, a zastosowaniami terapeutycznymi.

Problemem technicznym jest dostarczenie wielofunkcyjnego, hydrożelowego materiału hybrydowego i sposobu jego otrzymywania, nadającego się do stosowania w inżynierii tkankowej, który wykazywałby efekt terapeutyczny, tj. hamujący aktywność osteoklastów i jednocześnie niehamujący aktywności osteoblastów, przy czym poszukiwany materiał hydrożelowy powinien ulegać szybkiej biomineralizacji, korzystnie po kilku dniach od podania, co umożliwiłoby jego szybszą biointegrację z tkanką kostną wspomagając proces kościotworzenia.

Celem niniejszego wynalazku było opracowanie i wytworzenie wielofunkcyjnego, hydrożelowego materiału hybrydowego, który charakteryzowałby się jednocześnie:

- potencjałem terapeutycznym pozwalającym na inhibicję komórek osteoklastycznych,
- bioaktywnością polegającą na szybkiej biointegracji materiału z kością i wspomaganiem procesu mineralizacji kości, zwłaszcza procesu mineralizacji kości zaburzonego w wyniku osteoporozy,
- biomimetycznym składem zapewniającym środowisko sprzyjające funkcjonowaniu osteoblastów,
- wstrzykiwalnością umożliwiającą nieinwazyjne i zlokalizowane wprowadzenie materiału w postaci zolu do ubytku kostnego i zdolnością do sieciowania w warunkach fizjologicznych.

Nieoczekiwanie określony powyżej cel został osiągnięty w niniejszym wynalazku.

Przedmiotem wynalazku jest wielofunkcyjny, hydrożelowy materiał hybrydowy, charakteryzujący się tym, że zawiera:

- a) matrycę biopolimerową zawierającą: kolagen, chitozan, kwas hialuronowy modyfikowany lizyną,
- b) sfunkcjonalizowane grupami aminowymi cząstki krzemionkowo-apatytowe,
- c) substancję czynną w postaci alendronianu przyłączonego do cząstek krzemionkowo-apatytowych,
- d) substancję sieciującą,

przy czym matryca biopolimerowa zawiera: kolagen, chitozan, kwas hialuronowy, korzystnie modyfikowany, w stosunku wagowym wynoszącym odpowiednio 5:2:3.

natomiast substancją sieciującą jest genipina.

Kolejnym przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania wielofunkcyjnego, hydrożelowego materiału hybrydowego, charakteryzujący się tym, że obejmuje następujące etapy:

- a) cząstki krzemionkowe funkcjonalizuje się grupami aminowymi metodą zol-żel, przy czym do mieszaniny reakcyjnej składającej się z etanolu i wody wprowadza się tetraetoksylan i aminopropylotrietoksylan i miesza się przez 30 minut w temperaturze pokojowej, a otrzymany w reakcji materiał oddziela się, a następnie oczyszcza przepłukując etanolem,
- b) cząstki otrzymane w etapie a) zawiesza się w sztucznym osoczu o stężeniu 1,5M, otrzymując po 10 dniach inkubacji cząstki krzemionkowe pokryte apatytową fazą mineralną,
- c) do cząstek otrzymanych w etapie b) przyłącza się w warunkach zasadowych alendronian sodu,
- d) do wodnej zawiesiny cząstek z etapu c) dodaje się roztwór kolagenu, chitozanu i modyfikowanego lizyną kwasu hialuronowego,
- e) mieszaninę otrzymaną w etapie d) poddaje się reakcji sieciowania genipiną.

Korzystnie, prowadzi się go metodą zol-żel.

Kolejnym przedmiotem wynalazku jest wielofunkcyjny, hydrożelowy materiał hybrydowy według wynalazku określony powyżej lub otrzymany sposobem według wynalazku określonym powyżej do stosowania w leczeniu lub profilaktyce uszkodzeń tkanki kostnej, zwłaszcza będących efektem osteoporozy.

Dla lepszego zrozumienia istoty wynalazku niniejszy opis został zilustrowany załączonymi figurami.

Na fig. 1 przedstawiono mikrofotografie SEM submikronowych cząstek  $\text{SiO}_2\text{-Ap}$  oraz  $\text{SiO}_2\text{-Ap-ALN}$ .

Fig. 2 zestawiono dyfraktogramy cząstek  $\text{SiO}_2\text{-Ap}$  oraz  $\text{SiO}_2\text{-Ap-ALN}$ .

Fig. 3 zestawiono widma XPS cząstek  $\text{SiO}_2\text{-Ap}$  oraz  $\text{SiO}_2\text{-Ap-ALN}$ .

Fig. 4 zestawiono profile termogravimetryczne cząstek  $\text{SiO}_2\text{-Ap}$  oraz  $\text{SiO}_2\text{-Ap-ALN}$ .

Na fig. 5 przedstawiono mikrofotografie SEM ukazujących morfologię otrzymanych materiałów hybrydowych, a także materiału kontrolnego  $\text{KolChHA}_{\text{mod}}$ .

Na fig. 6 przedstawiono zestawienie wyników badań reologicznych, wartości  $G'$  zmierzone po 10, 35 i 70 minutach eksperymentu, gdzie wyniki przedstawiono w skali logarytmicznej. Istotność statystyczną ( $p < 0.05$ ) wykazano wykorzystując test Studenta. \* wskazuje istotność statystyczną względem wyniku dla  $\text{KolChHA}_{\text{mod}}$  po 70 min, # wskazuje istotność statystyczną względem wyniku  $\text{KolChHA}_{\text{mod}} \text{ C1}$  po 70 min.

Na fig. 7 przedstawiono zestawienie wyników badań stopnia pęcznienia.

Na fig. 8 przedstawiono zestawienie wyników badań degradacji enzymatycznej.

Na fig. 9 przedstawiono mikrofotografie SEM materiałów hybrydowych wraz z wartościami stosunku wapnia do fosforu (Ca/P) wyznaczonymi techniką EDS dla fazy mineralnej utworzonej na powierzchni materiałów po 3 dniach inkubacji w SBF.

Na fig. 10 przedstawiono (A) wyniki testu Alamar Blue 1, 3 i 7 dnia hodowli komórek MG-63 na badanych materiałach (B). Aktywność fosfatazy alkalicznej po 3 i 7 dniach hodowli komórek MG-63 na badanych materiałach. Istotność statystyczną ( $p < 0.05$ ) wykazano wykorzystując test Studenta. (A) % wskazuje istotność statystyczną względem wyniku dla KolChHA<sub>mod</sub> dzień 3, \$ wskazuje istotność statystyczną względem wyniku dla KolChHA<sub>mod</sub> dzień 7. (B) \* wskazuje istotność statystyczną względem wyniku dla kontroli dzień 3, \*\* wskazuje istotność statystyczną względem wyniku dla kontroli dzień 7, # wskazuje istotność statystyczną względem wyniku dla KolChHA<sub>mod</sub> C1 dzień 3. Jako kontrole zastosowano komórki hodowane na płycie hodowlanej.

Na fig. 11 przedstawiono (A) zestawienie mikrofotografii SEM obrazujących morfologię utrwalonych komórek MG-63 po 3 dniach hodowli na powierzchni badanych materiałów (B) wykres przedstawiający rozkład powierzchni komórek MG-63 po 3 dniach hodowli (oszacowany w oparciu o uzyskane mikrofotografie SEM).

Na fig. 12 przedstawiono wyniki testu Alamar Blue po 1, 3 i 7 dnia hodowli komórek J774A.1 na badanych materiałach. Istotność statystyczną ( $p < 0.05$ ) wykazano wykorzystując test Studenta. % wskazuje istotność statystyczną względem wyniku dla KolChHA<sub>mod</sub> dzień 1.

Na fig. 13 przedstawiono schemat tworzenia cząstek SiO<sub>2</sub>-Ap-ALN (SiO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> – cząstki krzemionkowe funkcjonalizowane grupami aminowymi; Ap – warstwa apatytu uformowana na powierzchni cząstek krzemionkowych po inkubacji w 1,5 M SBF; ALN – alendronian sodu).

Na fig. 14 przedstawiono schemat otrzymanych cząstek SiO<sub>2</sub>-Ap-ALN (SiO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> – cząstki krzemionkowe sfunkcjonalizowane grupami aminowym; Ap – warstwa apatytu; ALN – alendronian sodu). Uzyskany produkt (SiO<sub>2</sub>-Ap-ALN) zawieszono w zolu biopolimerowym (kolagenowo-chitozanowo-hialuronowym) i usieciowano genipiną otrzymując materiał hybrydowy przydatny jako materiał do wypełniania ubytków osteoporotycznych.

Na fig. 15 przedstawiono schemat tworzenia materiału hybrydowego.

Ponadto istota wynalazku została wyjaśniona w poniższych przykładach.

