

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **240639**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **437234**

(22) Data zgłoszenia: **08.03.2021**

(51) Int.Cl.

A61L 27/12 (2006.01)

A61L 27/20 (2006.01)

A61L 27/54 (2006.01)

A61L 27/58 (2006.01)

(54) **Dwufazowy biomateriał na bazie kurdlanu oraz hydroksyapatytu (HAp) oraz sposób jego otrzymywania i jego zastosowanie do regeneracji ubytków chrzęstno-kostnych**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
22.11.2021 BUP 34/21

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
09.05.2022 WUP 19/22

(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**

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Anna Belz

PL 240639 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest biomimetyczny dwufazowy biomateriał na bazie naturalnego polisacharydu β -1,3-glukanu (kurdlanu), zawierający dwie spójne fazy: górną – polimerową, składającą się z kurdlanu i izolatu białka serwatkowego (WPI) oraz dolną – polimerowo-ceramiczną, zawierającą kurdlan, WPI i hydroksyapatyt (HAp). Przedmiotem wynalazku jest także sposób jego otrzymywania oraz zastosowanie do regeneracji ubytków chrzęstno-kostnych.

Ubytki chrzęstno-kostne (IV° wg skali Outerbridge'a) stanowią najpoważniejszy, a zarazem najczęstszy problem wśród pacjentów ortopedycznych. Obejmują one nie tylko warstwy tkanki chrzęstnej, ale także kość podchrzęstną (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). Tkanka chrzęstna znacznie różni się od tkanki kostnej zarówno pod kątem kompozycji jak i właściwości strukturalnych, mechanicznych i biologicznych. Ponadto chrząstka, w przeciwieństwie do kości, charakteryzuje się niewielkimi zdolnościami regeneracyjnymi. W związku z powyższym, stosowanie biomateriałów homogennych może być niewystarczające. Naprawa tak złożonych ubytków z zastosowaniem biomateriałów fazowych/warstwowych, które naśladują zarówno tkankę chrzęstną jak i kostną, daje obecnie najlepsze rezultaty terapeutyczne (Deng C. i wsp. Nanomed. Nanobiotechnol. 2019, e1576; Guarnino V. i wsp. Materials for Biomedical Engineering, Chapter 10, 2019, 297–337; Li X. i wsp. Regen. Biomater. 2015, 2, 221–228).

Znanym rozwiązaniem w regeneracji ubytków chrzęstno-kostnych jest stosowanie biomimetycznych fazowych/warstwowych biomateriałów składających się z polimerów pochodzenia naturalnego i/lub syntetycznego oraz składników nieorganicznych, np. ceramiki fosforanowo-wapniowej, bioszkieł itp. Dla przykładu, z opisu patentowego CN106178126A znany jest dwufazowy biomateriał składający się z fazy górnej, zawierającej fibroinę jedwabiu i chitozan (SF-CS) oraz fazy dolnej, wzbogaconej dodatkowo nanohydroksyapatytem (SF-CS-nHA). Badania *in vivo* wskazują, że biomateriał wytworzony wg wynalazku posiada właściwości regeneracyjne względem tkanki chrzęstnej oraz kostnej (badania na królikach Nowozelandzkich) i zatem może on znaleźć zastosowanie w regeneracji ubytków chrzęstno-kostnych. Z opisu patentowego WO2017118863A1 znany jest biomimetyczny dwufazowy biomateriał, który zawiera kolagen oraz kopolimer kwasu mlekowego i glikolowego (PLGA) (faza górna), oraz kolagen połączony z hydroksyapatytem (HAp), osadzony na podłożu tytanowym (faza dolna). Biomateriał wykazuje właściwości mechaniczne zbliżone do natywnej tkanki chrzęstnej oraz kostnej, a także sprzyja wzrostowi i proliferacji komórek w czasie (badania *in vitro* z wykorzystaniem komórek macierzystych pochodzących ze szpiku kostnego owcy). Ponadto badania *in vivo* potwierdziły integrację skafoldu z chrząstką oraz kością owiec oraz wyżłów włoskich szorstkowłosych (Spinone Italiano), co wskazuje, że biomateriał może znaleźć zastosowanie w regeneracji ubytków chrzęstno-kostnych. Z opisu patentowego US2015110846A1 znany jest dwufazowy biomateriał na bazie nanowłókien złożonych z siarczanu chondroityny oraz kwasu hialuronowego (faza górna) oraz nanowłókien zawierających hydroksyapatyt, β -glicerofosforan oraz β -TCP (faza dolna). Biomateriał sprzyja zasiedleniu i proliferacji ludzkich chondrocytów *in vitro*. Z kolei, z opisu patentowego WO2010084481A1 znany jest trójwarstwowy biomateriał do regeneracji ubytków chrzęstno-kostnych. Warstwa górna biomateriału składa się z kolagenu typu I oraz kolagenu typu II (1 : 1), warstwa pośrednia z kolagenu typu I, kolagenu typu II (1 : 1) oraz hydroksyapatytu, a warstwa dolna wyłącznie z hydroksyapatytu. Skafold ten wspiera proliferację prawidłowych mysich preosteoblastów *in vitro* (linia komórkowa MC3T3-E1).

