

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **223650**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **404987**

(22) Data zgłoszenia: **05.08.2013:**

(51) Int.Cl.

A61L 27/08 (2006.01)

A61L 27/12 (2006.01)

A61L 27/14 (2006.01)

A61L 27/56 (2006.01)

(54) **Sposób otrzymywania bioaktywnych, resorbowalnych implantów
do leczenia ubytków kostnych**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

16.02.2015 BUP 04/15

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

31.10.2016 WUP 10/16

(73) Uprawniony z patentu:

**AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA
IM. STANISŁAWA STASZICA W KRAKOWIE,
Kraków, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

**ANETA FRĄCZEK-SZCZYPTA, Zielonki, PL
ELŻBIETA DŁUGOŃ, Kraków, PL
MARTA BŁAŻEWICZ, Kraków, PL
KRZYSZTOF FICEK, Bieruń, PL
STANISŁAW BŁAŻEWICZ, Kraków, PL**

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Barbara Kopta

PL 223650 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania bioaktywnych, resorbowalnych implantów do leczenia ubytków kostnych, w postaci modyfikowanych, resorbowalnych gąbek polimerowych.

Porowate struktury wytwarzane z polimerów resorbowalnych są coraz powszechniej stosowane do leczenia i rekonstrukcji tkanki kostnej człowieka. Ubytki kostne, szczególnie o większych rozmiarach, powstające w wyniku urazu, infekcji, zmian degeneracyjnych itp. nie ulegają samoistnemu wygojeniu i stanowią nadal nierozwiązany problem w chirurgii kostnej. Jedyną alternatywą dla auto lub allo-przeszczepów stają się metody z wykorzystaniem kościozastępczych materiałów syntetycznych.

Jednym z polimerów, coraz powszechniej stosowanym w medycynie, jest resorbowalny polilaktyd (PLA), należący do grupy poliestrów alifatycznych. Pomimo jego zalet w zastosowaniu w leczeniu tkanki kostnej, nie jest on jednak bioaktywnym materiałem zwiększającym potencjał regeneracyjny tkanki kostnej. Z tego względu, jako fazę modyfikującą matrycę polimerową, często wprowadza się bioaktywne nanododatki, takie jak hydroksyapatyt lub bioszkle.

Ze zgłoszenia P-385197 znany jest sposób otrzymywania produktu inżynierii tkankowej do rekonstrukcji i regeneracji kości, który polega na tym, że sporządza się trójwymiarowe rusztowanie, wykonane z syntetycznego węgla wapnia, na którym w warunkach hodowli dynamicznej osadza się żywe komórki osteogenne, przy czym stosuje się syntetyczny węgiel wapnia o zawartości domieszek nie większej niż 10% i o porowatości otwartej, od 40% do 95%, przy czym pory mają wielkość od 100 do 500 μm i są połączone między sobą. Komórki osteogenne otrzymywane są z materiału biologicznego, pochodzącego od dawcy, będącego równocześnie biorcą PIT, a po izolacji, namnażaniu i ewentualnym różnicowaniu w hodowli *in vitro* odrywane są od podłoża, a następnie w warunkach dynamicznych z zastosowaniem urządzenia zapewniającego przepływ pożywki przez urządzenie w obiegu zamkniętym osadzone są na podłożu rusztowania. Komórki dodawane są w postaci zawiesiny w dużej objętości medium hodowlanego o składzie dostosowanym do typu komórek.

Z polskiego opisu patentowego PL 206 394 B1 znany jest kompozyt bioaktywny, który zawiera β -1,3-glukan, zwany dalej kurdlanem oraz bioceramikę fosforanowo-wapniową w postaci mikroporowatych granul o rozmiarze 0,1–1,0 mm i o porowatości 50–70%, przy czym ilości składników oblicza się według odpowiedniego, ujawnionego w opisie wzoru.

Z polskiego zgłoszenia P-395212 znany jest biodegradowalny implant kostny składający się z granulek wykonanych z biodegradowalnego polimeru organicznego i/lub z biodegradowalnej ceramiki, zawierających wewnątrz związki wapnia i/lub magnezu, oraz z wodnego roztworu polikwasu organicznego.