W przykładach 1,2 i 4 ujawniono kolejne etapy przykładowej realizacji sposobu według wynalazku, natomiast w przykładach 3 i 5 właściwości uzyskiwanych zgodnie z wynalazkiem materiałów.

#### **Przykład 1. Otrzymywanie submikronowych cząstek mineralnych SiO<sub>2</sub>-Ap.**

Kontrolowaną depozycję apatytu (Ap) na powierzchni cząstek krzemionkowych przeprowadzono w kontakcie ze sztucznym osoczem (1,5 SBF).

##### *Otrzymywanie sztucznego osocza*

W tym celu przygotowano 1000 ml 1,5 SBF. Do plastikowej zlewki o pojemności 1000 mL wprowadzono 700 mL wody dejonizowanej. Zlewkę umieszczono na mieszadle magnetycznym w łaźni wodnej o temperaturze  $36,5 \pm 1,5^\circ\text{C}$ . Odczynniki od 1 do 8 rozpuszczono według kolejności przedstawionej w Tabeli 1 (kolejny odczynnik dodawano po całkowitym rozpuszczeniu poprzedniego). Dodano wodę dejonizowaną do objętości 900 ml i ponownie ustawiono temperaturę roztworu na  $36,5 \pm 1,5^\circ\text{C}$ . Następnie przystąpiono do kontroli pH w tym celu umieszczono elektrodę pH-metru w roztworze. W kolejnym etapie rozpuszczano Tris w roztworze dodając małe jego porcje i cały czas mierząc pH. Kiedy pH wyniosło  $7,30 \pm 0,05$  sprawdzono temperaturę w celu jej utrzymania w granicach  $36,5 \pm 1,5^\circ\text{C}$ . Po sprawdzeniu temperatury dodano Tris, aby podnieść pH do 7,45. Kiedy pH podniosło się do  $7,45 \pm 0,01$ , zaprzestano rozpuszczania Tris i dodano 1M HCl w celu obniżenia pH do  $7,42 \pm 0,01$  uważając, aby pH nie spadło poniżej 7,40. Po obniżeniu pH do  $7,42 \pm 0,01$  rozpuszczono pozostały Tris nie przekraczając pH równego 7,45. Po rozpuszczeniu całej ilości Tris dostosowano temperaturę roztworu do  $36,5 \pm 0,2^\circ\text{C}$ . Ustawiono pH roztworu wkraplając 1M HCl do  $7,42 \pm 0,01$  w temperaturze  $36,5 \pm 0,2^\circ\text{C}$ . Ostatecznie pH ustawiono na 7,40 w temperaturze  $36,5^\circ\text{C}$ . Następnie roztwór przelano do plastikowej kolby płaskodennej, uzupełniono do objętości 1000 mL i przechowywano w lodówce.

Tabela 1. Odczynniki i ich ilości potrzebne do przygotowania 1000 ml 1,5 SBF

Lp	odczynnik	masa/objętość
1	NaCl	12,0525 g
2	NaHCO <sub>3</sub>	0,5325 g
3	KCl	0,3375 g
4	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 3H <sub>2</sub> O	0,3465 g
5	MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0,4665 g
6	1,0 M HCl	58,5 ml
7	CaCl <sub>2</sub>	0,438 g
8	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,108 g
9	Tris	9,117 g
10	1,0 M HCL	0-7,5 ml

#### Depozycja apatytu (Ap) na powierzchni cząstek krzemionkowych funkcjonalizowanych grupami aminowymi

Sfunkcjonalizowane grupami aminowymi cząstki krzemionkowe otrzymano metodą zol-żel według procedury opisanej w [J. Lewandowska-Łańcucka i współpracownicy, *Int. J. Biol. Macromol.* 136 (2019) 1196–1208] w następujący sposób: do mieszaniny składającej się z etanolu (5,1 ml) i wody (5 ml) wprowadzono kolejno 1,0 ml tetraetoksylanu (TEOS) i 0,1 ml aminopropylotrietoksylanu (APTES). Uzyskaną mieszaninę pozostawiono na mieszadle magnetycznym i mieszano przez 30 min w temperaturze pokojowej. Otrzymany w ten sposób materiał poddano procesowi wirowania a następnie oczyszczono przepłukując etanolem i wirując. Cykl płukania w etanolu/wirowania powtórzono czterokrotnie. Materiał suszono w piecu próżniowym w temperaturze 60°C. Po oczyszczeniu uzyskano biały proszek (SiO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>). W kolejnym etapie w fiolkach o pojemności 50 ml umieszczono po 20 mg cząstek SiO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> i dodano po 20 ml roztworu 1,5 M SBF. Próbkę poddano sonifikacji ciągłej przez 10–15 minut. Następnie fiołki zabezpieczono parafilmem i umieszczono w inkubatorze o temperaturze ustawionej na 37°C i wytrząsano (50 rpm). Tak przygotowane materiały inkubowano przez okres 10 dni, wymieniając roztwór SBF na świeży co 2–3 dni. W tym celu zawiesinę cząstek w SBF odwirowywano z prędkością 10 000 rpm przez 5 minut, zbierano roztwór z nad osadu, wprowadzano świeżą porcję buforu, wortexowano i ponownie inkubowano. Po 10-dniowej inkubacji w sztucznym osoczu materiał poddano procesowi wirowania, a następnie oczyszczono przepłukując wodą i wirując (procedurę powtórzono trzykrotnie), po czym wysuszono w temperaturze pokojowej. Otrzymano materiał (SiO<sub>2</sub>-Ap) w postaci białego proszku.

#### Przykład 2. Otrzymywanie submikronowych bioaktywnych cząstek mineralnych będących nośnikiem alendronianu (SiO<sub>2</sub>-Ap-ALN)

Do otrzymanego w wyniku kontrolowanej depozycji w warunkach SBF układu SiO<sub>2</sub>-Ap przyłączono alendronian sodu. W tym celu 20 mg materiału SiO<sub>2</sub>-Ap zawieszono w 3 ml zasady sodowej (5 mM) i poddano 5 min sonifikacji. Następnie rozpuszczono 4 mg alendronianu sodu (ALN) w 2 ml roztworu NaOH (5 mM). Umieszczono elektrodę pH-metru w roztworze i dodając 20 mM roztwór NaOH ustalono jego pH do wartości 10. Następnie tak sporządzony roztwór alendronianu sodu dodano do zawiesiny SiO<sub>2</sub>-Ap. Próbkę umieszczono na mieszadle magnetycznym z funkcją grzania (500 rpm, 37°C) na 3 dni. Otrzymany nośnik z przyłączonym alendronianem (SiO<sub>2</sub>-Ap-ALN) oczyszczono w drodze dializy do wody (24 godziny, temperatura pokojowa) i poddano liofilizacji otrzymując biały proszek.

#### Przykład 3. Właściwości fizykochemiczne submikronowych cząstek mineralnych (SiO<sub>2</sub>-Ap) oraz submikronowych bioaktywnych cząstek mineralnych będących nośnikiem alendronianu (SiO<sub>2</sub>-Ap-ALN).

Otrzymane w przykładzie 1 i 2 cząstki zostały szczegółowo scharakteryzowane przy użyciu szeregu technik fizykochemicznych – określono morfologię (SEM), jak również skład chemiczny (EDS, XRD, XPS, TG). Badania SEM i EDS (Figura 1) wykazały obecność fazy mineralnej o morfologii i składzie (stosunek Ca/P = 1,2) charakterystycznym dla struktur apatytowych. Wyniki analizy dyfraktometrii rentgenowskiej (XRD) (Figura 2) jednoznacznie potwierdziły obecność fazy krystalicznej w otrzymanym materiale. Ponadto sygnały pojawiające się na dyfraktogramach przy  $2\theta$  równym: 25,9; 32,0; 39,4; 42,2; 46,8; 53,2 pozostają w zgodności z wartościami literaturowymi sygnałów przypisywanym hydroksyapatytowi.

Wyniki badań potwierdziły skuteczność zaproponowanej metodologii otrzymywania bioaktywnego materiału hybrydowego (SiO<sub>2</sub>-Ap) w łagodnych warunkach symulujących proces biomineralizacji. Ponadto stabilność otrzymanego materiału bazuje na oddziaływaniach wynikających z silnego powinowactwa ALN do apatyty. Zdeprotonowane atomy tlenu grup fosforanowych w ALN oddziałują elektrostatycznie z jonami wapnia obecnymi na powierzchni apatyty. Powstały w ten sposób koniugat Ap-ALN nie wpływa na strukturę krystaliczną apatyty.

