

RZECZPOSPOLITA  
POLSKA



Urząd Patentowy  
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL** (11) **236858**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **426820**

(51) Int. Cl.

**A61F 2/28 (2006.01)**

**A61L 27/32 (2006.01)**

(22) Data zgłoszenia: **27.08.2018**

(54)

**Sposób hydrofilizacji polilaktydowego substytutu kości gąbczastej**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

**09.03.2020 BUP 06/20**

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

**22.02.2021 WUP 04/21**

(73) Uprawniony z patentu:

**POLITECHNIKA WARSZAWSKA,  
Warszawa, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

**AGNIESZKA GADOMSKA-GAJADHUR,  
Warszawa, PL**

**MONIKA BUDNICKA, Warszawa, PL**

**PAWEŁ RUŚKOWSKI, Wołomin, PL**

**LUDWIK SYNORADZKI, Warszawa, PL**

**MONIKA SZYMANIAK, Wistka, PL**

**MICHAŁ WRZECIONEK, Kielce, PL**

(74) Pełnomocnik:

**rzecz. pat. Iwona Płodzich-Hennig**

**PL 236858 B1**

## Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób hydrofilizacji polilaktydowego substytutu kości gąbczastej.

Powszechnie stosowanym leczeniem dużych ubytków kości jest przeszczep, polegający na pobraniu części tkanki i umieszczeniu go w miejscu defektu. Wspomniane leczenie, pomimo powszechnej praktyki, niesie ze sobą ryzyko zakażenia miejsca przeszczepu, krwotoku lub uszkodzenia nerwów. Dlatego zamiast transplantacji żywych narządów wykorzystuje się substytuty, takie jak biokompatybilne metale, ceramikę i polimery [1, 2]. Polimery posiadają właściwości sprężyste i cierne, które zbliżają je do właściwości tkanki stawów maziowych, dlatego szybko zyskały szeroką akceptację chirurgów. Dodatkowo implanty polimerowe cechuje mała masa. Obecnie najczęstszym zastosowaniem polimerów w ortopedii jest alloplastyka stawów. Szeroko stosowanym poliestrem w inżynierii tkankowej jest polilaktyd (PLA) [3]. Degraduje on w organizmie w przewidywalny sposób, co pozwala na kontrolowaną regenerację kości. PLA ulega degradacji w wyniku hydrolizy i jest wydalany w naturalnych procesach fizjologicznych [4, 5]. Dzięki stopniowej degradacji implantu polilaktydowego z czasem coraz większe obciążenie jest przenoszone na kość. Dzięki temu nowo odbudowana kość jest mocniejsza.

Implanty kostne muszą spełniać szereg wymagań. Podstawowymi wymaganiami są nietoksyczność, efektywność (funkcjonalność, wydajność, trwałość w warunkach użytkowania), możliwość poddania sterylizacji. Istotną jest biogodność implantu polegająca na podtrzymywaniu aktywności komórkowej bez wywoływania lokalnej lub systemowej reakcji immunologicznej organizmu. Pożądaną cechą jest biodegradowalność, to znaczy rozkład materiału implantu do nietoksycznych produktów, wydalanych z organizmu. Czas degradacji substytutu zależy od jego zastosowania oraz indywidualnych cech pacjenta. Specyficznym wymaganiom, zależnym od typu regenerowanej tkanki, podlegają właściwości mechaniczne, morfologia wewnętrzna (porowatość otwarta, rozmiar i kształt porów), wymiar implantu. W przypadku implantów kości gąbczastej istotną jest duża porowatość (>80%), wielkość porów w zakresie 200–350  $\mu\text{m}$  i struktura połączonych porów. Wymagania określone dla danej tkanki można osiągnąć nie tylko poprzez dobór materiału implantu, ale wybór odpowiedniej metody wytwarzania.

Testy biologiczne materiałów poliestrowych (w tym polilaktydu) ujawniły, że są one w przeważającej części biologicznie obojętne. Brak interakcji jest pożądanym z perspektywy immunologicznej, jednakże ten sam brak bioaktywności wymaga dodatkowego zabiegu w celu integracji biologicznie obojętnej implantu z twardą tkanką pacjenta [6]. Poprawę bioaktywności powierzchni materiałów polimerowych można osiągnąć poprzez modyfikację mechaniczną, fizyczną lub chemiczną, czy użycie cementu kostnego.

