

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **235822**
(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **426788**

(22) Data zgłoszenia: **24.08.2018**

(51) Int.Cl.
A61L 27/12 (2006.01)
A61L 27/20 (2006.01)
A61L 27/32 (2006.01)
A61F 2/28 (2006.01)

(54) **Kriożelowe rusztowanie kostne na bazie chitozanu i bioceramiki
fosforoanowo-wapniowej oraz sposób jego wytwarzania**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
09.03.2020 BUP 06/20

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
02.11.2020 WUP 17/20

(73) Uprawniony z patentu:
**UNIwersytet Medyczny w Lublinie,
Lublin, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:
AGATA PRZEKORA-KUŚMIERZ, Lublin, PL
PAULINA KAZIMIERCZAK,
Kolonia Mikoszewice, PL
GRAŻYNA GINALSKA, Lublin, PL

(74) Pełnomocnik:
rzecz. pat. Anna Bełz

PL 235822 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest makroporowate rusztowanie kostne na bazie chitozanu i bioceramiki fosforanowo-wapniowej do zastosowań w inżynierii tkankowej oraz medycynie regeneracyjnej kości oraz sposób jego otrzymywania. Otrzymany według wynalazku biomateriał może znaleźć zastosowanie jako rusztowanie kostne służące do wygenerowania w warunkach *in vitro* autologicznego żywego wszczepu kostnego oraz w warunkach *in vivo* jako wypełniacz niewielkich ubytków kostnych (bez wcześniejszego zasiedlenia komórkami pacjenta).

Rusztowanie kostne do, zastosowań biomedycznych powinno posiadać kluczowe cechy, takie jak dobre właściwości biologiczne i mechaniczne, w celu zapewnienia optymalnych warunków do wzrostu komórek oraz dostatecznego wsparcia strukturalnego. Zatem rusztowanie kostne winno sprzyjać adhezji, proliferacji, różnicowaniu komórek osteoprogenitorowych i osteoblastów oraz tworzeniu zewnątrzkomórkowej macierzy kostnej w obrębie implantu (Chun J.H. i wsp., *Journal of Physics and Chemistry of Solids*, 69, 1573–1576, 2008; Kim E.S. i wsp., *Fibers and Polymers*, 2(2), 64–70, 2001). Co więcej, optymalne rusztowanie powinno charakteryzować się wysokim stopniem porowatości oraz posiadać sieć wzajemnie połączonych ze sobą porów, czyli tzw. pory zespolone, które sprzyjają unaczynieniu oraz przerastaniu biomateriału tkanką kostną (Hannink G., Arts C.J.J. *Injury*, 42, S22–S25, 2011). Rozważając wpływ biomateriału na proces różnicowania osteogennego, implant kostny powinien wykazywać właściwości osteokonduktywne, osteoinduktywne i/lub osteostymulujące oraz charakteryzować się wysoką biokompatybilnością (Albrektsson T., Johansson C., *European Spine Journal*, 10, S96–S101, 2001).

Substancję zewnątrzkomórkową tkanki kostnej tworzy organiczna macierz oraz część mineralna w postaci hydroksyapatytu. Z tego względu zdecydowana większość biokompozytów do zastosowań w inżynierii tkankowej oraz medycynie regeneracyjnej kości składa się z bioceramiki fosforanowo-wapniowej, takiej jak hydroksyapatyt (HAp), fosforan β -trójwapniowy (β -TCP), fosforan α -trójwapniowy (α -TCP) lub cement fosforanowo-wapniowy (CPC), oraz składnika organicznego w postaci biodegradowalnego biopolimeru, np. kolagenu (Kim E.S. i wsp., *Fibers and Polymers*, 2(2), 64–70, 2001), fibroiny jedwabiu (Qi X.N. i wsp., *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 102(2), 366–372, 2014), alginianu (Jin H.H. i wsp., *International Journal of Biological Macromolecules*, 51, 1079–1085, 2012), amylopektyny, siarczanu, chondroityny (Venkatesan J. i wsp., *International Journal of Biological Macromolecules*, 51, 1033–1042, 2012), karboksymetylocelulozy (Liuyun J. i wsp., *Journal of Biomedical Science*, 16, 65–75, 2009) lub chitozanu (Jin H.H. i wsp., *International Journal of Biological Macromolecules*, 51, 1079–1085, 2012; Venkatesan J. i wsp., *International Journal of Biological Macromolecules*, 51, 1033–1042, 2012).