Otrzymane submikronowe cząstki SiO<sub>2</sub>-Ap-ALN jak opisano w przykładzie 2 zostały scharakteryzowane za pomocą szeregu komplementarnych metod fizykochemicznych (SEM, XPS, XRD, TG) (Rysunki 1–4). Analizy XPS (Figura 3) i TG (Figura 4) potwierdziły efektywność przyłączania alendronianu do bioaktywnego nośnika SiO<sub>2</sub>-Ap. Wykazano zmiany w pierwiastkowym składzie powierzchni otrzymanego materiału SiO<sub>2</sub>-Ap-ALN (analiza XPS, Tabela 2), a także różnice w profilu termogravimetrycznym (dla materiału z przyłączonym lekiem zaobserwowano ubytek masy większy o 3,3% w stosunku do samego nośnika SiO<sub>2</sub>-Ap). Otrzymany dyfraktogram dla materiału z przyłączonym lekiem (Figura 2) nie wykazał istotnych różnic w porównaniu do dyfraktogramu uzyskanego dla nośnika, co potwierdza, że proces koniugacji ALN do SiO<sub>2</sub>-Ap nie wpływa na jego strukturę krystaliczną.

Tabela 2. Wyniki analizy XPS

<b>Skład pierwiastkowy (%) badanych materiałów</b>	<b><i>O 1s</i></b>	<b><i>Si 2p</i></b>	<b><i>C 1s</i></b>	<b><i>N 1s</i></b>	<b><i>Ca 2p</i></b>	<b><i>P 2p</i></b>
SiO <sub>2</sub> -Ap	62	3	4	1	26	4
SiO <sub>2</sub> -Ap-ALN	60	3	8	2	23	4

#### **Przykład 4. Otrzymywanie sieciowanych chemicznie hydrożelowych materiałów hybrydowych z rozproszoną bioaktywną fazą mineralną będącą nośnikiem alendronianu (SiO<sub>2</sub>-Ap-ALN).**

Otrzymane w przykładzie 2 submikronowe cząstki SiO<sub>2</sub>-Ap-ALN zawieszono w zolu biopolimerowym składającym się z kolagenu, chitozanu oraz sfunkcjonalizowanego lizyną kwasu hialuronowego i usieciowano genipiną otrzymując materiał hybrydowy. W tym celu przygotowano trzy naważki submikronowych bioaktywnych cząstek mineralnych będących nośnikami alendronianu sodu (SiO<sub>2</sub>-Ap-ALN), odpowiednio 5 mg, 2,5 mg, 1 mg i każdą z nich zawieszono w 0,1 ml wody. Następnie dodawano odpowiednie objętości roztworów biopolimerów: 76  $\mu$ l roztworu chitozanu (Ch) (roztwór 1% wag. w 1% kwasie octowym), 540  $\mu$ l roztworu kolagenu (Kol) (roztwór w kwasie solnym o stężeniu 3,5 mg/ml – roztwór dostarczony przez producenta BD Biosciences), 114  $\mu$ l roztworu zmodyfikowanego lizyną kwasu hialuronowego (HA<sub>mod</sub>) (roztwór 1% wag. w 10x buforze fosforanowym (PBS); o składzie: NaCl (c=1,37 M), KCl (c=27 mM), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (c=43 mM), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (c=14 mM), pH ustawione do wartości 7,4 stężonym (c=35%) roztworem kwasu solnego HCl). Otrzymany zol poddano energicznemu wytrząsaniu a następnie dodano 170  $\mu$ l roztworu genipiny (roztwór o stężeniu 20 mM, sporządzony w 10xPBS) i inkubowano w temperaturze 37°C aż do całkowitego usieciowania. Otrzymany materiał ma postać hydrożelu. Stosunek wagowy biopolimerów w otrzymanym materiale wyniósł: Kol:Ch:HA<sub>mod</sub> – 50:20:30. Testowano trzy stężenia cząstek SiO<sub>2</sub>-Ap-ALN zawieszonych w zolu. Stosując trzy różne stężenia zawiesin/dyspersji bioaktywnych cząstek mineralnych (C1 = 5 mg/ml, C2 = 2,5 mg/ml, C3 = 1 mg/ml) otrzymano trzy rodzaje materiałów hybrydowych: KolChHA<sub>mod</sub> C1, KolChHA<sub>mod</sub> C2 i KolChHA<sub>mod</sub> C3.

Jako materiał kontrolny otrzymano hydrożel o analogicznym składzie biopolimerów, ale bez dodatku cząstek SiO<sub>2</sub>-Ap-ALN (dodawano 0,1 ml wody) (KolChHA<sub>mod</sub>).

Procedura otrzymywania zmodyfikowanego lizyną kwasu hialuronowego została przedstawiona w publikacji (Gilarska, A et al., (2020), *Int. J. Biol. Macromol.*, 155, 938–950).

W pierwszym etapie przygotowano bufor MES (50 mM). W tym celu rozpuszczono 0,97 g kwasu 2-(N-morfolino)etanosulfonowego (MES) w 100 ml wody dejonizowanej i ustalono wartość pH do 4 wykorzystując 0,1M roztwór NaOH. Całość przefiltrowano przez filtr strzykawkowy. 500 mg kwasu hialuronowego (HA) rozpuszczono w 20 ml buforu MES (50 mM, pH=4) a następnie dodawano kolejno 0,73 g lizyny, 360 mg EDC (chlorowodorek N-(3-dimetyloaminopropyl)-N'-etylokarbodiimidu) oraz 220 mg NHS (N-hydroksysukcynimid) (każdy z tych odczynników został najpierw rozpuszczony w 5 ml buforu MES ze względu na żelową konsystencję mieszaniny). Całość mieszano przez 24 h na mieszadle magnetycznym w temperaturze pokojowej, a następnie poddano całonocnej dializie do 0,1M wodnego roztworu Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (trwającej około 12 h), a później 8-dniowej dializie względem wody. W kolejnym etapie mieszaninę poddano zagęszczeniu na wyparce (do objętości około 50 ml) i trzydniowej liofilizacji. Stopień podstawienia lizyną otrzymanego w ten sposób produktu (HA<sub>mod</sub>) określono za pomocą analizy elementarnej i spektroskopii <sup>1</sup>H NMR, wyniósł on około 25%.

#### **Przykład 5. Charakterystyka sieciowanych chemicznie hydrożelowych materiałów hybrydowych z rozproszoną bioaktywną fazą mineralną będącą nośnikiem alendronianu (SiO<sub>2</sub>-Ap-ALN).**

Otrzymane hydrożelowe materiały hybrydowe, odpowiednio KolChHA<sub>mod</sub> C1, KolChHA<sub>mod</sub> C2, KolChHA<sub>mod</sub> C3 poddano charakterystyce fizykochemicznej. Określono morfologię, liofilowość, stopień pęcznienia, a także przeprowadzono badania reologiczne.

Wykorzystując technikę SEM scharakteryzowano mikrostrukturę otrzymanych materiałów hybrydowych, a także materiał kontrolny KolChHA<sub>mod</sub>. Analizując otrzymane mikrografie (Figura 5) można zauważyć obecność submikronowych cząstek SiO<sub>2</sub>-Ap-ALN w każdym z otrzymanych układów hybrydowych. Cząstki występują zarówno jako pojedyncze obiekty jak również w postaci agregatów częściowo pokrytych utworzoną siecią biopolimerową.

W celu potwierdzenia możliwości wykorzystania opracowanych układów jako materiałów wstrzykiwalnych przeprowadzono pomiary reologiczne w trybie oscylacyjnym. Wartości modułu elastyczności (G') zmierzone po 10, 35 i 70 minutach eksperymentu przedstawione na rysunku 6 (eksperyment prowadzono w temperaturze 37°C, po dodaniu do zolu roztworu genipiny, jak opisano powyżej). Poprzez śledzenie w czasie zmian modułu elastyczności (G') możliwym było zweryfikowanie przejścia od stanu zolu do żelu i tym samym wykazanie potencjału wstrzykiwanego otrzymanych materiałów. Na początku procesu żelowania (po 10 minutach od sporządzenia mieszaniny) wartości modułu elastyczności dla wszystkich materiałów są na niskim poziomie (w zakresie 10–14 Pa) potwierdzając ich lekko-sprężysty stan i postać wstrzykiwaną. Wartości G' znacznie wzrastają po 35 minutach osiągając wartość maksymalną w ciągu 70 minut od rozpoczęcia procesu sieciowania (tworzenie żelu). Tym samym porównanie wartości G' na początku i na końcu eksperymentu reologicznego dowodzi, że opracowane materiały mogą pełnić funkcję materiałów wstrzykiwalnych.

