

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **240725**
(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **437235**

(22) Data zgłoszenia: **08.03.2021**

(51) Int.Cl.

A61L 27/12 (2006.01)

A61L 27/20 (2006.01)

A61L 27/22 (2006.01)

A61L 27/54 (2006.01)

A61L 27/58 (2006.01)

(54) **Biomateriał na bazie naturalnego polisacharydu – β -1,3-glukanu (kurdlanu) i ceramiki do zastosowań w inżynierii tkankowej kości oraz sposób jego otrzymywania**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
13.12.2021 BUP 37/21

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
23.05.2022 WUP 21/22

(73) Uprawniony z patentu:

**UNIwersytet Medyczny w Lublinie,
Lublin, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

**KATARZYNA KLIMEK, Lublin, PL
GRAŻYNA GINALSKA, Lublin, PL**

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Anna Bełz

PL 240725 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest trójskładnikowy biomateriał złożony z naturalnego polisacharydu – β -1,3-glukanu (kurdlanu), izolatu białka serwatkowego (WPI) oraz ceramiki hydroksyapatytowej (HAp) do zastosowań w inżynierii tkankowej kości oraz sposób jego otrzymywania.

Kość jest tkanką łączną, która charakteryzuje się dużą sztywnością i twardością. Posiada ona także zdolność do regeneracji, bowiem ulega nieustannym procesom przebudowy, które umożliwiają naprawę uszkodzonych mikrofragmentów (Taichman, Blood 2005, 105, 2631–2639; Roberts i wsp., Semin. Ortop. 2004, 10, 123–161). Jednak w przypadku większych ubytków kostnych, powstających w skutek złamań, urazów, chorób nowotworowych czy osteoporozy, naturalne procesy regeneracyjne są niewystarczające i należy zastąpić/uzupełnić uszkodzony/brakujący fragment tkanki, wykorzystując odpowiedni materiał implantacyjny (Dimitriou i wsp., BMC Medicine 2011, 9, 66; Nandi i wsp., Indian J. Med. Res. 2010, 132, 15–30; O'Brien, Mater. Today 2010, 14, 88–95). W inżynierii tkankowej kości istnieje trend do wytwarzania biomateriałów o budowie zbliżonej do kości, która jest naturalnym kompozytem składającym się z fazy mineralnej ($\geq 60\%$), fazy organicznej (20–40%) oraz wody i tłuszczu (3–10%). Dlatego też ogromną uwagę przywiązuje się do biomateriałów kompozytowych, które najczęściej tworzone są przez połączenie materiałów ceramicznych (odpowiednik fazy mineralnej kości) oraz polimerów (odpowiednik fazy organicznej kości) (Clarke, Clin. J. Am. Soc. Nephrol. 2008, 3, S131–S139; Bose i wsp. Trends Biotechnol. 2012, 30, 546–554; Velasco i wsp. BioMed Res. Int. 2015, 2015).

Oprócz odpowiedniej kompozycji, biomateriały implantacyjne muszą wykazywać korzystne właściwości strukturalne, mechaniczne i biologiczne. Zatem, powinny one charakteryzować się porowatością, dużą wytrzymałością mechaniczną i przy tym wykazywać dobrą poręczność chirurgiczną. Ponadto, takie biomateriały nie mogą wykazywać cytotoksyczności, genotoksyczności, immunogenności czy mutagenności w organizmie pacjenta. Powinny one być także biokompatybilne, osteokondukttywne i osteoindukttywne (O'Brien, Mater. Today 2010, 14, 88–95; Polo-Corrales i wsp., J. Nanosci. Nanotechnol. 2014, 14, 15–56; Williams, Biomaterials 2008, 29, 2941–2953; Velasco i wsp. BioMed Res. Int. 2015, 2015; Bose i wsp. Trends Biotechnol. 2012, 30, 546–554; A1brektsson i Johansson, Eur. Spine. J. 2001, 10, S96–S101).

Znanym rozwiązaniem w regeneracji tkanki kostnej jest stosowanie biokompatybilnych kompozytów składających się z ceramiki oraz polimerów pochodzenia naturalnego i/lub syntetycznego. Dla przykładu, z opisu patentowego CN109251352A znany jest biomateriał na bazie alkoholu poliwinylowego, alginianu sodu oraz hydroksyapatytu, który dedykowany jest do regeneracji ubytków kostnych i wykazuje porowatą strukturę oraz sprzyja adhezji i proliferacji komórek. Z opisu patentowego US2006172918A1 znany jest biomateriał kompozytowy zawierający kolagen, alginian oraz hydroksyapatyt. Wynalazek posiada parametry mechaniczne zbliżone do naturalnej kości, charakteryzuje się zdolnością do przystosowania biologicznego, a ponadto wykazuje właściwości osteokondukttywne (badania na szczurach z ubytkiem w kości udowej). Z kolei, z opisu patentowego US2014314824A1 znany jest porowaty biomateriał na bazie chitozanu, amylopektyny oraz hydroksyapatytu.