Z publikacji „Kompozyty z polimerów resorbowalnych przeznaczone dla chirurgii kostnej” (J. Chłopek, A. Morawska-Chochół, Kompozyty 2009 nr 4) znane są badania wpływu modyfikatorów w postaci włókien i cząstek, na właściwości mechaniczne kopolimeru laktydu z glikolidem, w których określono szybkość utraty wytrzymałości kompozytów w wyniku oddziaływania symulowanego środowiska biologicznego oraz wpływ stosowanych dodatków na szybkość degradacji. W tym celu wykonano pomiary wytrzymałości kompozytów wyjściowych oraz po inkubacji w płynie Ringera. Degradację określono na podstawie zmian pH płynu Ringera w funkcji czasu inkubacji, dodatkowo przeprowadzono analizę mikroskopową powierzchni badanych kompozytów. Wszystkie badane materiały charakteryzują się niskim modułem Younga. Stanowi to istotną zaletę tych materiałów, gdyż dopasowanie modułów sprężystości implantu i kości sprzyja właściwemu obciążaniu tkanki kostnej i umożliwia jej prawidłową odbudowę. Najbardziej efektywną poprawę wytrzymałości uzyskano przez wprowadzenie do osnowy polimerowej włókien z poliakrylonitrylu modyfikowanych hydroksyapatytem. Kompozyt ten posiada równocześnie cechy bioaktywności, związane z obecnością hydroksyapatytu. Poprawę wytrzymałości kopolimeru zapewnia także dodatek włókien węglowych. Równocześnie włókna te znacznie przyspieszają degradację osnowy. Szybka degradację kopolimeru obserwuje się również po jego modyfikacji nanorurkami węglowymi (CNT).

Z polskiego opisu patentowego 210579 znany jest sposób wytwarzania biomateriału ceramiczno-węglowego znajdującego zastosowanie w leczeniu chorej tkanki kostnej i operacjach rekonstrukcyjnych w przypadku dużych ubytków tkanki kostnej. Sposób polega na przygotowaniu 18–25% roztworu przedzalniczego sporządzonego z terpolimeru akrylonitrylu, akrylanu metylu i alilosulfonianu sodu i DMF jako rozpuszczalnika, do którego wprowadza się dwa składniki ceramiczne w postaci nanometrycznych proszków SiO_2 i hydroksyapatytu (HAp) w ilości do 10% wagowych, przy czym stosunek wagowy SiO_2 do HAp wynosi od 0,1:1 do 1:0,1, po czym formuje się polimerowe, prekursorowe

włókna poliakrylonitrylowe, które z kolei poddaje się dwustopniowej obróbce termicznej, polegającej na utlenieniu w pierwszej fazie polimerowych włókien w atmosferze powietrza w czasie 1 do 10 godzin, w zakresie temperatur od 200° do 300°C, a następnie obróbce termicznej w atmosferze argonu lub azotu od temperatury pokojowej do temperatury 950°C.

W pracy „Kompozyty z polimerów biostabilnych i bioresorbowalnych modyfikowane bioaktywną ceramiką” (P. Rosół J. Chłopek, AGH) przedstawiono analizę właściwości mechanicznych i biologicznych w warunkach *in vitro* materiałów przeznaczonych na implanty przenoszące obciążenia mechaniczne. Na osnovy kompozytów wybrano polimery o różnym zachowaniu biologicznym: biostabilny – polisulfon (PSU) oraz bioresorbowalny kopolimer poli(laktyd-ko-glikolid) (PGLA). Próbkę polimerową modyfikowano bioaktywnymi cząstkami hydroksyapatytu (HA) otrzymanego z kości zwierzęcych. Zachowanie biologiczne badanych materiałów oceniono na podstawie obserwacji SEM, próbek inkubowanych w warunkach zbliżonych do panujących w ludzkim organizmie przez 30 dni. Próbkę poddano działaniu wybranych obciążeń z zakresu 2,5÷50 MPa i obserwowano czasy ich zniszczenia. Dodatek cząstek hydroksyapatytu do PSU i PGLA spowodował zmniejszenie trwałości kompozytów w stosunku do materiałów wyjściowych. Badane kompozyty wykazywały natomiast korzystne zachowanie biologiczne, co potwierdziły obserwacje powierzchni próbek inkubowanych w sztucznym środowisku biologicznym.

