

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **240558**
(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **437236**

(22) Data zgłoszenia: **08.03.2021**

(51) Int.Cl.

A61L 27/20 (2006.01)

A61L 27/22 (2006.01)

A61L 27/52 (2006.01)

(54) **Biomateriał na bazie β -1,3-glukanu (kurdlanu) do regeneracji tkanki chrzęstnej i/lub kostnej oraz sposób jego wytwarzania**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
22.11.2021 BUP 34/21

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
25.04.2022 WUP 17/22

(73) Uprawniony z patentu:

**UNIwersYTET MEDYCZNY W LUBLINIE,
Lublin, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

**KATARZYNA KLIMEK, Lublin, PL
GRAŻYNA GINALSKA, Lublin, PL
MARTA TARCZYŃSKA-OSINIĄK, Lublin, PL
KRZYSZTOF GAWĘDA, Lublin, PL**

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Anna Belz

PL 240558 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest biomateriał na bazie naturalnego polisacharydu – β -1,3-glukanu (kurdlanu) oraz izolatu białka serwatkowego (WPI), który może być stosowany do regeneracji tkanki chrzęstnej i/lub kostnej, a także sposób jego wytwarzania.

Uszkodzenia tkanki chrzęstnej oraz kostnej zdarzają się coraz częściej i powstają przede wszystkim w skutek nieprawidłowo wykonywanych ćwiczeń fizycznych, chorób lub przebytych wypadków komunikacyjnych. Ponadto ryzyko ich występowania znacznie wzrasta wraz z wiekiem pacjenta (Vinatier C. and Guicheux J., Ann. Phys. Rehabil. Med. 2016, 59, 139–144; Deng C. et al. Nanomed. Nanobiotechnol. 2019, e1576). Niewielkie uszkodzenia tkanki chrzęstnej, które dotyczą warstwy powierzchniowej (II° wg skali Outerbridgae'a), przeważnie leczone są farmakologicznie. Natomiast duże uszkodzenia (III° wg skali Outerbridgae'a), które obejmują pęknięcia warstwy głębokiej chrząstki oraz bardziej poważne ubytki (IV° wg skali Outerbridgae'a), dotyczące nie tylko warstw tkanki chrzęstnej, ale także warstwy kości podchrzęstnej, wymagają interwencji chirurgicznej (Casey Slattery B. S., Clin. Orthop. Relat. Res. 2018, 476, 2101–2104; Cassar-Gheiti A. J. et al. Intechopen 2016, doi: 10.5772/intechopen.70261). Najczęściej istnieje potrzeba zastosowania wszczepu, który zastąpi fragmenty brakującej/yh tkanki/ek. Chociaż autografty (przeszczepy autologiczne) są uważane za „złoty standard” w regeneracji ubytków chrzęstnych i kostnych, ich stosowanie ma pewne wady i ograniczenia. W związku z tym, coraz częściej stosuje się biomateriały implantacyjne, tzw. skafoldy. Szczególnym zainteresowaniem medycznym cieszą się biomateriały, które nie tylko posiadają kompozycję i strukturę podobną do natywnej tkanki, ale także wykazują zbliżone do niej właściwości fizyko-chemiczne, mechaniczne oraz biologiczne (Armiento A. R. et al., Acta Biomaterialia 2018, 65, 1–20; Liu Y. et al., Engineering 2017, 3, 28–35; Zhang Y., Tissue Engineering 2019, 29, 1903279).