Ponadto otrzymane wyniki wykazały, iż wprowadzenie bioaktywnego nośnika do matrycy biopolimerowej w istotny sposób poprawia właściwości mechaniczne uzyskanych hybryd. Wykazano różnicę istotną statystycznie dla wartości G' po 70 min żelowania dla wszystkich materiałów hybrydowych porównując z modułem elastyczności (G' po 70 min) otrzymanym dla materiału kontrolnego. Zaobserwowano również wzrost wartości modułu elastyczności (G') z wartości 900 Pa dla matrycy polimerowej do 2500 Pa dla układu z najwyższą zawartością nośnika (KolChHA<sub>mod</sub> C1) po 70 min procesu żelowania (figura 6) (istotność statystyczna względem wszystkich materiałów).

Powyższe wyniki jednoznacznie dowodzą, że materiały hybrydowe przy zachowaniu wstrzykiwalności typowej dla samej matrycy polimerowej, charakteryzują się znacznie wyższymi (istotność statystyczna) wartościami modułu elastyczności po zakończonym procesie żelowania (po 70 min).

Wyznaczono również stopień pęcznienia (SP) dla otrzymanych materiałów hybrydowych. Eksperyment prowadzono w warunkach fizjologicznych (pH = 7,4; temp = 37°C), wyniki przedstawiono na rysunku 7. Analizując otrzymane wyniki można zauważyć, iż wszystkie badane materiały wykazują zdolność do pęcznienia (SP w zakresie 6700–11700%), przy czym obecność cząstek SiO<sub>2</sub>-Ap-ALN ma istotny wpływ na właściwości pęcznienia układów hybrydowych. Przeprowadzone badania pęcznienia

wykazały, iż wraz ze wzrostem stężenia cząstek SiO<sub>2</sub>-Ap-ALN dochodzi do obniżenia stopnia pęcznienia (figura 7). Wynik ten wskazuje zatem, iż otrzymane cząstki wpływają na sztywność struktury hydrożelu, co potwierdziły również badania reologiczne.

Zbadano także liofilowość powierzchni otrzymanych materiałów. Wyniki uzyskane w oparciu o pomiary kątów zwilżania zestawiono w tabeli 3. Analizując otrzymane dane można zauważyć, iż wprowadzenie do matrycy biopolimerowej cząstek SiO<sub>2</sub>-Ap-ALN powoduje, że powierzchnia materiałów hybrydowych staje się bardziej hydrofilowa, o czym świadczą niższe wartości kątów zwilżania w porównaniu z materiałem kontrolnym (KolChHA<sub>mod</sub>). Zaobserwowano, iż materiał o najwyższym stężeniu cząstek (KolChHA<sub>mod</sub> C1) charakteryzuje się najbardziej hydrofilową powierzchnią (66°). Poprawę hydrofilowości można wyjaśnić obecnością na powierzchni materiałów hybrydowych cząstek SiO<sub>2</sub>-Ap-ALN (mikrofotografie SEM zestawione na rysunku 5) zawierających eksponowane powierzchniowo hydrofilowe grupy aminowe pochodzące od przyłączonego alendronianu (co potwierdziła analiza XPS).

Tabela 3. Wartości kątów zwilżania dla otrzymanych materiałów

Typ materiału	Wartości kąta zwilżania [°]
KolChHA <sub>mod</sub>	77,7 ± 1,3
KolChHA <sub>mod</sub> C1	65,8 ± 0,6
KolChHA <sub>mod</sub> C2	70,9 ± 1,3
KolChHA <sub>mod</sub> C3	67,1 ± 0,8

### Degradacja enzymatyczna

Otrzymane materiały zostały również poddane procesowi degradacji enzymatycznej, w obecności enzymu – kolagenazy. Degradację enzymatyczną badano przez 144 godziny. Na rysunku 8 przedstawiono zmiany masy materiałów podczas inkubacji w roztworze kolagenazy. Zaobserwowano znaczące spowolnienie procesu degradacji enzymatycznej dla wszystkich materiałów z wprowadzonym nośnikiem. Po 4 godzinach degradacji enzymatycznej odnotowano nieznaczny ubytek masy dla materiałów hybrydowych (około 3–7%) i 12% dla materiału KolChHA<sub>mod</sub>. W kolejnych punktach pomiarowych zaobserwowano istotne zmiany w masie pozostałej dla materiału kontrolnego (31% po 144 h) podczas gdy ubytek masy dla materiałów hybrydowych następował znacznie wolniej. Po 144 h degradacji dla materiałów hybrydowych zaobserwowano ubytki masy na poziomie około 44–52%. Analizując utratę masy wszystkich badanych materiałów w danym momencie trwania eksperymentu można wskazać tendencję, iż ze wzrostem zawartości cząstek SiO<sub>2</sub>-Ap-ALN zmniejsza się szybkość procesu degradacji. Wyniki te pozostają w zgodności z rezultatami eksperymentu reologicznego, który potwierdził poprawę właściwości mechanicznych materiałów hybrydowych wraz ze wzrastającym stężeniem cząstek SiO<sub>2</sub>-Ap-ALN obecnych w układzie.

### Właściwości bioaktywne

W celu wykazania, iż otrzymane materiały hybrydowe dzięki obecności cząstek krzemionkowo-apatytowych będą sprzyjały biointegracji materiału z kością i tym samym wspomagały proces mineralizacji kości zaburzony w procesie osteoporozy zbadano ich właściwości bioaktywne. Przeprowadzono eksperyment biomineralizacji *in vitro* w warunkach symulowanego sztucznego osocza (z ang. Simulated Body Fluid, SBF). Dane literaturowe pokazują, iż materiały wykazujące zdolność wytwarzania na ich powierzchni warstwy apatytu w warunkach SBF będą również ulegać biomineralizacji w żywym organizmie zapewniając tym samym efektywną integrację rusztowania z naturalną kością. Eksperyment biomineralizacji w modelowych warunkach obejmował 5-dniową inkubację materiałów w SBF w 37°C. Następnie materiały zostały poddane badaniom przy użyciu technik SEM i EDS. Na rysunku 9 przedstawiono uzyskane mikrofotografie SEM i wartości stosunku wapnia do fosforu (Ca/P) wyznaczone techniką EDS dla fazy mineralnej utworzonej na powierzchni materiałów po 3 dniach inkubacji w SBF.

Dokładna analiza wyników (SEM/EDS) pozwoliła stwierdzić, iż tworzenie fazy mineralnej w formie struktury kwiatowej, w której stosunek Ca/P jest charakterystyczny dla apatytu zaobserwowano już po 3 dniach w przypadku materiałów hybrydowych KolChHA<sub>mod</sub> C1 i KolChHA<sub>mod</sub> C2. Ponadto ze względu na fakt, iż matryca hydrożelowa wg omawianego wynalazku składa się w 30% wag z modyfikowanego kwasu hialuronowego, zaobserwowano dodatkowe wsparcie biomineralizacji pochodzące od kwasu hialuronowego (tworzenie fazy mineralnej w postaci warstw na powierzchni KolChHA<sub>mod</sub> i KolChHA<sub>mod</sub> C3). W przypadku poprzedniego wynalazku matryca polimerowa z 10% wag zawartości niemodyfikowanego kwasu hialuronowego nie wykazywała tej właściwości. Warto podkreślić, iż materiał zaprezentowany w ramach poprzedniego zgłoszenia był poddany analogicznemu eksperymentowi (badanie bioaktywności w SBF); w jego przypadku proces biomineralizacji nastąpił dopiero po 7 dniach.

Otrzymane wyniki jasno wskazują zatem, iż omawiane materiały hybrydowe z cząstkami SiO<sub>2</sub>-Ap-ALN o stężeniu w zakresie 1–5 mg/ml charakteryzują się właściwościami bioaktywnymi zapewniającymi znaczne przyspieszenie procesu biomineralizacji, a mianowicie do 3 dni, a co za tym idzie efektywniejszą biointegrację materiału z naturalną kością.

#### **Badanie właściwości biologicznych materiału hybrydowego**

Otrzymane hydrożelowe materiały hybrydowe poddano również wstępnym badaniom biologicznym *in vitro* z zastosowaniem komórek osteoblastycznych MG-63. Określono proliferację, aktywność fosfatazy alkalicznej, morfologię i adhezję komórek hodowanych na powierzchni badanych materiałów. Przeprowadzone badania biologiczne *in vitro* wykazały, iż wprowadzenie cząstek SiO<sub>2</sub>-Ap-ALN w testowanych stężeniach C1, C2 i C3 do matrycy hydrożelowej nie obniża biokompatybilności materiałów hybrydowych w porównaniu do materiału kontrolnego KolChHA<sub>mod</sub>. Wyniki testów na żywotność komórek (wykorzystano test Alamar Blue) przeprowadzone po 1, 3 i 7 dnia hodowli (figura 10 A) wykazały, iż wszystkie otrzymane materiały hybrydowe wspierają zdolność do proliferacji komórek MG-63. Zaobserwowano porównywalny (brak różnic istotnych statystycznie) wzrost liczby komórek w kolejnych dniach eksperymentu (1, 3, 7) prowadzonych z użyciem materiałów hybrydowych z cząstkami SiO<sub>2</sub>-Ap-ALN o stężeniach C1 i C2 względem wyników dla kontroli (KolChHA<sub>mod</sub>).