W publikacji „Nanokompozyty polimerowe modyfikowane powierzchniowo w procesie elektroforetycznego osadzania” (E. Sołtysik, E. Długoń, J. Dulnik, M. Blazewicz, Przetwórstwo Tworzyw 6, 2011) przedstawiono nanokompozyty przeznaczone dla medycyny regeneracyjnej w zastosowaniu do leczenia ubytków tkanki kostnej, charakteryzujące się specyficzną biomimetyczną strukturą i bioaktywnością.

Tkanka kostna, ze względu na strukturę i skład (kolagen/nanokryształy hydroksyapatytu) jest tworzywem nanokompozytowym. Dlatego też projektowanie tworzyw implantacyjnych, do leczenia ubytków tkanki kostnej, skupia się właśnie na tej grupie materiałowej, jaką są nanokompozyty polimerowe, modyfikowane bioaktywnymi nanocząstkami. Celem pracy były badania, mające określić przydatność nowej, dwuetapowej metody, do wytwarzania porowatych materiałów implantacyjnych, do leczenia tkanki kostnej. Gąbki nanokompozytowe, wytworzone w oparciu o dwuetapową metodę – wypłukiwanie rozpuszczalnego porogenu oraz elektroforetyczne osadzanie warstwy nanohydroksyapatytu, przebadano metodą mikroskopii elektronowej SEM, przeprowadzono badania przy zastosowaniu metody EDS oraz zbadano parametry mechaniczne i bioaktywność otrzymanych materiałów. Zastosowana w pracy metoda prowadzi do otrzymania bioaktywnych nanokompozytowych gąbek o pożądanym parametrach mechanicznych.

W pracy „Polymer Nanocomposite Scaffolds Modified With Carbon Nanotubes for Tissue Regeneration” (A. Fraczek-Szczypta, E. Stodolak-Zych, S. Jurdziak, M. Blazewicz, Materials Science Forum 714 (2012) 245–253) przedstawiono metody otrzymywania skafoldów polimerowych na bazie polilaktydu modyfikowanych nanorurkami węglowymi (CNT). Opisano również metodę wprowadzania CNT do osnowy polimerowej, która polegała na stopniowym dodawaniu nanorurek do rozpuszczalnika (dichlorometanu), a następnie mieszaniny za pomocą ultradźwięków przez 15 min. Kolejnym krokiem było dodanie polilaktydu do mieszaniny dichlorometan/CNT i przygotowanie 5% roztwórow polilaktydu z CNT. W pracy analizowano wpływ trzech udziałów wagowych CNT w polimerze; 0,5, 1 i 2%.

Porowate skafoldy przygotowano metodą wymywania soli (NaCl) oraz metodą łączoną (wymywania soli i wywiązywania się gazów), gdzie jako porogen zastosowano NH_4HCO_3). Stężenie polilaktydu wynosiło 12%, z kolei stosunek porogenu do polilaktydu 10:1. Porogen z roztworem polimeru mieszano ręcznie. Zastosowano trzy frakcje ziarnowe porogenu, odpowiednio 100–200 μm , 200–300 μm i 300–400 μm w stosunku 5:10:15. Przygotowane pasty polilaktydu z CNT i porogendem wprowadzono do form. W przypadku porogenu NH_4HCO_3 pastę wprowadzono do pojemników szklanych o średnicy 15 mm i wysokości 20 mm, natomiast w przypadku NaCl pasta umieszczona została w pojemniku z polipropylenu o średnicy 25 mm i wysokości 60 mm. W celu uzyskania porowatych skafoldów próbki z NH_4HCO_3 umieszczono w wodzie o temperaturze 80°C–90°C przez 10 min, a następnie w zimnej wodzie przez 20 min oraz wodzie o temperaturze 40°C przez 2 dni w celu usunięcia pozostałości porogenu. W przypadku próbek z NaCl w pierwszym etapie suszono je przez 5 min w temperaturze pokojowej, w celu odparowania rozpuszczalnika, a następnie zanurzono w wodzie przez 1 tydzień w celu usunięcia porogenu. Otrzymane porowate skafoldy polimerowe z nanorurkami cechują się lepszymi parametrami mechanicznymi w porównaniu do skafoldów bez dodatku nanorurek. Dodatkowo zaobserwowano za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego wydzielenia