Z przeglądu baz patentowych oraz powyższych opisów patentowych wynika, że nie ma obecnie biomateriałów fazowych/warstwowych zawierających bakteryjny β -1,3-glukan (kurdlan), izolat białka serwatkowego (WPI) oraz ceramikę hydroksyapatytową. 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 international patent nr EU 2421570 B1). 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 mogą znaleźć zastosowanie w regeneracji tkanki kostnej (patent USA US/2013/0101548 A1, patent USA

US 9,758,558 B2 i international patent nr WO 2011/123760 A2). Warto jednak zaznaczyć, że wspomniane wynalazki są biomateriałami kompozytowymi, w których składniki są rozłożone równomiernie względem siebie – nie ma widocznych faz w ich strukturze.

Przedstawiony wynalazek rozwiązuje zagadnienie otrzymywania dwufazowego biomateriału, składającego się z: fazy górnej – polimerowej, którą stanowi β -1,3-glukan (kurdlanu) i izolat białka serwatkowego (WPI) oraz fazy dolnej – polimerowo-ceramicznej, którą stanowi kurdlan, WPI i hydroksyapatyt (HAp), charakteryzującego się brakiem cytotoksyczności oraz biokompatybilnością w warunkach in vitro, poprzez sprzyjanie wzrostowi oraz proliferacji osteoblastów ludzkich (linia hFOB 1.19, ATCC).

Dwufazowy biomateriał według wynalazku stanowi β -1,3-glukan (kurdlan), izolat białka serwatkowego (WPI) oraz ceramika hydroksyapatytowa (HAp), gdzie proporcje składników polimerowych względem 100 ml wodnego roztworu wynoszą odpowiednio: 6–20% (w/v) – β -1,3-glukan, 20–50% (w/v) – izolat białka serwatkowego (WPI), natomiast ilość dodawanych granul ceramiki hydroksyapatytowej (HAp) do takiej mieszaniny polimerów wynosi 40 g – 100 g, przy czym górną fazę stanowi mieszanina β -1,3-glukanu (kurdlanu) oraz izolatu białka serwatkowego (WPI), zaś dolną fazę stanowi mieszanina β -1,3-glukanu (kurdlanu) i izolatu białka serwatkowego (WPI) oraz ceramika hydroksyapatytowa (HAp).

Biomateriał korzystnie zawiera β -1,3-glukan w ilości 8% (w/v) w odniesieniu do 100 ml wodnego roztworu.

Biomateriał korzystnie zawiera izolat białka serwatkowego (WPI) w ilości 30% (w/v) w odniesieniu do 100 ml wodnego roztworu.

Korzystnie ceramika hydroksyapatytowa (HAp) jest w postaci nanoproszku lub proszku lub granul o rozmiarze 0,01–1,0 mm.

Biomateriał korzystnie zawiera ceramikę hydroksyapatytową (HAp) w ilości 70–80 g w odniesieniu do 100 ml wodnego roztworu polimerów.

Przedmiotem wynalazku jest także dwufazowy biomateriał na bazie β -1,3-glukanu (kurdlanu) i ceramiki hydroksyapatytowej (HAp) opisany wyżej do zastosowania do regeneracji ubytków chrzęstno-kostnych.