W ortopedii zaczęto stosować bioaktywne powłoki wapniowo-fosforanowe (CaP) w celu zapewnienia sprzyjającego otoczenia do wzrostu kości na powierzchni wszczepów oraz wzmocnienia integracji twardej tkanki z implantami ortopedycznymi [6]. Jedną z metod osadzania powłok CaP jest metoda biomimetyczna, oparta na naturalnych procesach zachodzących podczas mineralizacji kości.

Metoda biomimetyczna została opisana m.in. w opisie patentowym US6344061 (B1). Autorzy kładli nacisk na uzyskanie określonej chropowatości powierzchni implantu. Podkreślano, że chropowatość powierzchni podłoża jest krytycznym czynnikiem pozwalającym na uzyskanie odpowiedniego implantu. Implant o pożądanej fizycznej topografii może być następnie powlekany *in vitro* warstwą fosforanu wapnia lub środkami biologicznie aktywnymi. Ujawniony proces jest bardzo czasochłonny. Polega na zanurzeniu implantu w symulowanym płynie ustrojowym w temperaturze 37°C przez 14 dni w oddzielnych pojemnikach z polietylenu. Płyn jest wymieniany co 48 godzin w celu ułatwienia dalszego zarodkowania i wzrostu kryształów soli.

Proces biomimetyczny opisano również w zgłoszeniach patentowych US2017326272 (A1) oraz WO2008066613 (A2). Zgodnie z tym ostatnim rozwiązaniem przygotowuje się przesycony roztwór fosforanu wapnia, implant zawieszają w tym roztworze na 36–84 godzin, odświeżając roztwór co 8–24 godzin. Następnie spłukuje się roztwór z zewnętrznej powierzchni implantu za pomocą wody dejonizowanej i suszy się powierzchnię w 50–100°C, przez 10–15 minut. Stosowany zgodnie z WO2008066613 przesycony roztwór fosforanu wapnia otrzymuje się mieszając dwa roztwory:  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  oraz  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  w stosunku objętościowym 1:1, a w stosunku molowym od 1,3 do 2,0. Następnie podnosi się pH roztworu z 3,2 do około 5,8–7,45 za pomocą buforu TRIS. Zanurzanie implantu w przesyconym roztworze fosforanowo-wapniowym może być realizowane trzema sposobami. W pierwszym sposobie umieszcza się implant w zlewce, pod kątem 65–70 stopni. Drugi sposób realizowano również w zlewce pokrytej parafilmem. Pionową pozycję implantu wymuszano przez zastosowanie metalowych zaczepów przymocowanych zarówno do implantu, jak i parafilmu pokrywającego zlewkę albo przez metalowe

klipsy utrzymujące implanty w pionie. Trzeci sposób polegał na zastosowaniu klipsów specjalnie skonstruowanych tak, aby próbki były ustawione pionowo, w równych odstępach, w jednym naczyniu.

Opisany wyżej proces dotyczył osadzania powłoki CaP na zewnętrznej powierzchni implantu. Jednak powłoki CaP często są wytwarzane na implantach o złożonej geometrii (śruby, międzytrzonowe, itp.), co skutkuje niejednorodnością pod względem pokrycia podłoża i grubości powłoki. Ponadto ważne jest to, aby uzyskana powłoka posiadała morfologię w jak największym stopniu zbliżoną do naturalnej kości.

Celem wynalazku było rozwiązanie wyżej zdefiniowanych problemów.