Znanym rozwiązaniem w terapii poważnych uszkodzeń tkanki chrzęstnej i kostnej jest stosowanie biokompatybilnych biomateriałów na bazie naturalnych polimerów, takich jak alginian, chitozan, agaroz, kwas hialuronowy, celuloza, kolagen czy żelatyna. Skafoldy takie są nietoksyczne, a ponadto przyspieszają regenerację tkanki w miejscu ubytku. Dla przykładu, z opisu patentowego CN106474558A, znany jest materiał do regeneracji tkanki chrzęstnej, którego kompozycja zawiera alginian oraz ludzkie rekombinowane białko morfogenetyczne kości 6 (rhBMP-6). Biomateriał ten nie wykazuje immunogenności i sprzyja różnicowaniu ludzkich osteoblastów (linia komórkowa MG-63 wyprowadzona z osteosarkomy). Z opisu patentowego US2009252798A1 znany jest biomateriał na bazie kwasu hialuronowego (MATRIX-GEL), którego właściwości mechaniczne są zbliżone do właściwości natywnej tkanki chrzęstnej. Ponadto, wspiera on rekrutację mezenchymalnych komórek progenitorowych ze szpiku kostnego. Z opisu patentowego CN105381504A znany jest skafold na bazie kolagenu, który w warunkach *in vivo* (badania na krółach nowozelandzkich z ubytkiem chrzęstno-kostnym) indukuje powstawanie tkanki podobnej do naturalnej chrząstki. Biomateriał wykazuje także dobrą integrację z natywną tkanką chrzęstną oraz warstwą kości podchrzęstnej. Z opisu patentowego CN108785751A znany jest porowaty skafold kostny na bazie rybiego kolagenu oraz alginianu. Biomateriał ten wykazuje właściwości mechaniczne zbliżone do ludzkiej kości udowej. Ponadto jest on nietoksyczny względem fibroblastów mysich (linia komórkowa 3T3). Z kolei z opisu patentowego CN102327643A znany jest skafold kostny na bazie chitozanu oraz żelatyny.

Z przeglądu baz patentowych oraz z powyższych opisów patentowych wynika, że nie ma obecnie biomateriałów na bazie bakteryjnego liniowego β -1,3-glukanu (kurdlanu) oraz izolatu białka serwatkowego (WPI). Wiadomo jednak, że hydrożel β -1,3-glukanowy (kurdlanowy) otrzymywany metodą termiczną znalazł zastosowanie jako składnik ceramiczno-polimerowego substytutu kostnego (Patent PL 206394 i International Patent nr EU 2421570 B1). Z kolei, hydrożel kurdlanowy, otrzymywany metodą dializy względem roztworu jonów wapnia znalazł zastosowanie jako składnik ceramiczno-polimerowego rusztowania kostnego (Patent PL 229329 B1). Ponadto znany jest hydrożel na bazie białka serwatkowego (WPI), a także hydrożele na bazie WPI i polisacharydów – amylozy, celulozy, amylopektyny, chitozanu i dekstranu, które dedykowane są do regeneracji tkanki kostnej (Patent USA US/2013/0101548 A1, Patent USA US 9,758,558 B2 i International Patent nr WO 2011/123760 A2).

Nikt dotąd nie zastosował połączenia polimeru w postaci β -1,3-glukanu (kurdlanu) i białka serwatkowego (WPI) do regeneracji tkanki chrzęstnej i/lub kostnej.

Wynalazek rozwiązuje zagadnienie otrzymywania biomateriału na bazie β -1,3-glukanu (kurdlanu) oraz izolatu białka serwatkowego (WPI), charakteryzującego się właściwościami mechanicznymi zbliżonymi do właściwości natywnej tkanki chrzęstnej, a także biokompatybilnością w warunkach *in vitro*, poprzez zwiększanie żywotności oraz proliferacji osteoblastów ludzkich (linia hFOB 1.19, ATCC).

Biomateriał według wynalazku stanowi β -1,3-glukan (kurdlan) i izolat białka serwatkowego (WPI), gdzie proporcje składników względem 100 ml wodnego roztworu wynoszą odpowiednio: 6–20% (w/v), korzystnie 8% (w/v) – kurdlan oraz 20–50% (w/v), korzystnie 30% (w/v) – WPI.