Sposób wytwarzania dwufazowego biomateriału na bazie kurdlanu do regeneracji ubytków chrzęstno-kostnych znamienny tym, że 20–50% (w/v) wodny roztwór izolatu białka serwatkowego (WPI), korzystnie 30% (w/v), dodaje się do proszku β -1,3-glukanu (kurdlanu), tak aby stężenie kurdlanu względem roztworu WPI wynosiło 6–20% (w/v), korzystnie 8% (w/v), następnie do takiej mieszaniny dodaje się ceramikę hydroksyapatytową (HAp) w postaci nanoproszku lub proszku lub granul o rozmiarze 0,01–1,0 mm, wypalanych w temperaturze 500–1300°C, w ilości 40–100 g na 100 ml wodnego roztworu polimerów, po czym uzyskaną mieszaninę poddaje się wirowaniu przez 1–10 minut, przy prędkości 800–10 000 rpm, następnie mieszaninę z uformowanymi fazami górną – polimerową oraz dolną – polimerowo-ceramiczną inkubuje się korzystnie przez 15 minut w temperaturze 90–120°C i poddaje sterylizacji.

Sposób według zastrz. 2. znamienny tym, że stosuje się granule w ilości od 40 do 100 g, najkorzystniej 70–80 g (w odniesieniu do 100 ml roztworu polimerów), wypalane w temperaturze 1100–1200°C.

Korzystnie sterylizację prowadzi się poprzez autoklawowanie tak, że ma on formę mokrą.

Korzystnie sterylizację mokrego materiału prowadzi się w temperaturze 121°C przez 15 minut.

Korzystnie dwufazowy biomateriał przed sterylizacją gazową poddaje się suszeniu w temperaturze pokojowej.

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

Korzystnie rozmiar granul wynosi 0,05–0,2 mm.

Korzystnie uzyskaną mieszaninę poddaje się wirowaniu przez 3 minuty przy prędkości 3000 rpm.

Korzystnie mieszaninę z uformowanymi dwoma fazami (górną – polimerową oraz dolną – polimerowo-ceramiczną) inkubuje się w temperaturze 90°C.

Wytworzony wg wynalazku dwufazowy biomateriał na bazie kurdlanu, charakteryzuje się korzystnymi właściwościami biologicznymi względem ludzkich osteoblastów hFOB 1.19 w warunkach in vitro.

Połączenie polimerów w postaci β -1,3-glukanu (kurdlanu) i białka serwatkowego (WPI) oraz ceramiki hydroksyapatytowej (HAp) w odpowiednich proporcjach oraz sposób ich łączenia prowadzący do otrzymania dwufazowego biomateriału, przyniosło poszukiwane efekty w regeneracji ubytków chrzęstno-kostnych.

Jak się nieoczekiwanie okazało składniki te wzajemnie się uzupełniają, tworząc biokompatybilny, spójny biomateriał, posiadający dwie fazy (polimerową oraz polimerowo-ceramiczną), charakteryzujący się

brakiem rozwarstwienia na ich granicy. Nietoksyczny β -1,3- glukan (kurdlan) w połączeniu z biokompatybilnym białkiem serwatkowym (WPI) tworzy sprężysty żel, który umożliwia osadzenie ceramiki hydroksyapatytowej (HAp) w jego dolnej części, co w konsekwencji pozwala na otrzymanie biomateriału złożonego z dwóch faz – górnej polimerowej (kurdlan-WPI) i dolnej polimerowo-ceramicznej (kurdlan-WPI-HAp). Obie fazy biomateriału wykazują pożądane właściwości biologiczne względem ludzkich komórek kościotwórczych, poprzez wspieranie ich wzrostu i proliferacji *in vitro*, co wskazuje że dwufazowy biomateriał może być stosowany do regeneracji ubytków chrzęstno-kostnych.

Nikt dotąd w stanie techniki nie ujawnił dwufazowego biomateriału o składzie według wynalazku.

Biomateriał charakteryzuje się także tym, że jest biomimetyczny, tj. jego struktura i kompozycja naśladują naturalną chrząstkę i kość.

Korzystne właściwości biologiczne i strukturalne biomateriału, tj. zdolność do wspierania żywotności i proliferacji osteoblastów linii hFOB 1.19 oraz spoistość i biomimetyczność, wynikają z jego składu jakościowego i ilościowego oraz sposobu jego wytwarzania. Dwufazowość materiału według wynalazku uzyskiwana jest dzięki zastosowaniu określonych składników i ich ilości zwłaszcza ceramiki (HAp) w ilości 40 g – 100 g względem pozostałych składników oraz sposobu wytwarzania, w szczególności poprzez zastosowanie wirowania.