Sposób hydrofilizacji polilaktydowego substytutu kości gąbczastej według wynalazku charakteryzuje się tym, że sporządza się roztwór bezwodnej soli wapnia, wybranej spośród chlorku, bromku, jodku lub azotanu wapnia, o stężeniu jonów wapnia co najmniej 2,5 mM oraz roztwór bezwodnego wodorowęglanu sodu lub potasu i uwodnionego ortofosforanu (V) sodu o stężeniu jonów wodorowęglanowych co najmniej 18 mM oraz jonów ortofosforanowych (V) co najmniej 2,5 mM, przy czym oba roztwory sporządza się w wodnym buforze HEPES/sól sodowa lub potasowa HEPES o stężeniu 0,1–1 M oraz pH w zakresie 6–8. Każdy z roztworów miesza się oddzielnie w temperaturze 30–45°C przez 10–30 min. Następnie oba roztwory łączy się w stosunku molowym Ca do P jak 1:1 i miesza w temperaturze 30–45°C przez 20–40 min. Następnie połączonym roztworem zalewa się implant umieszczony w formie cylindrycznej z zakręcanym wieczkiem i stożkowym dnem, przy czym stosuje się implant uprzednio nasączony alkoholem C<sub>1</sub>–C<sub>3</sub>, po czym formę wytrząsa się w temperaturze 30–45°C, przy obrotach 100–200 rpm, przez 1–5 dni. Następnie implant suszy się próżniowo w temperaturze 30–45°C przez 8–24 h.

Korzystnie implant obciąża się ciężarkiem tak, by cały implant zanurzył się w roztworze.

Korzystnie stosuje się implant nasączony alkoholem w czasie 20–60 minut, w warunkach próżni lub pod ciśnieniem atmosferycznym.

W sposobie według wynalazku, w porównaniu z metodą opisaną w zgłoszeniu patentowym nr WO2008066613, nie stosuje się przesyconego roztworu CaP, a stosunek molowy i stężenia jonów Ca i P w roztworze są zbliżone do stężenia tych jonów w osoczu człowieka, dzięki czemu uzyskuje się powłokę CaP o morfologii zbliżonej do kości naturalnej. Uzyskaniu składu zbliżonego do osocza sprzyja także użycie bezwodnych soli jako prekursorów do wytworzenia roztworów. Kolejną cechą sposobu według wynalazku jest to, że pH każdego roztworu ustala się oddzielnie, a następnie łączy się roztwory o już ustalonym pH. Istotne jest także użycie bufora HEPES, który jest bardziej obojętny w porównaniu ze stosowanym w podobnych metodach buforem TRIS. Bardziej obojętny zakres pH jest właściwy dla płynów fizjologicznych, a ponadto materiał implantu, wrażliwy na degradację w środowisku zasadowym, jest lepiej chroniony. Stożkowa forma typu falcon, w której umieszcza się pojedyncze implanty, sprzyja utrzymaniu pozycji pionowej, a ponadto umożliwia wytrząsanie każdej formy, co powoduje cyrkulację roztworu i omywanie całej próbki. Dzięki temu powłoka osadza się równomiernie zarówno na powierzchni zewnętrznej, jak i wewnętrznej implantu. Dodatkowo, wcześniejsze nasączenie implantu alkoholem sprzyja intensyfikacji procesu, dzięki czemu zachodzi on z większą wydajnością i nie jest konieczna wymiana roztworu w czasie całego procesu w celu zwiększenia stężenia soli wapnia i fosforu.

W wyniku procesu przeprowadzonego zgodnie z wynalazkiem uzyskuje się powłokę fosforanowo-wapniową na powierzchni implantu polilaktydowego. Powłoka składa się z kryształów przyjmujących formy od zbitych, litych wielokątów do form przypominających igły. Powierzchnia implantów polilaktydowych po procesie opisanym w wynalazku jest bardziej hydrofilowa w stosunku do samego polilaktydu i sprzyja regeneracji kości gąbczastej. Proces według wynalazku naśladuje naturalne procesy mineralizacji kości zachodzące podczas jej regeneracji. W wyniku zwiększenia wydajności sole nieorganiczne pokrywają również wnętrze porowatej struktury polilaktydowej. Pory we wnętrzu implantu po hydrofilizacji mogą być zasiedlane przez namnażające się komórki. Dzięki obecności fosforanów wapnia stwarza się warunki bardziej zbliżone do naturalnych. We wnętrzu implantu po hydrofilizacji można umieścić osocze bogatopłytkowe w celu poprawienia regeneracji kości. W rezultacie komórkom są dostarczane niezbędne do wzrostu substancje odżywcze poprzez kontrolowane i stopniowe ich uwalnianie ze struktury implantu wraz z postępującą hodowlą. Otrzymane implanty po hydrofilizacji charakteryzują się porowatością otwartą 80–95% oraz nasiąkliwością względem izopropanolu 200–1400%. Nasiąkliwość względem osocza końskiego wynosi 350–1750%.