Sposób wytwarzania biomateriału według wynalazku polega na tym, że najpierw przygotowuje się w wodzie destylowanej 20–50% (w/v) roztwór izolatu białka serwatkowego (WPI), korzystnie 30% (w/v) i dodaje się go do β -1,3-glukanu (kurdlanu) w postaci proszku, tak aby stężenie kurdlanu względem roztworu WPI wynosiło 6–20% (w/v), korzystnie 8% (w/v), otrzymaną mieszaninę umieszcza się w formach i inkubuje przez 10–30 minut, korzystnie 15 minut w temperaturze 90–120°C, korzystnie 90°C, następnie otrzymany hydrożel kurdlan-WPI poddaje się chłodzeniu w temperaturze pokojowej i sterylizuje.

Korzystnie biomateriał sterylizuje się poprzez autoklawowanie.

Korzystnie jest, gdy sterylizację mokrego materiału prowadzi się poprzez autoklawowanie w temperaturze 121°C przez 15 minut.

Korzystnie biomateriał poddaje się sterylizacji gazowej z wykorzystaniem tlenu etylenu, przy czym najpierw poddaje się go zamrożeniu i suszeniu poprzez liofilizację.

Korzystnie zamrożenie materiału przeprowadza się w temperaturze od -5°C do -170°C, korzystnie -80°C, przez okres 2–5 dni, korzystnie 2 dni.

Korzystnie biomateriał suszy się poprzez liofilizację w czasie 15–30 godzin, korzystnie 19–26 godzin.

Korzystnie sterylizację suchego materiału prowadzi się tlenkiem etylenu (55°C) przez 3 godziny.

Wytworzony wg wynalazku biomateriał na bazie kurdlanu i WPI charakteryzuje się właściwościami mechanicznymi zbliżonymi do właściwości natywnej tkanki chrzęstnej oraz korzystnymi właściwościami biologicznymi względem ludzkich osteoblastów w warunkach *in vitro*, co jest korzystne w regeneracji tkanki kostnej.

Korzystne właściwości mechaniczne biomateriału wynikają ze sposobu wytwarzania, a także jego kompozycji. Zdolność do wykazywania pożądanych właściwości biologicznych, tj. do wspierania żywotności i proliferacji osteoblastów wynika ze struktury biomateriału oraz jego kompozycji.

Jak się nieoczekiwanie okazało połączenie polimeru w postaci β -1,3-glukanu (kurdlanu) i białka serwatkowego (WPI) w odpowiednich proporcjach przyniosło poszukiwane efekty w regeneracji tkanki chrzęstnej i/lub kostnej. Składniki te wzajemnie się uzupełniają, gdyż kurdlan posiada zdolność do tworzenia sprężystego żelu, z kolei białko serwatkowe (WPI) tworzy żel, który charakteryzuje się właściwościami mechanicznymi zbliżonymi do właściwości natywnej tkanki chrzęstnej/kostnej, a także wykazuje biokompatybilność w warunkach *in vitro*, poprzez zwiększanie żywotności oraz proliferacji osteoblastów ludzkich.

Przedmiot wynalazku ilustrują przedstawione poniżej przykłady.

Przykład 1

Do 3 g izolatu białka serwatkowego (WPI) dodano 10 ml wody destylowanej i mieszano, aż do całkowitego rozpuszczenia WPI. Otrzymany klarowny roztwór dodano do 0,8 g kurdlanu i mieszano aż do połączenia składników. Następnie taką mieszaninę umieszczono w probówkach typu Eppendorf o pojemności 2 ml i poddano inkubacji w temperaturze 90°C przez 15 minut. Otrzymane hydrożele chłodzono w temperaturze pokojowej przez okres 1 godziny. Schłodzone biomateriały wyjęto z probówek i pocięto na krążki o grubości 2–3 mm i średnicy 1 cm. Sterylizację otrzymanych krążków przeprowadzono przez autoklawowanie w temperaturze 121°C, 15 minut. Przygotowane w ten sposób biomateriały wykazują korzystne właściwości, tj. posiadają dobre parametry mechaniczne, zbliżone do właściwości natywnej tkanki chrzęstnej/kostnej i wspierają procesy komórkowe, tj. wzmacniają żywotność i proliferację osteoblastów hFOB 1.19.