Biomateriał jest biodegradowalny w warunkach *in vitro*, nie wykazuje cytotoksyczności, a także wspiera proliferację i proces różnicowania ludzkich osteoblastów (badania z wykorzystaniem linii komórkowej MG-63, wyprowadzonej z ludzkiej osteosarkomy).

Z przeglądu baz patentowych oraz z powyższych opisów patentowych wynika, że nie ma obecnie biomateriałów na bazie bakteryjnego β -1,3-glukanu (kurdlanu), izolatu białka serwatkowego (WPI) oraz ceramiki hydroksyapatytowej. Wiadomo jednak, że hydrożel β -1,3-glukanowy (kurdlanowy) otrzymywany metodą termiczną znalazł zastosowanie jako składnik substytutu kostnego na bazie ceramiki hydroksyapatytowej (Patent PL 206394 i EP 2421570). Z kolei, hydrożel kurdlanowy, otrzymywany metodą dializy względem roztworu jonów wapnia znalazł zastosowanie jako składnik biokompatybilnego ceramiczno-polimerowego rusztowania kostnego (Patent PL 229329 B1). Ponadto, znany jest hydrożel na bazie izolatu 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).

Wynalazek rozwiązuje zagadnienie otrzymywania biomateriału na bazie β -1,3-glukanu (kurdlanu), izolatu białka serwatkowego (WPI) oraz ceramiki hydroksyapatytowej (HAp), charakteryzującego się brakiem cytotoksyczności oraz biokompatybilnością w warunkach *in vitro*, poprzez wspieranie

wzrostu oraz proliferacji osteoblastów ludzkich (linia hFOB 1.19, ATCC), mającego zastosowanie w inżynierii tkankowej kości.

Biomateriał na bazie naturalnego polisacharydu – β -1,3-glukanu (kurdlanu) oraz ceramiki hydroksyapatytowej (HAp) charakteryzuje się tym, że zawiera komponent białkowy – izolat białka serwatkowego (WPI) w ilości 20–50% (w/v), korzystnie 35% (w/v), zaś pozostałe składniki jak β -1,3-glukan (kurdlan) oraz ceramika hydroksyapatytowa (HAp) występują w ilości: β -1,3-glukan (kurdlan) od 6 do 20% (w/v), korzystnie 8% (w/v), ceramika hydroksyapatytowa (HAp) od 10 g do 180 g, w odniesieniu do 100 ml wodnego roztworu.

Biomateriał korzystnie jest wysterylizowany.

Sposób wytwarzania biomateriału według wynalazku polega na tym, że 20–50% (w/v) roztwór izolatu białka serwatkowego (WPI), korzystnie 35% (w/v), przygotowuje się w wodzie destylowanej i dodaje się do proszku β -1,3-glukanu (kurdlanu), tak aby stężenie kurdlanu względem 100 ml roztworu WPI wynosiło 6–20% (w/v), korzystnie 8% (w/v). Następnie do takiej mieszaniny dodaje się ceramikę hydroksyapatytową (HAp) w postaci nanoproszku, proszku lub granul o wielkości 0,1–1,0 mm, wypalanych w temperaturze 500–1300°C w ilości 10 g – 180 g na 100 ml roztworu kurdlan-WPI, korzystnie 160 g granul o wielkości 0,3–0,6 mm, wypalanych w temperaturze 1100–1200°C. Otrzymaną pastę umieszcza się w formach i inkubuje przez 15 minut w temperaturze 90–120°C, korzystnie 90°C. Taki biomateriał, może być następnie wysterylizowany poprzez autoklawowanie i wykorzystywany w formie mokrej. Otrzymany kompozyt kurdlan-WPI-HAp może być także poddany suszeniu w temperaturze pokojowej (na powietrzu), a następnie przeznaczony do sterylizacji gazowej z wykorzystaniem tlenu etylenu.

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

Korzystnie jest, gdy sterylizację suchego biomateriału prowadzi się tlenkiem etylenu (55°C) przez około 3 godziny.