Sposób według wynalazku został bliżej przedstawiony w przykładach.

Na Fig. 1 przedstawiono obraz SEM implant polilaktydowego poddany procesowi hydrofilizacji według wynalazku (po lewej) oraz schematyczny rysunek miejsc poboru próbek do analizy SEM (po prawej).

Na Fig. 2 przedstawiono obrazy SEM form krystalicznych soli osadzających się na różnych powierzchniach przestrzennego porowatego implantu polilaktydowego.

#### Przykład 1

Roztwór do hydrofilizacji: do kolby miarowej 100 ml odważono 23,8 g (0,1 mol) kwasu HEPES, dodano ok. 75 ml wody destylowanej. Zamknięto kolbę korkiem i intensywnie mieszano. Po rozpuszczeniu całego kwasu dodawano porcjami (np. po 1 ml) 3,5 ml 10 M NaOH. Po każdej dodanej porcji intensywnie mieszano zawartość kolby i kontrolowano pH przy pomocy pehametru. Kolbę uzupełniono wodą destylowaną do kreski. Finalnie pH buforu doprowadzono do 7,2. Do 50 ml kolby miarowej odważono 0,028 g ( $2,5 \cdot 10^{-4}$  mol)  $\text{CaCl}_2$ . Do drugiej kolby 50 ml odważano 0,151 g ( $1,8 \cdot 10^{-3}$  mol)  $\text{NaHCO}_3$  i 0,095 g ( $2,5 \cdot 10^{-4}$  mol)  $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ . Obydwie kolby uzupełniono do kreski przygotowanym buforem HEPES. Roztwory w kolbach mieszano przez 10 minut w temperaturze  $37^\circ\text{C}$  przy użyciu mieszadła magnetycznego, łaźni wodnej oraz elementu mieszającego (szybkość mieszania  $200 \text{ min}^{-1}$ ). Następnie zawartość obu kolb umieszczono w kolbie stożkowej o pojemności 150 ml i mieszano 20 minut w temperaturze  $37^\circ\text{C}$  z szybkością  $500 \text{ min}^{-1}$ .

Implant polilaktydowy umieszczono w ampule próżniowej o pojemności 100 mL. Następnie do ampuly wprowadzono 25 ml izopropanolu. Zamontowano nasadkę dwudrożną i zamknięto dopływ powietrza. Zastosowano chłodzenie ampuly, w tym celu umieszczono ją za pomocą łapy i stojaka w łaźni składającej się z mieszaniny suchego lodu z acetonem. W ampule utrzymano warunki próżni przez 30 minut za pomocą pompy olejowej.

Proces hydrofilizacji: implant polilaktydowy umieszczono się w formy cylindrycznej z zakręcanym wieczkiem i stożkowym dnem (typu falcon), o objętości 50 ml. Do formy wiano 50 ml przygotowanego uprzednio roztworu do hydrofilizacji. Implant obciążono podłużnym elementem, aby cały implant zanurzył się w roztworze. Formę zakręcono i zabezpieczono parafilmem na gwincie. Tak przygotowany implant nasączano roztworem przy użyciu wytrząsarki w temperaturze  $37^\circ\text{C}$ , z szybkością  $185 \text{ min}^{-1}$ . Po upływie 3 dni implant wyjęto z formy. Następnie implant wysuszono pod zmniejszonym ciśnieniem w temperaturze  $45^\circ\text{C}$  przez 24 h, bądź na powietrzu do stałej masy. Otrzymano się implant polilaktydowy, zawierający kryształy fosforanów wapnia na powierzchni i we wnętrzu porów, jak pokazano na Fig. 1.