Zbadano również aktywność fosfatazy alkalicznej (ALP) będącej markerem potwierdzającym fenotyp i mineralizację osteoblastów w 3 i 7 dniu hodowli (figura 10 B). W przypadku wszystkich analizowanych materiałów zaobserwowano wzrost aktywności po 7 dniach eksperymentu. Poziom ALP zarówno w trzecim jak i w siódmym dniu hodowli był istotnie wyższy w porównaniu do aktywności ALP komórek na płycie hodowlanej. Analizując wpływ stężenia cząstek SiO<sub>2</sub>-Ap-ALN na aktywność ALP zaobserwowano różnice istotne statystycznie tylko dla materiału KolChHA<sub>mod</sub> C3 w 3 dniu eksperymentu (względem KolChHA<sub>mod</sub> C1 3 dzień). W 7 dniu hodowli nie wykazano istotnych różnic w aktywności ALP pomiędzy otrzymanymi układami hybrydowymi.

Dokonano również analizy morfologii i adhezji komórek MG-63 po 3 dniach hodowli na powierzchni materiałów. Komórki utrwalono i obrazowano przy użyciu techniki SEM. Na rysunku 11 zestawiono mikrofotografie SEM przedstawiające morfologie utrwalonych komórek (figura 11 A) a także wykres z rozkładem powierzchni komórek MG-63 po 3 dniach hodowli (oszacowany w oparciu o uzyskane mikrofotografie SEM) (figura 11 B). Analizując otrzymane mikrofotografie (figura 11 A) można stwierdzić, iż komórki przylegają dobrze zarówno do powierzchni materiałów hybrydowych jak i hydrożelu kontrolnego (KolChHA<sub>mod</sub>). Oszacowany rozkład powierzchni komórek (figura 11 B) wskazuje, iż komórki hodowane na materiale kontrolnym KolChHA<sub>mod</sub> i w układzie hybrydowym o najniższym stężeniu cząstek SiO<sub>2</sub>-Ap-ALN (C3) zajmują porównywalną powierzchnię i charakteryzują się zbliżoną morfologią. Morfologia komórek hodowanych na materiałach hybrydowych z cząstkami o stężeniach C1 i C2 jest bardziej zróżnicowana. Zaobserwowano populację zajmujących większą powierzchnie rozplaszczonych komórek o wydłużonych kształtach. Dane te dowodzą zatem, iż obecność cząstek SiO<sub>2</sub>-Ap-ALN wpływa korzystnie na adhezję komórek.

#### **Badanie właściwości terapeutycznych**

W celu wykazania zdolności opracowanego materiału hybrydowego do zahamowania resorpcji kości przeprowadzono wstępne badania biologiczne *in vitro* z wykorzystaniem modelowej linii osteoklastów (komórki J774A.1). Linia ta jest linią referencyjną stosowaną w analizach *in vitro* dotyczących metabolizmu związków z grupy bisfosfonianów.

Wyniki testów na żywotność komórek (wykorzystano test Alamar Blue) przeprowadzone po 1, 3 i 7 dniach hodowli przedstawiono na rysunku 12. Wstępne badania biologiczne wykazały, iż proliferacja komórek osteoklastycznych hodowanych na materiałach hybrydowych zostaje zahamowana po 7

dniach eksperymentu. Zaobserwowano tendencję, iż efekt ten rośnie wraz ze wzrostem cząstek SiO<sub>2</sub>-Ap-ALN obecnych w matrycy hydrożelowej i jest najbardziej widoczny dla układu KolChHA<sub>mod</sub> C1. Tym samym wykazano, iż testowane materiały hybrydowe o zaproponowanej zawartości cząstek SiO<sub>2</sub>-Ap-ALN (C1, C2 i C3) posiadają potencjał terapeutyczny przejawiający się upośledzeniem aktywności modelowych komórek osteoklastycznych. Biorąc zatem pod uwagę postać opracowanej formułacji i możliwość jej miejscowego podanie poprzez wstrzyknięcie do ubytku możliwym będzie zapewnienie lokalnego działania leku minimalizując tym samym ogólnoustrojowe skutki uboczne stosowania alendronianu. Materiał zaprezentowany w ramach poprzedniego zgłoszenia nie posiadał właściwości terapeutycznych.

W oparciu o przeprowadzone badania można wskazać na następujące nieoczekiwane zalety otrzymanego materiału hybrydowego:

- potencjał terapeutyczny – przeprowadzono wstępne badania biologiczne *in vitro* z wykorzystaniem linii osteoklastów (komórki J774A.1), które wykazały, iż materiały hybrydowe o zaproponowanym składzie i zawartości alendronianu posiadają potencjał terapeutyczny przejawiający się upośledzeniem aktywności modelowych komórek osteoklastycznych,
- poprawa bioaktywności – zaobserwowano przyspieszoną biomineralizację hydrożelowego materiału. Dokładna analiza wyników (SEM/EDS) pozwoliła stwierdzić, iż w przypadku wyższych zawartości SiO<sub>2</sub>-Ap-ALN (C1, C2) już po 3 dniach inkubacji materiału w warunkach symulujących sztuczne osocze (SBF) dochodzi do tworzenia nowej fazy mineralnej zapewniającej szybszą biointegrację materiału z naturalną kością,
- wstrzykiwalność materiałów hybrydowych charakteryzujących się bardzo dobrymi właściwościami mechanicznymi. Biorąc zatem pod uwagę postać opracowanej formułacji i możliwość jej miejscowego podania poprzez wstrzyknięcie do ubytku możliwym będzie zapewnienie lokalnego działania alendronianu minimalizując tym samym jego ogólnoustrojowe skutki uboczne związane z podaniem doustnym lub dożylnym,
- biokompatybilność – przeprowadzone testy biologiczne *in vitro* wykazały, iż obecność cząstek SiO<sub>2</sub>-Ap-ALN nie obniża biokompatybilności materiałów hybrydowych (w porównaniu do materiału kontrolnego KolChHA<sub>mod</sub>), a także ich zdolności do wspierania adhezji, proliferacji, a także utrzymania fenotypu komórek osteoblastycznych (MG-63).

## Zastrzeżenia patentowe

1. Wielofunkcyjny, hydrożelowy materiał hybrydowy, **znamienny tym**, że zawiera:
  - a) matrycę biopolimerową zawierającą: kolagen, chitozan, kwas hialuronowy modyfikowany lizyną,
  - b) sfunkcjonalizowane grupami aminowymi cząstki krzemionkowo-apatytowe,
  - c) substancję czynną w postaci alendronianu przyłączonego do cząstek krzemionkowo-apatytowych,
  - d) substancję sieciującą,przy czym matryca biopolimerowa zawiera: kolagen, chitozan, kwas hialuronowy, korzystnie modyfikowany, w stosunku wagowym wynoszącym odpowiednio 5:2:3. natomiast substancją sieciującą jest genipina.
2. Sposób wytwarzania wielofunkcyjnego, hydrożelowego materiału hybrydowego, **znamienny tym**, że obejmuje następujące etapy:
  - a) cząstki krzemionkowe funkcjonalizuje się grupami aminowymi metodą zol-żel, przy czym do mieszaniny reakcyjnej składającej się z etanolu i wody wprowadza się tetraetoksylan i aminopropylotrietoksylan i miesza się przez 30 minut w temperaturze pokojowej, a otrzymany w reakcji materiał oddziela się, a następnie oczyszcza przepłukując etanolem,
  - b) cząstki otrzymane w etapie a) zawiesza się w sztucznym osoczu o stężeniu 1,5M, otrzymując po 10 dniach inkubacji cząstki krzemionkowe pokryte apatytową fazą mineralną,
  - c) do cząstek otrzymanych w etapie b) przyłącza się w warunkach zasadowych alendronian sodu,
  - d) do wodnej zawiesiny cząstek z etapu c) dodaje się roztwór kolagenu, chitozanu i modyfikowanego lizyną kwasu hialuronowego
  - e) mieszaninę otrzymaną w etapie d) poddaje się reakcji sieciowania genipiną.

3. Sposób według zastrz. 2, **znamienny tym**, że prowadzi się go metodą zol-żel.
4. Wielofunkcyjny, hydrożelowy materiał hybrydowy określony w zastrz. 1 lub otrzymany sposobem określonym w zastrz. 2 do stosowania w leczeniu lub profilaktyce uszkodzeń tkanki kostnej, zwłaszcza będących efektem osteoporozy.