Wytworzony wg wynalazku biomateriał na bazie kurdlanu, WPI i ceramiki hydroksyapatytowej (HAp) charakteryzuje się korzystnymi właściwościami biologicznymi względem ludzkich osteoblastów hFOB 1.19 w warunkach *in vitro*. Korzystne właściwości biologiczne biomateriału, tj. zdolność do wspierania żywotności i proliferacji osteoblastów linii hFOB 1.19, wynikają z jego kompozycji – szczególnie dzięki obecności izolatu białka serwatkowego (WPI).

Połączenie polimerów w postaci β -1,3-glukanu (kurdlanu) i białka serwatkowego (WPI) oraz ceramiki hydroksyapatytowej (HAp) w odpowiednich proporcjach przyniosło poszukiwane efekty w regeneracji tkanki kostnej. Ilości składników, sposób i kolejność ich łączenia pozwalają uzyskać materiał kompozytowy o zwartej strukturze, mający właściwości regeneracyjne.

Jak się nieoczekiwanie okazało składniki te wzajemnie się uzupełniają, gdyż tworzony przez β -1,3-glukan (kurdlan) nietoksyczny i sprężysty żel jest doskonałym lepiszczem dla sypkiej ceramiki hydroksyapatytowej (HAp), zaś dodatek białka serwatkowego (WPI) wzmacnia właściwości biologiczne biomateriału, poprzez przyspieszanie wzrostu i proliferacji ludzkich komórek kościotwórczych (hFOB 1.19). Połączenie w/w trzech składników pozwala na otrzymanie kompozytu, który charakteryzuje się wysoką biokompatybilnością w warunkach *in vitro* (poprzez zwiększanie żywotności oraz proliferacji osteoblastów ludzkich). Tworzy on zatem biomateriał nadający się do zastosowań w inżynierii tkankowej kości. Nikt dotąd nie ujawnił w stanie techniki biomateriału kompozytowego o składzie, jak w przedmiotowym wynalazku.

Przedmiot wynalazku ilustrują przedstawione poniżej przykłady.

Przykład 1

Do 3,5 g izolatu białka serwatkowego (WPI) dodano 10 ml wody destylowanej. Składniki mieszano, aż do całkowitego rozpuszczenia WPI. Otrzymany klarowny roztwór WPI dodano do 0,8 g kurdlanu i mieszano aż do połączenia składników. Następnie, dodano 16 g granul hydroksyapatytu o wielkości 0,3–0,6 mm, wypalanych w temperaturze 1200°C. Otrzymaną pastę umieszczono w próbkach typu Eppendorf o pojemności 2 ml i poddano inkubacji w temperaturze 90°C przez 15 minut. Otrzymane biomateriały wyjęto z próbek, pocięto na walce o średnicy 1 cm i wysokości 1 cm, a następnie suszono w temperaturze pokojowej przez okres 24 godzin. Sterylizację otrzymanych próbek przeprowadzono za pomocą tlenu 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 właściwości, tj. nie wykazują cytotoksyczności i wspierają proliferację osteoblastów.

Przykład 2

Do 4 g izolatu białka serwatkowego (WPI) dodano 10 ml wody destylowanej. Składniki miesza-
no, aż do całkowitego rozpuszczenia WPI. Otrzymany klarowny roztwór WPI dodano do 0,8 g kurdla-
nu i mieszano aż do połączenia składników. Następnie, dodano 14 g proszku hydroksyapatytowego.
Otrzymaną pastę umieszczono w probówkach typu Eppendorf o pojemności 2 ml i poddano inkubacji
w temperaturze 90°C przez 15 minut. Otrzymane biomateriały wyjęto z probówek, pocięto na walce
o średnicy 1 cm i wysokości 3 cm, a następnie poddano sterylizacji z użyciem autoklawu (121°C przez
15 minut). Przygotowane w ten sposób biomateriały wykazują korzystne właściwości, tj. nie wykazują
cytotoksyczności i wspierają proliferację osteoblastów.

Przykład 3

Do 4 g izolatu białka serwatkowego (WPI) dodano 10 ml wody destylowanej. Składniki miesza-
no, aż do całkowitego rozpuszczenia WPI. Otrzymany klarowny roztwór WPI dodano do 0,7 g kurdla-
nu i mieszano aż do połączenia składników. Następnie, dodano 16 g nanoproszku hydroksyapatyto-
wego. Otrzymaną pastę umieszczono w probówkach typu Eppendorf o pojemności 2 ml i poddano
inkubacji w temperaturze 90°C przez 20 minut. Otrzymane biomateriały wyjęto z probówek, pocięto
na krążki o średnicy 1 cm i wysokości 3 mm, a następnie suszono w temperaturze pokojowej przez
okres 24 godzin. Sterylizację otrzymanych próbek przeprowadzono za pomocą tlenu 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 właściwości,
tj. nie wykazują cytotoxyczności i wspierają proliferację osteoblastów.