Przedmiot wynalazku ilustrują przedstawione poniżej przykłady.

P r z y k ł a d 1

Do 0,4 g izolatu białka serwatkowego (WPI) dodano 1 ml wody destylowanej. Składniki mieszano, aż do całkowitego rozpuszczenia WPI. Otrzymany klarowny roztwór WPI dodano do 0,08 g kurdlanu umieszczonego w probówce typu Eppendorf o pojemności 2 ml. Składniki mieszano aż do ich całkowitego połączenia. Następnie, dodawano 0,9 g nanoproszku hydroksyapatytowego. Otrzymaną mieszaninę wirowano przez 1 minutę przy prędkości 9000 rpm, a następnie poddawano inkubacji w temperaturze 90°C przez 15 minut. Otrzymany dwufazowy biomateriał poddano sterylizacji przez autoklawowanie (121°C, 15 minut). Przygotowany w ten sposób biomateriał posiada korzystne właściwości, tj. nie wykazuje cytotoksyczności i wspiera proliferację osteoblastów.

Otrzymany materiał posiadał strukturę dwufazową, gdzie górna faza – polimerowa stanowiła ok. 10% objętości biomateriału, zaś dolna faza polimerowo-ceramiczną stanowiła ok. 90% objętości biomateriału.

P r z y k ł a d 2

Do 0,3 g izolatu białka serwatkowego (WPI) dodano 1 ml wody destylowanej. Składniki mieszano, aż do całkowitego rozpuszczenia WPI. Otrzymany klarowny roztwór WPI dodano do 0,07 g kurdlanu umieszczonego w probówce typu Eppendorf o pojemności 2 ml. Składniki mieszano aż do ich całkowitego połączenia. Następnie, dodawano 1,0 g proszku hydroksyapatytowego. Otrzymaną mieszaninę wirowano przez 9 minut przy prędkości 900 rpm, a następnie poddawano inkubacji w temperaturze 90°C przez 15 minut. Otrzymany dwufazowy biomateriał poddano sterylizacji przez autoklawowanie (121°C, 15 minut). Przygotowany w ten sposób biomateriał posiada korzystne właściwości, tj. nie wykazuje cytotoksyczności i wspiera proliferację osteoblastów.

Otrzymany materiał posiadał strukturę dwufazową, gdzie górna faza – polimerowa stanowiła ok. 5% objętości biomateriału, zaś dolna faza polimerowo-ceramiczną stanowiła ok. 95% objętości biomateriału.

P r z y k ł a d 3

Do 0,3 g izolatu białka serwatkowego (WPI) dodano 1 ml wody destylowanej. Składniki mieszano, aż do całkowitego rozpuszczenia WPI. Otrzymany klarowny roztwór WPI dodano do 0,08 g kurdlanu umieszczonego w probówce typu Eppendorf o pojemności 2 ml. Składniki mieszano aż do ich całkowitego połączenia. Następnie, dodawano 0,7 g granul hydroksyapatytu o rozmiarze 0,05–0,2 mm, wypalanych w temperaturze 1150°C. Otrzymaną mieszaninę wirowano przez 3 minuty przy prędkości 3000 rpm, a następnie poddawano inkubacji w temperaturze 90°C przez 15 minut. Otrzymany dwufazowy biomateriał wyjęto z próbki i suszono w temperaturze pokojowej przez okres 24 godzin. Sterylizację otrzymanej próbki przeprowadzono za pomocą tlenu etylenu (55°C, 3 godziny, a następnie 15-godzinna wentylacja próbki w celu odprowadzenia resztek tlenu etylenu po procesie sterylizacji). Przygotowany w ten sposób biomateriał posiada korzystne właściwości, tj. nie wykazuje cytotoksyczności i wspiera proliferację osteoblastów.

Otrzymany materiał posiadał strukturę dwufazową, gdzie górna faza – polimerowa stanowiła ok. 30% objętości biomateriału, zaś dolna faza polimerowo-ceramiczną stanowiła ok. 70% objętości biomateriału.

Dwufazowy biomateriał na bazie kurdlanu, wytworzony wg wynalazku, zawierający kurdlan w ilości 0,08 g, izolat białka serwatkowego (WPI) w ilości 0,3 g oraz hydroksyapatyt w postaci granul o rozmiarze 0,05–0,2 mm w ilości 0,7 g, został przedstawiony na zdjęciu.