#### Przykład 2

Implant polilaktydowy umieszczono w ampule próżniowej o pojemności 100 mL. Następnie do ampuly wprowadzono 25 ml metanolu. Zamontowano nasadkę dwudrożną i zamknięto dopływ powietrza. Zastosowano chłodzenie ampuly, w tym celu umieszczono ją za pomocą łapy i stojaka w łaźni składającej się z mieszaniny suchego lodu z acetonem. W ampule utrzymano warunki próżni przez 30 minut za pomocą pompy olejowej. Po upływie tego czasu nasączony implant wyjęto z ampuly i włożono do formy typu falcon o objętości 50 ml.

Proces hydrofilizacji: implant polilaktydowy umieszczono się w formy cylindrycznej z zakręcanym wieczkiem i stożkowym dnem (typu falcon), o objętości 50 ml. Do formy wiano 50 ml przygotowanego uprzednio jak w Przykładzie 1 roztworu do hydrofilizacji. Implant obciążono podłużnym elementem, aby cały implant zanurzył się w roztworze. Formę zakręcono i zabezpieczono parafilmem na gwincie. Tak przygotowany implant nasączano roztworem przy użyciu wytrząsarki w temperaturze  $30^\circ\text{C}$ , z szybkością  $100 \text{ min}^{-1}$ . Po upływie 5 dni implant wyjęto z formy. Następnie implant wysuszono pod zmniejszonym ciśnieniem w temperaturze  $30^\circ\text{C}$  przez 8 h do stałej masy. Otrzymano się implant polilaktydowy, zawierający kryształy fosforanów wapnia na powierzchni i we wnętrzu porów.

#### Literatura:

- [1] Giannoudis P. V., Dinopoulos H., Tsiridis E. Bone substitutes: An update, *Injury.*, 36 (2005), S20–S27.
- [2] Ficek K., Filipek J., Wojciechowski P., Kopec K., Stodolak-Zych E., Blazewicz S. A bioresorbable polylactide implant used in bone cyst filling, *Journal of Material Sciences: Materials in Medicine.*, 27 (2016), s. 33.
- [3] Ruśkowski P., Gadomska-Gajadur A., Polilaktyd w zastosowaniach medycznych, *Tworzywa sztuczne w przemyśle* 2017, 2, 32–35.
- [4] Barbanti S. H., Santos A. R., Zavaglia C. A., Duek E. A. Porous and Dense Poly(L-Lactic Acid) and Poly(D,L-Lactic Acid-Co-Glycolic Acid) Scaffolds: In Vitro Degradation in Culture Medium and Osteoblasts Culture. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine.*, 15 (2004), 1315–1321.

- [5] Nowak B., Pająk J. Biodegradacja polilaktydu (PLA), *Archiwum Gospodarki Odpadami i Ochrony Środowiska.*, 2010, 12, s. 1–10.
- [6] Paital S. R., Dahotre N. B. Calcium phosphate coatings for bio-implant applications: Materials, performance factors, and methodologies, *Materials Science and Engineering R.*, R66 (2009), s. 1–70.

### Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób hydrofilizacji polilaktydowego substytutu kości gąbczastej, zgodnie z którym polilaktydowy implant zalewa się roztworem fosforanu wapnia w buforze, a następnie suszy się, **znamienny tym**, że sporządza się roztwór bezwodnej soli wapnia, wybranej spośród chlorku, bromku, jodku lub azotanu wapnia, o stężeniu jonów wapnia co najmniej 2,5 mM oraz roztwór bezwodnego wodorowęglanu sodu lub potasu i uwodnionego ortofosforanu (V) sodu o stężeniu jonów wodorowęglanowych co najmniej 18 mM oraz jonów ortofosforanowych (V) co najmniej 2,5 mM, przy czym oba roztwory sporządza się w wodnym buforze HEPES/sól sodowa lub potasowa HEPES o stężeniu 0,1–1 M oraz pH w zakresie 6–8, po czym każdy z roztworów miesza się oddzielnie w temperaturze 30–45°C przez 10–30 min., a następnie oba roztwory łączy się w stosunku molowym Ca do P jak 1:1 i miesza w temperaturze 30–45°C przez 20–40 min., po czym połączonym roztworem zalewa się implant umieszczony w formie cylindrycznej z zakręcanym wieczkiem i stożkowym dnem, przy czym stosuje się implant uprzednio nasączony alkoholem C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>, po czym formę wytrząsa się w temperaturze 30–45°C, przy obrotach 100–200 rpm, przez 1–5 dni, a następnie implant suszy się próżniowo w temperaturze 30–45°C przez 8–24 h.
2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że implant obciąża się ciężarkiem tak, by cały implant zanurzył się w roztworze.
3. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że stosuje się implant nasączony alkoholem w czasie 20–60 minut, w warunkach próżni lub pod ciśnieniem atmosferycznym.