Przykład 4

Do 2 g izolatu białka serwatkowego (WPI) dodano 10 ml wody destylowanej. Składniki miesza-
no, aż do całkowitego rozpuszczenia WPI. Otrzymany klarowny roztwór WPI dodano do 0,8 g kurdla-
nu i mieszano aż do połączenia składników. Następnie, dodano 16 g granul hydroksyapatytu o wielko-
ści 0,3–0,6 mm, wypalanych w temperaturze 1150°C. Otrzymaną pastę umieszczono w probówkach
typu Eppendorf o pojemności 2 ml i poddano inkubacji w temperaturze 90°C przez 20 minut. Otrzy-
mane biomateriały wyjęto z probówek, pocięto na walce o średnicy 1 cm i wysokości 3 cm, a następ-
nie poddano sterylizacji z użyciem autoklawu (121°C przez 15 minut.) Przygotowane w ten sposób
kompozyty wykazują korzystne właściwości, tj. nie wykazują cytotoxyczności i wspierają prolifera-
cję osteoblastów.

Wyniki badań dla biomateriału kurdlan (8% w/v) – WPI (35% w/v) – granule HAp o rozmiarze
0,3–0,6 mm, wypalane w temperaturze 1150°C (160 g granul HAp na 100 ml roztworu kurdlan-WPI)
wytworzonego według wynalazku porównano z wynikami dla biomateriału bez dodatku WPI, tj. kurdlan
(8% w/v) – granule HAp o wielkości 0,3–0,6 mm, wypalane w temperaturze 1150°C (160 g granul HAp
na 100 ml roztworu kurdlanu). Otrzymane rezultaty przedstawiono w **Tabeli 1**.

Tabela 1

Wybrane właściwości biomateriału kurdlan-WPI-HAp wytworzonego według wynalazku oraz biomateriału kurdlan-HAp (biomateriał porównawczy wytworzony według analogicznej procedury).

Cecha	Biomateriał kurdlan-WPI-HAp wytwarzany według wynalazku	Biomateriał kurdlan-HAp (materiał porównawczy)
Cytotoksyczność względem komórek kościotwórczych hFOB 1.19 (osteoblastów ludzkich pozyskanych z ATCC). Wyniki uzyskano w teście pośrednim z wykorzystaniem ekstraktów pozyskanych z biomateriałów, zgodnie z normą ISO 10993-5: Biological evaluation of medical devices – Part 5: Tests for <i>in vitro</i> cytotoxicity. Rezultaty przedstawiono jako wartości średnie $\pm$ odchylenie standardowe po 48-godz. inkubacji ekstraktów z komórkami (test MTT). Biomateriał uznaje się za nietoksyczny, jeżeli nie obniża on żywotności komórek poniżej 70% w porównaniu do komórek kontrolnych (inkubowanych z ekstraktem kontrolnym – czystym płynem hodowlanym inkubowanym w tych samych warunkach co biomateriały). Biomateriał uznaje się za wspierający żywotność komórek, jeśli ich żywotność wynosi powyżej 100% w porównaniu do komórek kontrolnych (inkubowanych z ekstraktem kontrolnym – czystym płynem hodowlanym inkubowanym w tych samych warunkach co biomateriały).	Brak działania cytotoksycznego, a także wpieranie żywotności osteoblastów Żywotność równa $122,27 \pm 5,66$ % w porównaniu do komórek kontrolnych.	Brak działania cytotoksycznego, bez widocznego wspierania żywotności osteoblastów Żywotność równa $85,42 \pm 5,37$ % w porównaniu do komórek kontrolnych.
Żdolność do wspierania procesów proliferacji osteoblastów ludzkich hFOB 1.19 w kontakcie bezpośrednim <i>in vitro</i>. Żdolność tą oceniono poprzez barwienie cytoszkieletu (barwnik – falloidyna) oraz jąder komórkowych (barwnik – Hoechst33342) po 3- i 6- dniach od inokulacji ludzkich osteoblastów na biomateriałach. - Ilość komórek - Rozmieszczenie komórek	Tak, obserwacje mikroskopowe wykazały, że liczba osteoblastów ludzkich rosnących na biomateriale kurdlan-WPI-HAp wzrastała w czasie. Zarówno po 3- jak i po 6- dniach inkubacji, komórki były dobrze rozplaszczone, miały podłużny kształt i posiadały duże jądra oraz rozbudowany system cytoszkieletu. - Większa - Zarówno na granulach HAp, jak również na macierzy kurdlan-WPI	Tak, obserwacje mikroskopowe wykazały, że liczba osteoblastów ludzkich rosnących na biomateriale kurdlan-HAp wzrastała w czasie. Zarówno po 3- jak i po 6- dniach inkubacji, komórki były dobrze rozplaszczone, miały podłużny kształt i posiadały duże jądra oraz rozbudowany system cytoszkieletu. - Mniejsza - Preferencyjnie na granulach HAp. Pojedyncze komórki na macierzy kurdlanowej.