### Rysunki

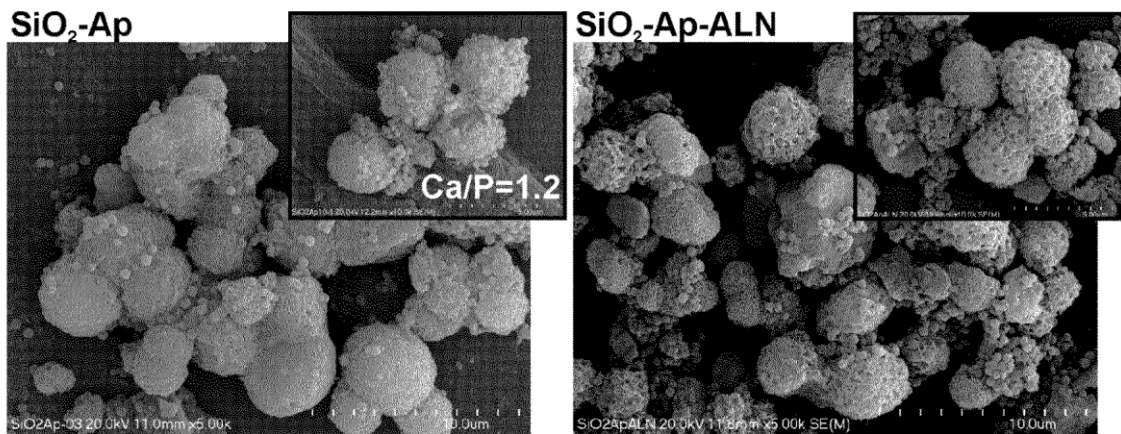


Fig. 1

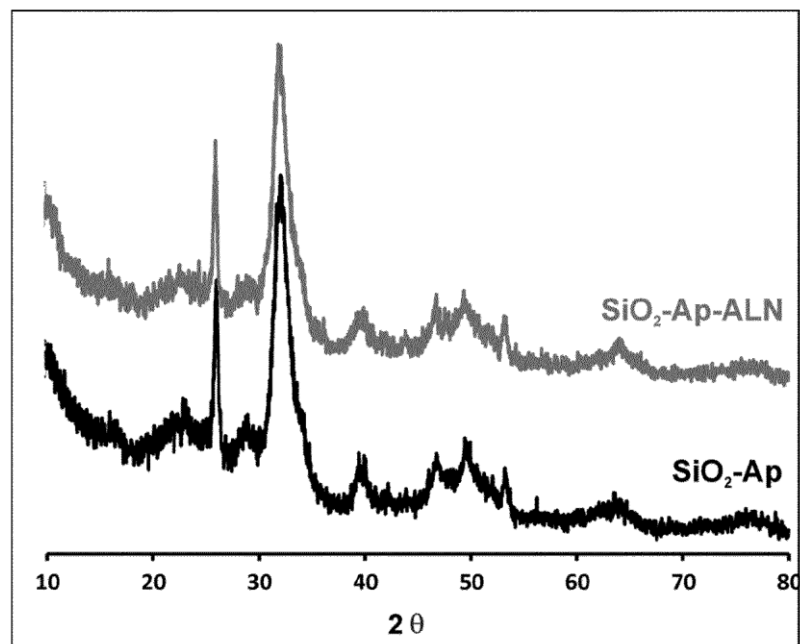


Fig. 2

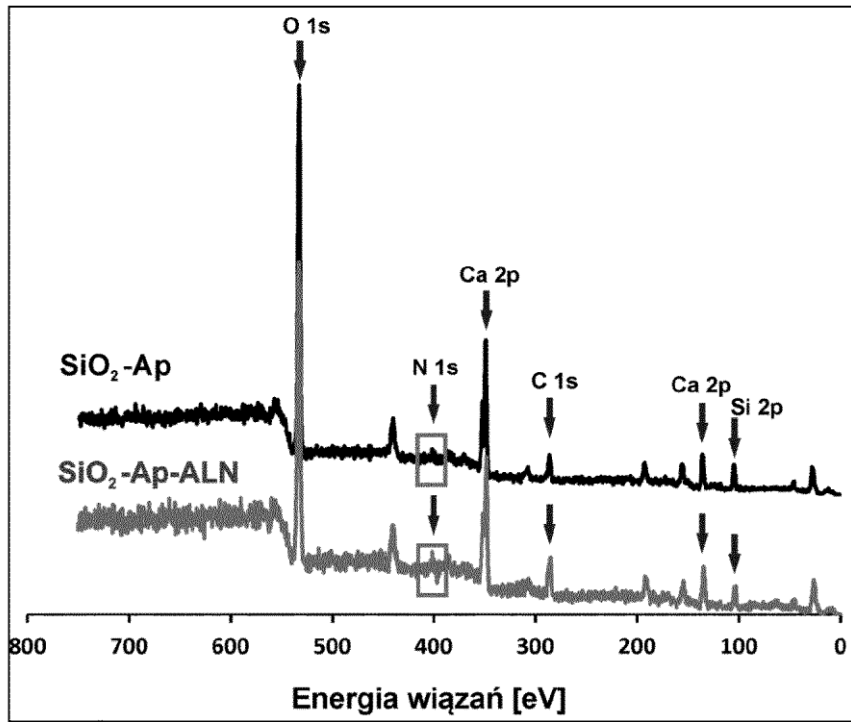


Fig. 3

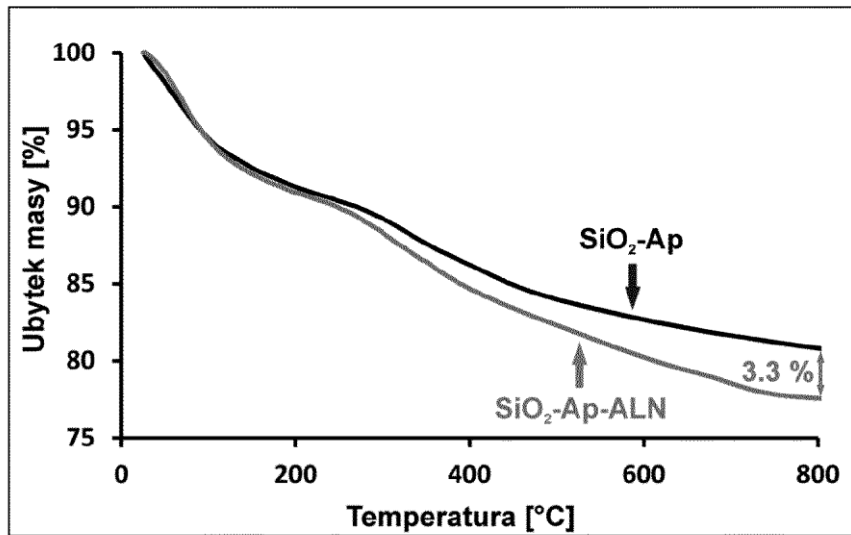


Fig. 4

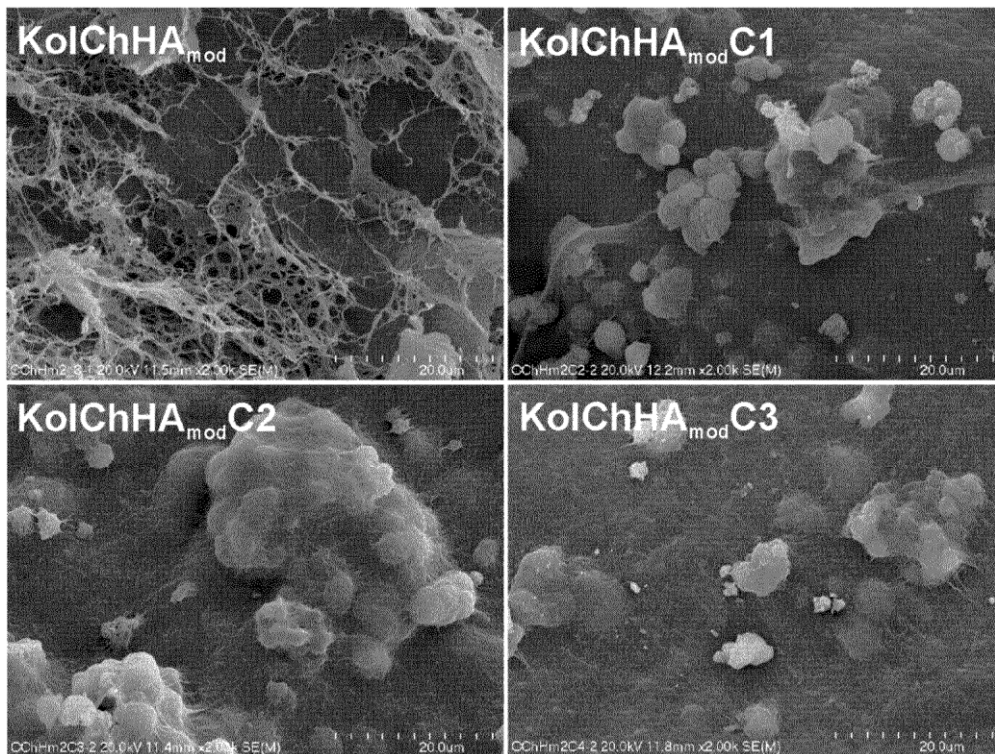


Fig. 5