Przykład 2

Do 3,5 g izolatu białka serwatkowego (WPI) dodano 10 ml wody destylowanej. Składniki mieszano, aż do całkowitego rozpuszczenia WPI. Otrzymany klarowny roztwór dodano do 0,7 g kurdlanu i mieszano aż do połączenia składników. Następnie taką mieszaninę umieszczono w szklanej szalce Petriego o średnicy 2 cm i poddano inkubacji w temperaturze 90°C przez 15 minut. Otrzymany hydrożel chłodzono w temperaturze pokojowej przez okres 1 godziny. Schłodzony biomateriał poddano sterylizacji poprzez autoklawowanie w temperaturze 121°C, 15 minut. Przygotowany w ten sposób biomateriał wykazuje korzystne właściwości, tj. posiada dobre parametry mechaniczne, zbliżone do właściwości

natywnej tkanki chrzęstnej/kostnej i wspiera procesy komórkowe, tj. wzmacnia żywotność i proliferację osteoblastów hFOB 1.19.

Przykład 3

Do 3 g izolatu białka serwatkowego (WPI) dodano 10 ml wody destylowanej. Składniki mieszano, aż do całkowitego rozpuszczenia WPI. Otrzymany klarowny roztwór dodano do 0,6 g kurdlanu i mieszano aż do połączenia składników. Następnie taką mieszaninę umieszczono w probówkach typu Eppendorf o pojemności 2 ml i poddano inkubacji w temperaturze 90°C przez 20 minut. Otrzymane hydrożele chłodzono w temperaturze pokojowej przez okres 1 godziny. Schłodzone biomateriały wyjęto z probówek, pocięto na walce o wysokości 10 mm i średnicy 1 cm i wysterylizowano przez autoklawowanie w temperaturze 121°C, 15 minut. Przygotowane w ten sposób biomateriały wykazują korzystne właściwości, tj. posiadają dobre parametry mechaniczne, zbliżone do właściwości natywnej tkanki chrzęstnej/kostnej i wspierają procesy komórkowe, tj. wzmacniają żywotność i proliferację osteoblastów hFOB 1.19.

Przykład 4

Do 3 g izolatu białka serwatkowego (WPI) dodano 10 ml wody destylowanej. Składniki mieszano, aż do całkowitego rozpuszczenia WPI. Otrzymany klarowny roztwór dodano do 0,7 g kurdlanu i mieszano aż do połączenia składników. Następnie taką mieszaninę umieszczono w probówkach typu Eppendorf o pojemności 2 ml i poddano inkubacji w temperaturze 90°C przez 15 minut. Otrzymane hydrożele chłodzono w temperaturze pokojowej przez okres 1 godziny. Schłodzone biomateriały wyjęto z probówek i pocięto na krążki o grubości 2–3 mm i średnicy 1 cm. Krążki biomateriału umieszczono w zamrażarce -80°C na 2 dni. Zamrożone biomateriały poddano suszeniu poprzez liofilizację w czasie 24 godzin. Po wysuszeniu, próbki umieszczono w przeznaczonych do sterylizacji rękawach foliowo-papierowych i poddano sterylizacji tlenkiem etylenu (55°C, 3 godziny, a następnie 15-godzinna wentylacja próbki w celu odprowadzenia resztek tlenu etylenu po procesie sterylizacji). Przygotowane w ten sposób biomateriały wykazują korzystne parametry mechaniczne, zbliżone do właściwości natywnej tkanki chrzęstnej/kostnej i wspierają procesy komórkowe, tj. wzmacniają żywotność i proliferację osteoblastów hFOB 1.19.