### Rysunki

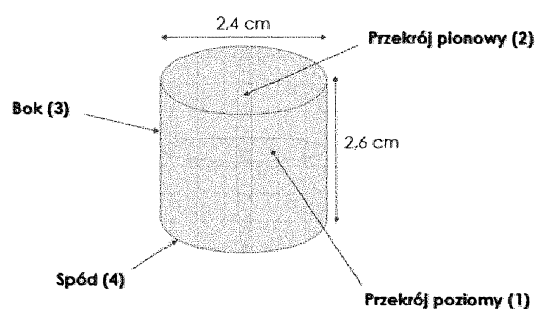
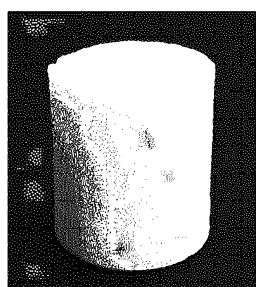


Fig. 1

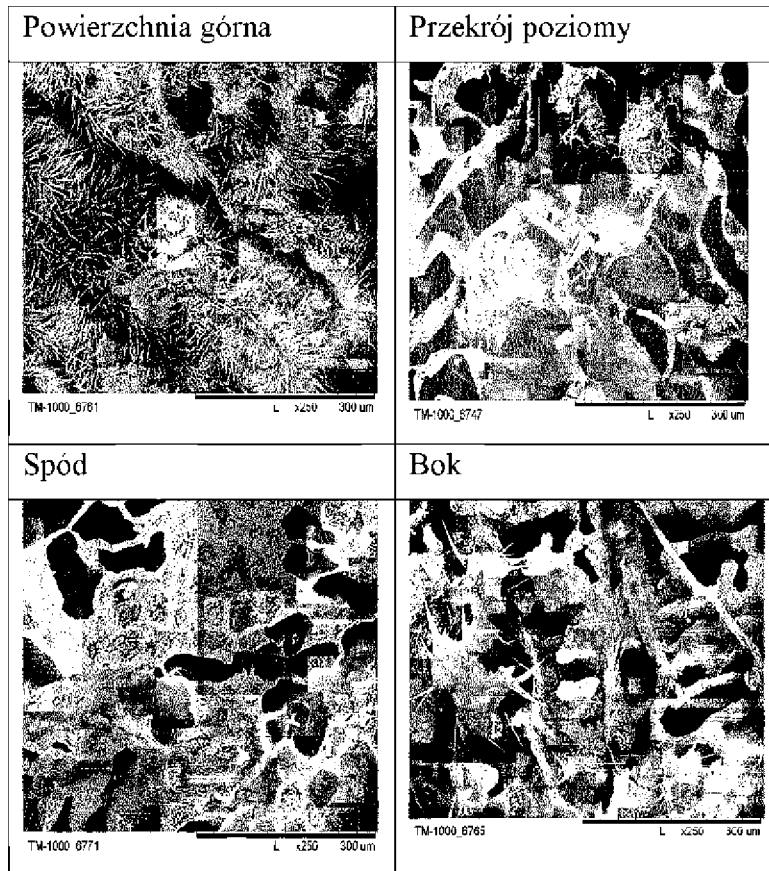


Fig. 2