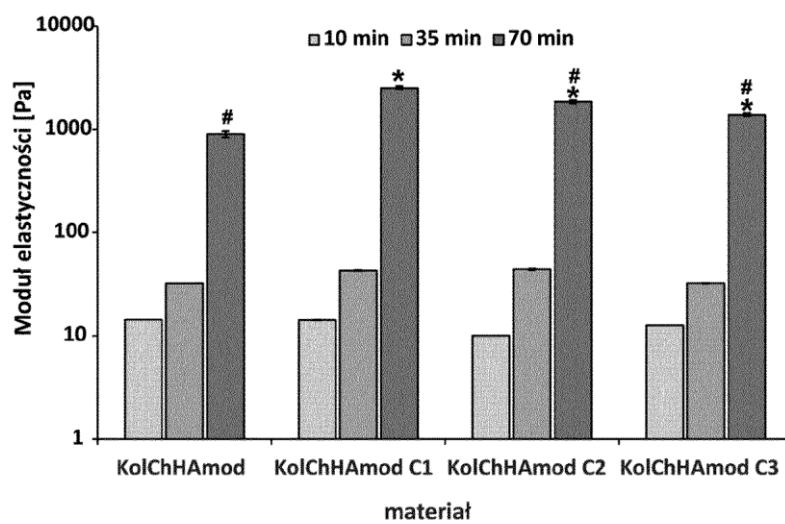


Fig. 6

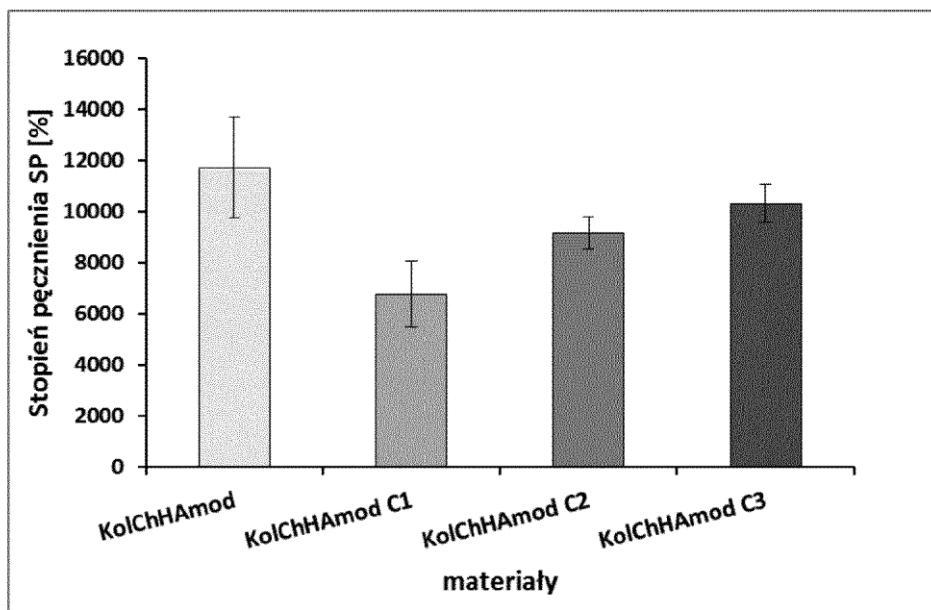


Fig. 7

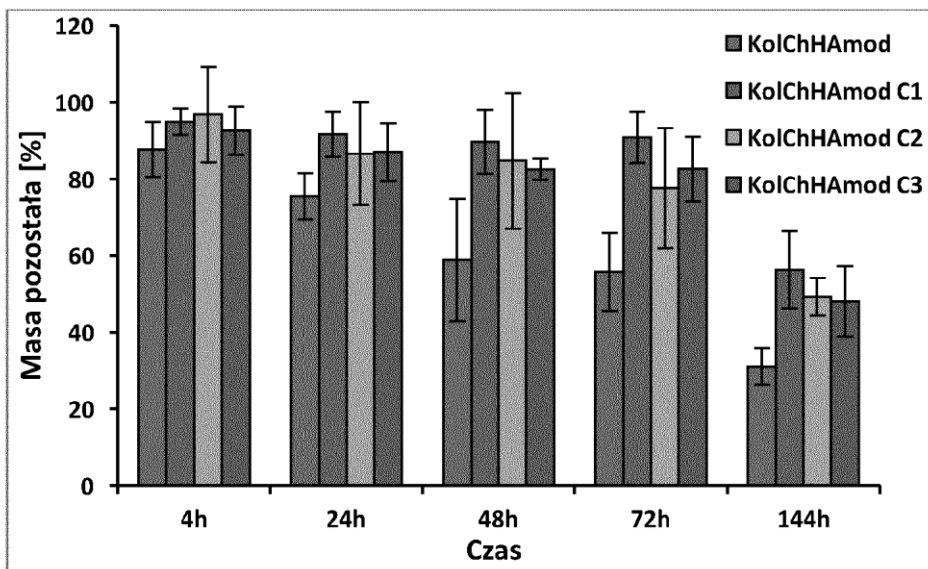


Fig. 8

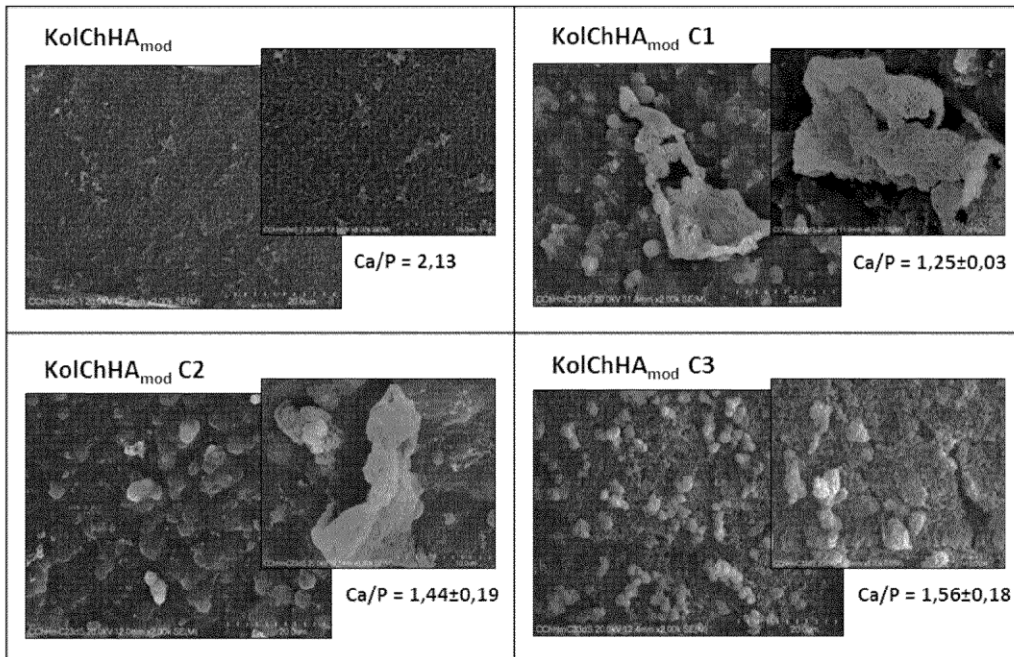


Fig. 9

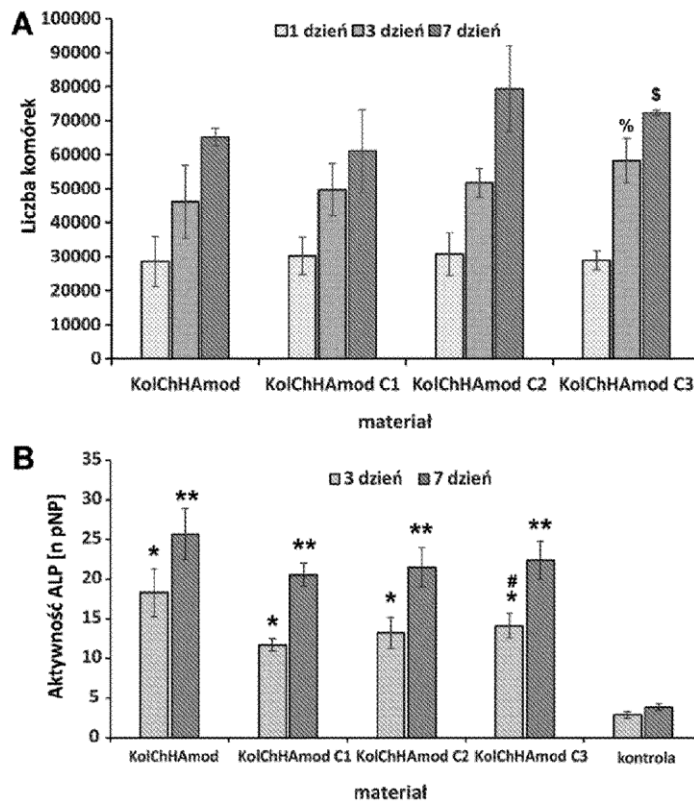


Fig. 10

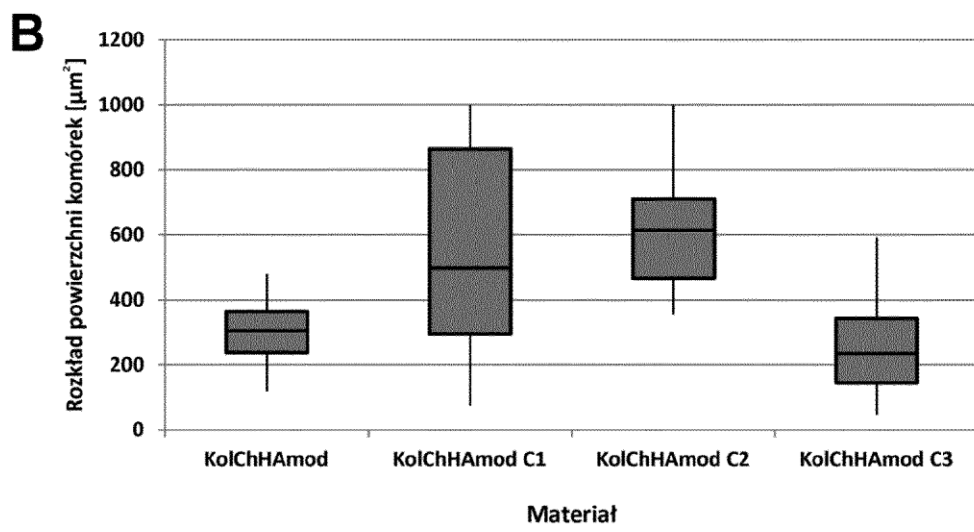