Przedstawione w Tabeli 1. wyniki wskazują, że wytworzony wg wynalazku biomateriał kurdlan-WPI-HAp, wykazuje poszukiwane właściwości biologiczne względem ludzkich komórek kościotwórczych (linia hFOB 1.19 pozyskana z Amerykańskiej Kolekcji Kultur Komórkowych (ATCC)). Rezultaty te sugerują także, że dodatek WPI do biomateriału na bazie kurdlanu i ceramiki jest wysoce korzystny, gdyż tak suplementowany biomateriał nie tylko wspiera żywotność osteoblastów, ale także wzmacnia ich proliferację w czasie. Wynalazek może zatem znaleźć zastosowanie jako biomateriał implantacyjny w celu regeneracji niewielkich ubytków kostnych oraz jako rusztowanie kostne do zastosowań w terapii *ex vivo*, tj. jako biomateriał, który będzie wstępnie zasiedlany, komórkami osteoprogenitorowymi pobranymi od pacjentów, a następnie implantowany do ich organizmu.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania biomateriału na bazie naturalnego polisacharydu – β -1,3-glukanu (kurdlanu), oraz ceramiki hydroksyapatytowej (HAp), **znamienny tym**, że 20–50% (w/v) roztwór izolatu białka serwatkowego (WPI), korzystnie 35% (w/v), przygotowuje się w wodzie destylowanej i dodaje się do proszku β -1,3-glukanu (kurdlanu), tak aby stężenie kurdlanu względem 100 ml roztworu WPI wynosiło 6–20% (w/v), korzystnie 8% (w/v), następnie do takiej mieszaniny dodaje się ceramikę hydroksyapatytową (HAp) w postaci nanoproszku, proszku lub granul o rozmiarze 0,1–1,0 mm, wypalanych w temperaturze 500–1300°C, w ilości 10–180 g, tak otrzymany biomateriał inkubuje od 1 do 60 minut, korzystnie 15 minut w temperaturze 90–120°C, korzystnie 90°C.
2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że stosuje się 160 g granul o wielkości 0,3–0,6 mm w odniesieniu do 100 ml roztworu kurdlan-WPI.
3. Sposób według zastrz. 1 i 2, **znamienny tym**, że granule wypalane są w temperaturze 1100–1200°C.
4. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że otrzymany biomateriał poddaje się sterylizacji.
5. Sposób według zastrz. 4, **znamienny tym**, że sterylizację mokrego materiału prowadzi się poprzez autoklawowanie.
6. Sposób według zastrz. 5, **znamienny tym**, że autoklawowanie prowadzi się w temperaturze 121°C przez 15 minut.
7. Sposób według zastrz. 4 **znamienny tym**, że sterylizację suchego biomateriału prowadzi się tlenkiem etylenu (55°C) do 3 godzin.
8. Biomateriał na bazie naturalnego polisacharydu – β -1,3-glukanu (kurdlanu) oraz ceramiki hydroksyapatytowej (HAp), **znamienny tym**, że zawiera komponent białkowy – izolat białka serwatkowego (WPI) w ilości 20–50% (w/v), korzystnie 35% (w/v), zaś pozostałe składniki jak β -1,3-glukan (kurdlan) oraz ceramika hydroksyapatytowa (HAp) występują w ilości: β -1,3-glukan (kurdlan) od 6 do 20% (w/v), korzystnie 8% (w/v), ceramika hydroksyapatytowa (HAp) od 10 g do 180 g w odniesieniu do 100 ml wodnego roztworu.
9. Biomateriał według zastrz. 8, **znamienny tym**, że jest wysterylizowany.