Przykład 4

Do 0,35 g izolatu białka serwatkowego (WPI) dodano 1 ml wody destylowanej. Składniki mieszano, aż do całkowitego rozpuszczenia WPI. Otrzymany klarowny roztwór WPI dodano do 0,08 g kurdlanu umieszczonego w probówce typu Eppendorf o pojemności 2 ml. Składniki mieszano aż do ich całkowitego połączenia. Następnie, dodawano 0,5 g granul hydroksyapatytu o rozmiarze 0,3–0,6 mm, wypalanych w temperaturze 1200°C. Otrzymaną mieszaninę wirowano przez 5 minut przy prędkości 3500 rpm, a następnie poddawano inkubacji w temperaturze 90°C przez 15 minut. Otrzymany dwufazowy biomateriał wyjęto z próbki i suszono w temperaturze pokojowej przez okres 24 godzin. Sterylizację otrzymanej próbki przeprowadzono za pomocą tlenu etylenu (55°C, 3 godziny, a następnie 15-godzinna wentylacja próbki w celu odprowadzenia resztek tlenu etylenu po procesie sterylizacji). Przygotowany w ten sposób biomateriał posiada korzystne właściwości, tj. nie wykazuje cytotoksyczności i wspiera proliferację osteoblastów.

Otrzymany materiał posiadał strukturę dwufazową, gdzie górna faza – polimerowa stanowiła ok. 50% objętości biomateriału, zaś dolna faza polimerowo-ceramiczną stanowiła ok. 50% objętości biomateriału.

Przykład 5

Do 0,4 g izolatu białka serwatkowego (WPI) dodano 1 ml wody destylowanej. Składniki mieszano, aż do całkowitego rozpuszczenia WPI. Otrzymany klarowny roztwór WPI dodano do 0,08 g kurdlanu umieszczonego w probówce typu Eppendorf o pojemności 2 ml. Składniki mieszano aż do ich całkowitego połączenia. Następnie, dodawano 0,4 g granul hydroksyapatytu o rozmiarze 0,3–0,6 mm, wypalanych w temperaturze 1150°C. Otrzymaną mieszaninę wirowano przez 6 minut przy prędkości 2000 rpm, a następnie poddawano inkubacji w temperaturze 90°C przez 15 minut. Otrzymany dwufazowy biomateriał poddano sterylizacji przez autoklawowanie (121°C, 15 minut). Przygotowany w ten sposób biomateriał posiada korzystne właściwości, tj. nie wykazuje cytotoksyczności i wspiera proliferację osteoblastów.

Otrzymany materiał posiadał strukturę dwufazową, gdzie górna faza – polimerowa stanowiła ok. 60% objętości biomateriału, zaś dolna faza polimerowo-ceramiczną stanowiła ok. 40% objętości biomateriału.

Przykład 6

Do 0,2 g izolatu białka serwatkowego (WPI) dodano 1 ml wody destylowanej. Składniki mieszano, aż do całkowitego rozpuszczenia WPI. Otrzymany klarowny roztwór WPI dodano do 0,15 g kurdlanu umieszczonego w probówkach typu Eppendorf o pojemności 2 ml. Składniki mieszano aż do ich całkowitego połączenia. Następnie, dodawano 0,7 g granul hydroksyapatytu o rozmiarze 0,05–0,2 mm, wypalanych w temperaturze 1150°C. Otrzymaną mieszaninę wirowano przez 4 minuty przy prędkości 4000 rpm, a następnie poddawano inkubacji w temperaturze 90°C przez 15 minut. Otrzymany dwufazowy biomateriał poddano sterylizacji przez autoklawowanie (121°C, 15 minut). Przygotowany w ten sposób biomateriał wykazuje korzystne właściwości, tj. nie wykazuje cytotoksyczności i wspiera proliferację osteoblastów. Otrzymany materiał posiadał strukturę dwufazową, gdzie górna faza – polimerowa stanowiła ok. 30% objętości biomateriału, zaś dolna faza polimerowo-ceramiczną stanowiła ok. 70% objętości biomateriału.