apatytowe na powierzchni nanorurek po inkubacji w SBF, co może świadczyć o bioaktywnym charakterze wielościennych nanorurek węglowych (MWCNT). Badania biologiczne na linii komórkowej osteoblastów MG63 potwierdziły biogodny charakter polilaktydu z MWCNT, czego dowodem jest wzrost proliferacji komórek wraz z czasem hodowli osteoblastów (od 1 do 7 dnia). Stopień proliferacji po 7 dniach hodowli był najwyższy dla kompozytu z 1% wag. MWCNT.

W publikacji "*In vivo* biocompatibility of ultra-short single-walled carbon nanotube/biodegradable polymer nanocomposites for bone tissue engineering" (B. Sitharaman, X. Shi, X.F. Walboomers, H. Liao, L.J. Wilson, A.G. Mikos, J.A. Jansen, V. Cuijpers. *Bone* 43 (2008) 362–370) opisano również metodę otrzymywania skafoldów porowatych na bazie biodegradowalnych polimerów (PPF i PF-DA) (ang. poly(propylene fumarate) i propylene fumarate diacrylate) z ultrakrótkimi jednościenymi nanorurkami (US-tube) do regeneracji tkanki kostnej. Stężenie US-tube w polimerze wynosiło 0,5% wag. Porowate skafoldy z nanorurkami (US-tube) otrzymywane były metodą termicznego sieciowania, a następnie wmywania porogenu (NaCl). Roztwór polimeru z US-tubes mieszano z 90%wag. NaCl o wielkości ziaren z przedziału 300–500 μm . Otrzymane skafoldy implantowano do kości oraz podskórnice królikom. Odpowiedź tkanki na implant obserwowano za pomocą mikrotomografii komputerowej, badań histologicznych oraz histomorfometrii po 4 i 12 tygodniach od implantacji. Zarówno w przypadku tkanki kostnej jak i miękkiej zaobserwowano korzystny wpływ US-tube na odpowiedź komórkową. Po 12 tygodniach od implantacji zauważono trzykrotnie lepsze wrastanie kości w skafold zawierający nanorurki niż w skafold bez nanorurek. Poza tym zaobserwowano redukcję stanu zapalnego w przypadku skafoldów modyfikowanych US-tube. Otrzymane przez autorów wyniki sugerują, że obecność US-tube w skafoldach polimerowych może działać bioaktywnie wspomagając osteogenezę.

Celem wynalazku jest opracowanie sposobu otrzymywania hybrydowego materiału implantacyjnego, który charakteryzowałby się jednocześnie właściwościami osteokonduktywnymi i osteoinduktywnymi.