Przykład 5

Do 4 g izolatu białka serwatkowego (WPI) dodano 10 ml wody destylowanej. Składniki mieszano, aż do całkowitego rozpuszczenia WPI. Otrzymany klarowny roztwór dodano do 0,8 g kurdlanu i mieszano aż do połączenia składników. Następnie taką mieszaninę umieszczono w probówkach typu Eppendorf o pojemności 2 ml i poddano inkubacji w temperaturze 90°C przez 15 minut. Otrzymane hydrożele chłodzono w temperaturze pokojowej przez okres 1 godziny. Schłodzone biomateriały wyjęto z probówek i pocięto na walce o wysokości 5 mm i średnicy 1 cm. Biomateriały (walce) umieszczono w zamrażarce -80°C na 2 dni. Zamrożone walce poddano suszeniu poprzez liofilizację w czasie 24 godzin. Po wysuszeniu umieszczono je w przeznaczonych do sterylizacji rękawach foliowo-papierowych i poddano sterylizacji poprzez tlenek etylenu (55°C, 3 godziny, a następnie 15-godzinna wentylacja próbki w celu odprowadzenia resztek tlenu etylenu po procesie sterylizacji). Przygotowane w ten sposób biomateriały wykazują korzystne parametry mechaniczne, zbliżone do właściwości natywnej tkanki chrzęstnej/kostnej i wspierają procesy komórkowe, tj. wspierają żywotność i proliferację osteoblastów hFOB 1.19.

Wyniki badań dla biomateriału kurdlan (8% w/v) – WPI (30% w/v) wytworzonego według wynalazku przedstawiono w **Tabeli 1**.

Tabela 1. Wybrane właściwości biomateriału kurdlan – WPI wytworzonego według wynalazku

Cecha	Biomateriał kurdlan-WPI wytwarzany według wynalazku
Korzystne właściwości mechaniczne wyrażone w postaci wartości modułu Young'a. Wynik uzyskano na podstawie testu mechanicznego.	Moduł Young'a biomateriału kurdlan-WPI: $0,884 \pm 0,143$ MPa Wskazuje się, że wartości modułu Young'a dla tkanki chrzęstnej wynoszą 0,079-320 MPa. Z kolei, wartość modułu Young'a dla kości podchrzęstnej jest wyższy i wynosi ok. 5,7 GPa. Wyniki te pokazują, że biomateriał kurdlan-WPI może być stosowany do regeneracji tkanki chrzęstnej oraz/lub tkanki kostnej po dodatkowym jego wzmocnieniu, np. w postaci blaszek tytanowych.

Zdolność do wspierania żywotności ludzkich osteoblastów hFOB 1.19 <i>in vitro</i> w kontakcie pośrednim. Zdolność tą wyrażono jako procent żywotności komórek po 48-godz. inkubacji z ekstraktem pozyskanym z biomateriału kurdlan-WPI wg normy ISO 10993-5:2009. Wynik na podstawie testu MTT.	102,98 ± 2,95% w porównaniu z komórkami kontrolnymi (osteoblastami ludzkimi traktowanymi płynem hodowlanym inkubowanym bez obecności materiału).
Zdolność do wspierania żywotności ludzkich osteoblastów hFOB 1.19 <i>in vitro</i> w kontakcie bezpośrednim. Zdolność tą oceniono po 48-godz. inkubacji ludzkich osteoblastów na biomateriale kurdlan-WPI. Na podstawie przeprowadzonego barwienia różnicującego żywe/martwe komórki (zestaw Live/Dead Cell Double Staining Kit).	Obserwacje mikroskopowe wykazały, że komórki rosnące na biomateriale kurdlan-WPI były dobrze przyklejone do jego powierzchni i wykazywały wysoką żywotność – komórki emitowały zieloną fluorescencję. Nie obserwowano komórek martwych, które emitowałyby czerwoną fluorescencję.
Zdolność do wspierania procesów proliferacji osteoblastów ludzkich hFOB 1.19 w kontakcie bezpośrednim <i>in vitro</i> . Zdolność tą oceniono poprzez barwienie cytoszkieletu (barwnik – falloidyna) oraz jąder komórkowych (barwnik – Hoechst33342) po 3- i 6- dniach od inokulacji ludzkich osteoblastów na biomateriale kurdlan-WPI.	Obserwacje mikroskopowe wykazały, że liczba osteoblastów ludzkich rosnących na biomateriale kurdlan-WPI wzrastała w czasie. Zarówno po 3- jak i po 6- dniach inkubacji, komórki były dobrze rozplaszczane, miały podłużny kształt i posiadały duże jądra oraz rozbudowany system cytoszkieletu, co świadczy o tym, że biomateriał kurdlan-WPI jest odpowiednim rusztowaniem do wzrostu komórek w warunkach <i>in vitro</i> .