W celu oceny właściwości biologicznych uformowanych faz biomateriału wytworzonego wg wynalazku, tj. fazy polimerowej i fazy polimerowo-ceramicznej, skafold ten pocięto na krążki. W efekcie otrzymano próbki kurdlan-WPI pochodzące z górnej części biomateriału – fazy polimerowej, odwzorowującej tkankę chrzęstną oraz kurdlan-WPI-HAp pochodzące z dolnej części biomateriału – fazy polimerowo-ceramicznej, odwzorowującej kość podchrzęstną.

Wyniki badań dla biomateriału kurdlan (8% w/v) – WPI (30% w/v) oraz kurdlan (8% w/v) – WPI (30% w/v) – granule HAp o rozmiarze 0,05–0,2 mm, wypalane w temperaturze 1150°C (70 g granul HAp na 100 ml roztworu kurdlan-WPI) wytworzonego według wynalazku przedstawiono w Tabeli 1.

Tabela 1. Wybrane właściwości dwufazowego biomateriału kurdlan – WPI/ kurdlan – WPI – HAp wytworzonego według wynalazku, opisanego w przykładzie 3

Cecha	Biomateriał kurdlan – WPI/kurdlan – WPI – HAp	
	Próbki kurdlan – WPI, pochodzące z górnej fazy biomateriału	Próbki kurdlan – WPI – HAp, pochodzące z dolnej fazy biomateriału
<p>Wpływ na żywotność komórek kościotwórczych hFOB 1.19 (osteoblastów ludzkich pozyskanych z ATCC) – test na ekstraktach.</p> <p>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 in vitro cytotoxicity. Komórki kontrolne były poddawane działaniu płynu hodowlanego, inkubowanego bez badanych biomateriałów. Rezultaty przedstawiono jako wartości średnie \pm odchylenie standardowe po 24-godz. inkubacji komórek z ekstraktami (test MTT).</p>	<p>Wspieranie żywotności komórek kościotwórczych</p> <p>Żywotność równa $102,86 \pm 3,48 \%$ w porównaniu do komórek kontrolnych.</p>	<p>Wspieranie żywotności komórek kościotwórczych</p> <p>Żywotność równa $112,79 \pm 5,05 \%$ w porównaniu do komórek kontrolnych.</p>
<p>Proliferacja osteoblastów ludzkich hFOB 1.19 w kontakcie bezpośrednim in vitro. Cechę tą oceniono poprzez barwienie cytoszkieletu (barwnik – falloidyna) oraz jąder komórkowych (barwnik – Hoechst33342) po 24- i 72- godzinach od inokulacji ludzkich osteoblastów na biomateriałach.</p>	<p>Obserwacje mikroskopowe wykazały, że komórki rosły na całej powierzchni biomateriału. Liczba osteoblastów ludzkich rosnących na biomateriale kurdlan-WPI wzrastała w czasie. Komórki wykazywały prawidłową morfologię.</p>	<p>Obserwacje mikroskopowe wykazały, że komórki rosły na całej powierzchni biomateriału. Liczba osteoblastów ludzkich rosnących na biomateriale kurdlan-WPI-HAp wzrastała w czasie. Komórki wykazywały prawidłową morfologię.</p>

Przedstawione w Tabeli 1. wyniki wskazują, że wytworzony wg wynalazku biomateriał kurdlanWPI/kurdlan-WPI-HAp, wykazuje korzystne właściwości biologiczne względem komórek kościotwórczych linii hFOB 1.19 (komórki pozyskane z Amerykańskiej Kolekcji Kultur Komórkowych (ATCC)). Zarówno faza polimerowa jak i faza polimerowo-ceramiczną biomateriału wzmacnia żywotność i proliferację ludzkich osteoblastów in vitro, co sugeruje, że dwufazowy biomateriał może znaleźć potencjalne zastosowanie w regeneracji ubytków chrzęstno-kostnych.