Sposób według wynalazku polega na tym, że z resorbowalnych polimerów takich jak polilaktyd, poliglikolid oraz ich kopolimery, zawierających 0,5–2% wagowych funkcjonalizowanych nanorurek węglowych (funkcjonalizacja w mieszaninie stężonych kwasów $\text{H}_2\text{SO}_4:\text{HNO}_3$, w stosunku 3:1), wytwarza się znaną metodą wmywania porogenu lub metodą łączoną, polegającą na wmywaniu porogenu i spienianiu z zastosowaniem wodorowęglanu amonu (NH_4HCO_3). Bardzo ważnym etapem wytwarzania gąbek polimerowych jest właściwa dyspersja nanorurek w matrycy polimerowej, którą prowadzi się w rozpuszczalniku (dichlorometan) stosując mieszadło ultradźwiękowe, a następnie w tak przygotowanej zawieszynie rozpuszcza się polimer i całość poddaje się wielogodzinnej homogenizacji mechanicznej. Otrzymane gąbki z nanorurkami posiadają wielkość porów od 50 do 400 μm . W drugim etapie gąbki z nanorurkami poddaje się infiltracji nanoproszkiem ceramicznym w postaci nanohydroksyapatytu pochodzenia syntetycznego i naturalnego. W tym celu gąbkę z nanorurkami umieszcza się jako elektrodę ujemną, w zawieszynie alkoholu etylowego i nanoproszku hydroksyapatytu o wielkości ziaren od 30 nm do 200 nm i stężeniu od 1–2% wag., a następnie poddaje się działaniu stałego pola elektrycznego o napięciu od 15 do 40 V w czasie od 0,5 do 5 minut aż do uzyskania przyrostu wagi od 0,5 do 5%. Proces prowadzi się w temperaturze pokojowej.

Naładowane nanocząstki poruszają się w polu elektrycznym, zgodnie z potencjałem w kierunku elektrody ujemnej, którą stanowi porowaty materiał polimerowy modyfikowany nanorurkami.

Wykorzystanie sposobu elektroforetycznego do transportu nanometrycznych cząstek hydroksyapatytowych do powierzchni i wnętrza porowatej matrycy polimerowej pozwala uniknąć skomplikowanych procesów impregnacji proszkowych surowców ceramicznych, formowania wyrobu polimerowego, zawierającego składnik ceramiczny i konieczności prowadzenia złożonej procedury usuwania rozpuszczalników z mieszaniny polimerowo-ceramicznej przed samym formowaniem wyrobu.

Sposób według wynalazku pozwala na pełną kontrolę składu chemicznego produktu, uzyskanie produktu o wysokiej czystości chemicznej, homogeniczności i zapewnia łatwość dalszej modyfikacji składu końcowego produktów.

Sposób według wynalazku pozwala na wytworzenie hybrydowej gąbki polimerowej, zawierającej dwa różne składniki nanometryczne, które nadają jej podwyższoną wytrzymałość mechaniczną i aktywność biologiczną tj. są jednocześnie osteokonduktywne i osteoinduktywne. Poprawa wytrzymałości mechanicznej gąbek następuje dzięki niewielkiej ilości nanorurek węglowych wprowadzonych do osnowy polimerowej, natomiast osteokonduktywność gąbki uzyskują drogą resorpcji bioresorbowalnej osnowy polimerowej, odstaniającej funkcjonalizowane nanorurki węglowe. Wyekspozowane na powierzchnię nanorurki węglowe, w miejscu ubytku kostnego, aktywują proces adhezji komórek mezen-

chymalnych i promują ich różnicowanie w osteoblasty. Obecność nanocząstek hydroksyapatytowych czyni te materiały osteokonduktywnymi w procesie regeneracyjnym. Obecność porów w gąbce umożliwia wrastanie naczyń krwionośnych, komórek i nowej tkanki.

Przykład 1

Porowatą gąbkę z polilaktydu otrzymuje się metodą łączoną polegającą na wymywaniu porogenu i spienianiu z zastosowaniem wodorowęglanu amonu (NH_4HCO_3). Ważnym etapem wytwarzania gąbki jest właściwa dyspersja nanorurek w matrycy polimerowej. Prowadzi się ją w rozpuszczalniku, stosując mieszadło ultradźwiękowe, a następnie w przygotowanej mieszaninie rozpuszcza się polimer i całość poddaje się wielogodzinnej homogenizacji mechanicznej. Konieczna jest również funkcjonalizacja nanorurek węglowych celem wytworzenia grup karboksylowych, którą prowadzi się znaną metodą utleniania w mieszaninie kwasów H_2SO_4 i HNO_3 .