Przedstawione w Tabeli 1. wyniki wskazują, że wytworzony wg wynalazku biomateriał kurdlan-WPI, wykazuje korzystne właściwości mechaniczne i biologiczne. Wynalazek może znaleźć zastosowanie jako biomateriał implantacyjny w celu regeneracji ubytków chrzęstnych i/lub kostnych.

Zastrzeżenia patentowe

1. Biomateriał na bazie β -1,3-glukanu (kurdlanu) **znamienny tym**, że stanowi go β -1,3-glukan (kurdlan) i izolat białka serwatkowego (WPI), gdzie proporcje składników względem 100 ml wodnego roztworu wynoszą: 6–20% (w/v), korzystnie 8% (w/v) – kurdlan i 20–50% (w/v), korzystnie 30% (w/v) – WPI.
2. Biomateriał według zastrz. 1 **znamienny tym**, że jest wysterylizowany.
3. Sposób wytwarzania biomateriału na bazie β -1,3-glukanu (kurdlanu) **znamienny tym**, że najpierw przygotowuje się w wodzie destylowanej 20–50% (w/v) roztwór izolatu białka serwatkowego (WPI), korzystnie 30% (w/v), i dodaje się go do β -1,3-glukanu (kurdlanu) w postaci proszku, tak aby stężenie kurdlanu względem roztworu WPI wynosiło 6–20% (w/v), korzystnie 8% (w/v), otrzymaną mieszaninę umieszcza się w formach i inkubuje przez 10–30 minut, korzystnie 15 minut w temperaturze 90–120°C, korzystnie 90°C, następnie otrzymany hydrożel kurdlan-WPI poddaje się chłodzeniu w temperaturze pokojowej.
4. Sposób według zastrz. 3 **znamienny tym**, że otrzymany biomateriał sterylizuje się.
5. Sposób według zastrz. 3 **znamienny tym**, że otrzymany mokry biomateriał sterylizuje się poprzez autoklawowanie.
6. Sposób według zastrz. 4 **znamienny tym**, że sterylizację mokrego materiału prowadzi się w temperaturze 121°C przez 15 minut.
7. Sposób według zastrz. 3 **znamienny tym**, że otrzymany biomateriał poddaje się sterylizacji gazowej z wykorzystaniem tlenu etylenu, przy czym najpierw poddaje się zamrożeniu i suszeniu poprzez liofilizację.
8. Sposób według zastrz. 6 **znamienny tym**, że zamrożenie materiału przeprowadza się w temperaturze od -5°C do -170°C, korzystnie -80°C, przez okres 2–5 dni, korzystnie 2 dni.
9. Sposób według zastrz. 6 **znamienny tym**, że biomateriał suszy się poprzez liofilizację w czasie 15–30 godzin, korzystnie 19–26 godzin.
10. Sposób według zastrz. 6 **znamienny tym**, że sterylizację suchego materiału prowadzi się tlenkiem etylenu (55°C) przez 3 godziny.