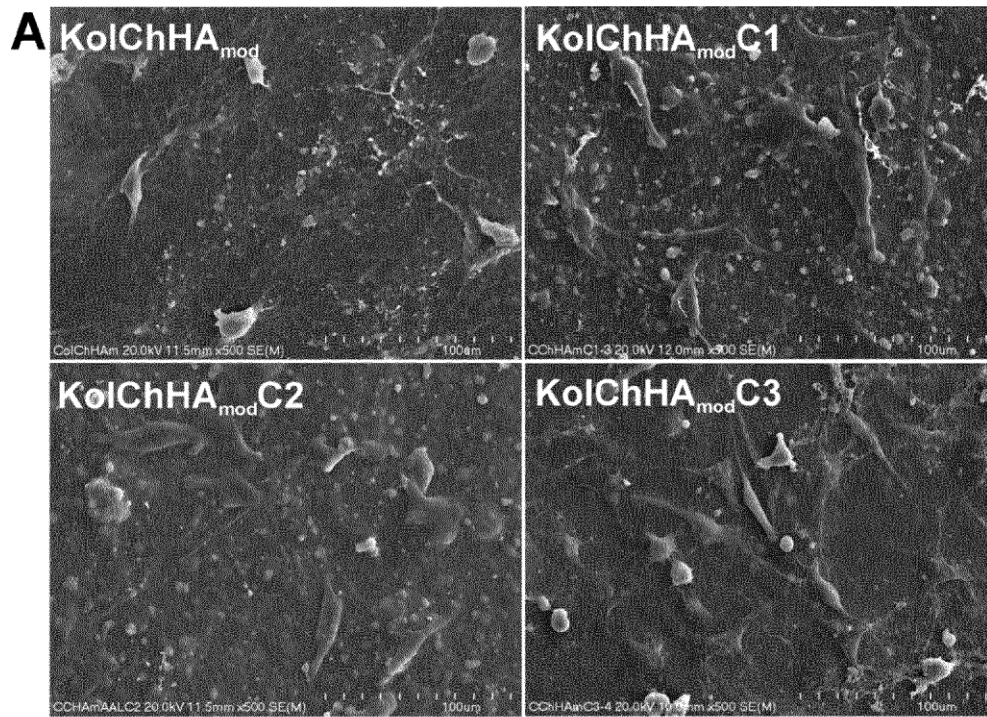


Fig. 11

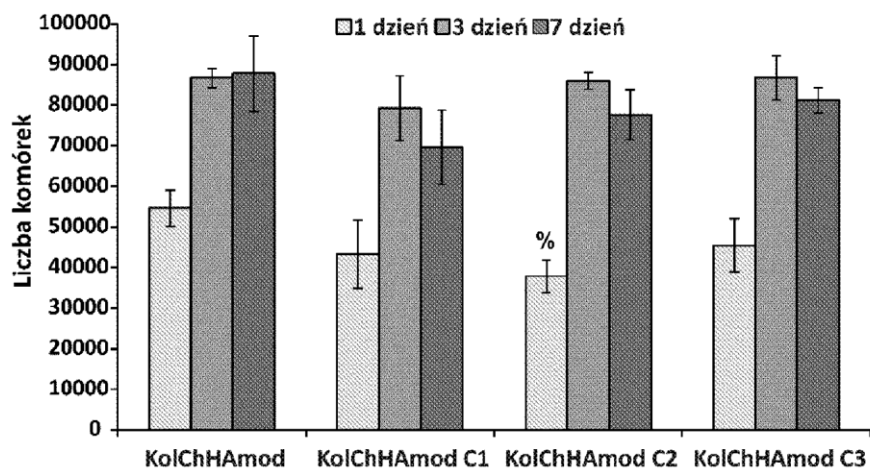


Fig. 12

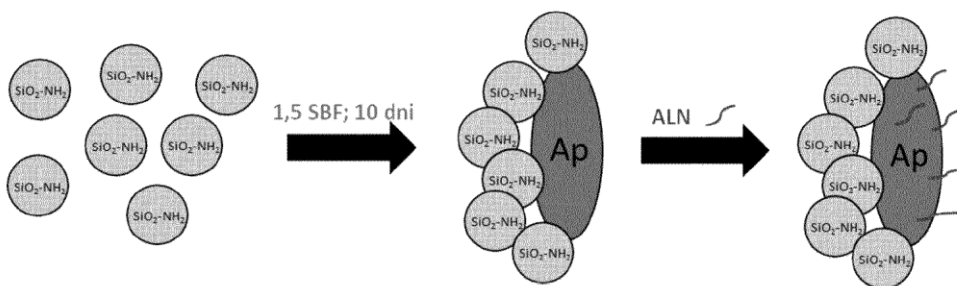


Fig. 13

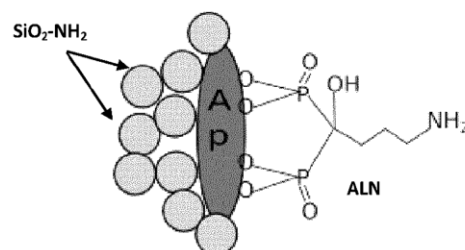


Fig. 14

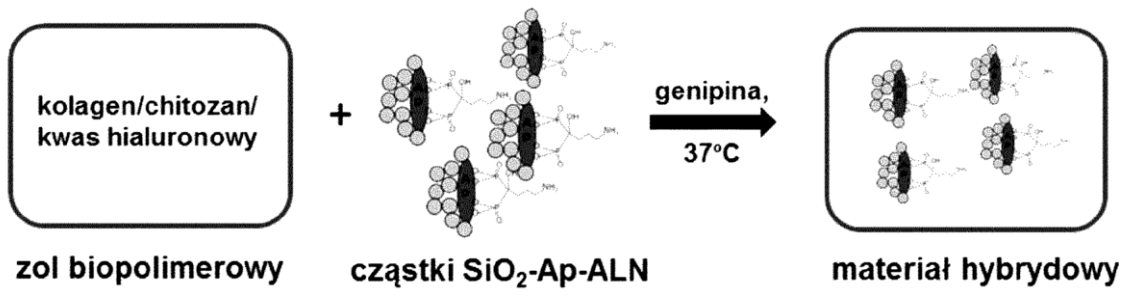


Fig. 15