Tak wytworzoną gąbkę zawierającą 1% wagowy nanorurek węglowych, w formie krążka o średnicy około 2 cm i grubości 0,4 cm, o średniej porowatości 80% i wielkości porów w zakresie 50 do 400 μm zanurza się w zawiesinie alkoholu etylowego zawierającego 1,5% wagowych nanohydroksyapatytu o średnicy wynoszącej średnio 0,2 μm . Następnie prowadzi się proces elektroforezy przy napięciu 30 V w czasie 1 minuty. Odległość pomiędzy elektrodą dodatnią a gąbką polimerową stanowiącą elektrodę ujemną wynosi 1,5 cm. Po przeprowadzeniu procesu nanoszenia elektroforetycznego otrzymane próbki hybrydowego biomateriału przepłukuje się wodą destylowaną i suszy w temperaturze pokojowej.

Przykład 2

Gąbkę z polilaktydu zawierającą 1% wagowy nanorurek węglowych, uzyskaną metodą wymywania porogenu (którym jest NaCl) w kształcie kwadratowej płytki prostopadłościowej o boku 2 cm i wysokości 4 mm zawierającej pory w zakresie 50 do 400 μm i porowatości 85% zanurza się w zawiesinie alkoholu etylowego zawierającego 1,5% wagowych nanohydroksyapatytu o średnicy ziaren wynoszącej średnio 0,2 μm . Proces elektroforezy prowadzi się przy napięciu 15 V w czasie 2 minut. Odległość pomiędzy elektrodą dodatnią a gąbką polimerową stanowiącą elektrodę ujemną wynosi 1,5 cm. Po przeprowadzeniu procesu nanoszenia elektroforetycznego otrzymane próbki hybrydowego biomateriału przepłukuje się wodą destylowaną i suszy w temperaturze pokojowej.

Przykład 3

Gąbkę z polilaktydu zawierającą 2% wagowy nanorurek węglowych, uzyskaną metodą wymywania porogenu (którym jest NaCl) w kształcie krążka o średnicy 4 cm i grubości 0,4 cm o wielkości porów w zakresie 50 do 400 μm i porowatości 70% zanurza się w zawiesinie alkoholu etylowego zawierającego 2% wagowych nanohydroksyapatytu o średnicy ziaren wynoszącej średnio 0,2 μm . Proces elektroforezy prowadzi się przy napięciu 30 V w czasie 2 minut. Odległość pomiędzy elektrodą dodatnią a gąbką polimerową stanowiącą elektrodę ujemną wynosi 2 cm. Po przeprowadzeniu procesu nanoszenia elektroforetycznego otrzymane próbki hybrydowego biomateriału przepłukuje się wodą destylowaną i suszy w temperaturze pokojowej.

Zastrzeżenie patentowe

Sposób otrzymywania bioaktywnych, resorbowalnych implantów do leczenia ubytków kostnych, polegający na wytworzeniu gąbki polimerowej z resorbowalnych polimerów takich jak polilaktyd, poliglikolid oraz ich kopolimery, modyfikowanej funkcjonalizowanymi nanorurkami węglowymi, oraz wykorzystujący proces nanoszenia elektroforetycznego, **znamienny tym**, że z resorbowalnych polimerów, zawierających 0,5–2% wagowych funkcjonalizowanych nanorurek węglowych, wytwarza się gąbkę o wielkości porów od 50 do 400 μm , po czym otrzymaną strukturę, w drugim etapie, poddaje się impregnacji za pomocą cząstek nanohydroksyapatytu, umieszczając gąbkę z nanorurkami, jako elektrodę ujemną, w zawiesinie alkoholu etylowego i nanoproszku hydroksyapatytu o wielkości ziaren od 30 nm do 200 nm i stężeniu od 1–2% wagowych, a następnie poddaje się ją działaniu stałego pola elektrycznego o napięciu od 15 do 40 V w czasie od 0,5 do 5 minut aż do uzyskania przyrostu wagi od 0,5 do 5%, przy czym proces prowadzi się w temperaturze pokojowej.