Zastrzeżenia patentowe

1. Dwufazowy biomateriał na bazie β -1,3-glukanu (kurdlanu) i ceramiki hydroksyapatytowej (HAp), **znamienny tym**, że stanowi go β -1,3-glukan (kurdlan), izolat białka serwatkowego (WPI) oraz ceramika hydroksyapatytowa (HAp), gdzie proporcje składników polimerowych względem 100 ml wodnego roztworu wynoszą odpowiednio: 6–20% (w/v) – β -1,3-glukan, 20–50% (w/v) – izolat białka serwatkowego (WPI), natomiast ilość dodawanych granul ceramiki hydroksyapatytowej (HAp) do takiej mieszaniny polimerów wynosi 40 g – 100 g, przy czym górną fazę stanowi mieszanina β -1,3-glukanu (kurdlanu) oraz izolatu białka serwatkowego (WPI), zaś dolną fazę stanowi mieszanina β -1,3-glukanu (kurdlanu) i izolatu białka serwatkowego (WPI) oraz ceramika hydroksyapatytowa (HAp).
2. Biomateriał według zastrz. 1, **znamienny tym**, że jest wysterylizowany.
3. Biomateriał według zastrz. 1, **znamienny tym**, że zawiera β -1,3-glukan w ilości 8% (w/v) w odniesieniu do 100 ml wodnego roztworu.
4. Biomateriał według zastrz. 1, **znamienny tym**, że zawiera izolat białka serwatkowego (WPI) w ilości 30% (w/v) w odniesieniu do 100 ml wodnego roztworu.
5. Biomateriał według zastrz. 1, **znamienny tym**, że ceramika hydroksyapatytowa (HAp) jest w postaci nanoproszku lub proszku lub granul o rozmiarze 0,01–1,0 mm.

6. Biomateriał według zastrz. 1, **znamienny tym**, że zawiera ceramikę hydroksyapatytową (HAp) w ilości 70–80 g w odniesieniu do 100 ml wodnego roztworu polimerów.
7. Dwufazowy biomateriał na bazie β -1,3-glukanu (kurdlanu) i ceramiki hydroksyapatytowej (HAp) opisany w zastrzeż. 1 do zastosowania w regeneracji ubytków chrzęstno-kostnych.
8. Sposób wytwarzania dwufazowego biomateriału na bazie kurdlanu do regeneracji ubytków chrzęstno-kostnych **znamienny tym**, że 20–50% (w/v) wodny roztwór izolatu białka serwatkowego (WPI), korzystnie 30% (w/v), dodaje się do proszku β -1,3-glukanu (kurdlanu), tak aby stężenie kurdlanu względem roztworu WPI wynosiło 6–20% (w/v), korzystnie 8% (w/v), następnie do takiej mieszaniny dodaje się ceramikę hydroksyapatytową (HAp) w postaci nanoproszku lub proszku lub granul o rozmiarze 0,01–1,0 mm, wypalanych w temperaturze 500–1300°C, w ilości 40–100 g na 100 ml wodnego roztworu polimerów, po czym uzyskaną mieszaninę poddaje się wirowaniu przez 1–10 minut, przy prędkości 800–10 000 rpm, następnie mieszaninę z uformowanymi fazami górną – polimerową oraz dolną – polimerowo-ceramiczną inkubuje się przez korzystnie 15 minut w temperaturze 90–120°C.
9. Sposób według zastrz. 8, **znamienny tym**, że otrzymany dwufazowy biomateriał poddaje się sterylizacji.
10. Sposób według zastrz. 8, **znamienny tym**, że stosuje się granule w ilości od 40 do 100 g, najkorzystniej 70–80 g (w odniesieniu do 100 ml wodnego roztworu polimerów), wypalane w temperaturze 1100–1200°C.
11. Sposób według zastrz. 9, **znamienny tym**, że dwufazowy biomateriał poddaje się sterylizacji poprzez autoklawowanie tak, że ma on formę mokrą.
12. Sposób według zastrz. 9, **znamienny tym**, że sterylizację mokrego materiału prowadzi się w temperaturze 121°C przez 15 minut.
13. Sposób według zastrz. 9, **znamienny tym**, że dwufazowy biomateriał przed sterylizacją gazową poddaje się suszeniu w temperaturze pokojowej.
14. Sposób według zastrz. 9, **znamienny tym**, że sterylizację gazową suchego biomateriału prowadzi się tlenkiem etylenu (55°C) do 3 godzin.
15. Sposób według zastrz. 8, **znamienny tym**, że rozmiar granul wynosi 0,05–0,2 mm.
16. Sposób według zastrz. 8, **znamienny tym**, że uzyskaną mieszaninę poddaje się wirowaniu przez 3 minuty przy prędkości 3000 rpm.
17. Sposób według zastrz. 8, **znamienny tym**, że mieszaninę z uformowanymi dwoma fazami (górną – polimerową oraz dolną – polimerowo-ceramiczną) inkubuje się w temperaturze 90°C.

Rysunek