Chitozan to polimer pochodzenia naturalnego stosowany w wielu aplikacjach medycznych ze względu na cenne biologiczne właściwości, takie jak brak toksyczności, biokompatybilność, biodegradowalność, hydrofilowość oraz działanie bakteriostatyczne, bakteriobójcze i przeciwwgrzybicze (Chung Y.C., Chen C.Y., *Bioresource Technology*, 99(8), 2806–2814, 2008). Istnieje jednak potrzeba poprawy jego właściwości mechanicznych, zwłaszcza w zastosowaniach inżynierii tkankowej kości. Osiągane jest to poprzez łączenie chitozanu z bioceramiką fosforanowo-wapniową (Raz M. i wsp., *Silicon*, 10(2), 277–286, 2018). Bioceramika fosforanowo-wapniowa obecna w rusztowaniach kostnych wpływa również korzystnie na potencjał osteokonduktywny oraz bioaktywny biomateriałów (Dhivya S. i wsp., *Journal of Nanobiotechnology*, 13:40, 2015).

Z polskiego opisu patentu nr PL 222 085 B1 znany jest sposób wytwarzania kompleksu mikrokryształicznego chitozan/ortofosforan trójwapniowy o postaci żelopodobnej zawiesiny, polegający na połączeniu wodnej zawiesiny chitozanu z roztworem ortofosforanu trójwapniowego w kwasie solnym.

Z polskiego opisu patentu nr PL 217 897 B1 znany jest sposób otrzymywania kompozytowych materiałów implantacyjnych opartych na fosforanie trójwapniowym (α -TCP) i chitozanie. Sposób charakteryzuje się tym, że do roztworu chitozanu w wodnym roztworze kwasu octowego, wprowadza się w jego skład modyfikujące jony Ca^{2+} , Mg^{2+} i/lub PO_4^{3-} , a następnie tak sporządzony roztwór dodaje się do wyjściowego proszku α -TCP.

Znany jest również z polskiego opisu patentu nr PL 216 995 B1 sposób wytwarzania kompozytowego kośćcozastępczego materiału implantacyjnego zawierającego gips, chitozan i hydroksyapatyt. Sposób otrzymywania charakteryzuje się tym, że półwodny siarczan wapnia z dodatkiem wysokoreaktywnego hydroksyapatytu, zarabia się roztworem chitozanu w wodnym roztworze kwasu octowego.

Z polskiego opisu patentu nr PL 227 996 B1 znany jest sposób wytwarzania materiału kompozytowego na bazie chitozanu, hydroksyapatytu i krzemionki, przeznaczonego na substytuty kości. Sposób otrzymywania materiału kompozytowego polega na tym, że roztwór wodny soli chitozanowej miesza się z nanoproszkiem hydroksyapatytowym oraz ewentualnie z glicerofosforanem wapnia za pomocą ultradźwięków do uzyskania homogenicznej pasty, którą wprowadza się następnie do zolu kwasu metakrzemowego.

Znany jest sposób otrzymywania kompozytu z agarozy i hydroksyapatytu, który polega na wytrącaniu hydroksyapatytu z roztworu zawierającego $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ i $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ w żelu agarozowym (Hu J. i wsp., *International Journal of Biomedical Macromolecules*, 82, 134–143, 2016).

Znany jest również makroporowaty kriożel na bazie chitozanu, agarozy i żelatyny do zastosowań w inżynierii tkanki chrzęstnej. Metoda wytwarzania kriożelu jest następująca: do roztworu chitozanu i żelatyny, przygotowanego w wodnym roztworze kwasu octowego, dodawano wodny roztwór agarozy oraz aldehyd glutarowy. Kriożel otrzymano poprzez inkubację roztworu polimerów w temperaturze -12°C przez okres 16 godzin, a następnie suszeniu w temperaturze pokojowej (Bhat S., Tripathi A., Kumar A., *Journal of The Royal Society Interface*, 8(57), 540–554, 2011).

Znany jest sposób wytwarzania rusztowania na bazie chitozanu i agarozy. Sposób obejmuje przygotowanie roztworu chitozanu w wodnym roztworze kwasu octowego oraz wodnego roztworu agarozy przygotowanego w temperaturze 90°C . Następnie do roztworu agarozy, dodawano roztwór chitozanu i całość zamrażano w temperaturze -80°C . Po zamrożeniu biomateriał liofilizowano. Otrzymany w ten sposób biomateriał zastosowano w inżynierii tkanki chrzęstnej (Merlin Rajesh Lal'L.P. i wsp., *Society For Biomaterials*, 105(7), 1845–1855, 2017).

Dotychczas nie zostały opracowane i opisane w dostępnej literaturze naukowej trójskładnikowe rusztowania kostne na bazie matrycy żelowej z chitozanu i agarozy oraz bioceramiki fosforanowo-wapniowej. Wiele badań z zakresu inżynierii tkankowej kości, dotyczy biomateriałów powstałych, z połączenia tylko dwóch wyżej wymienionych komponentów.

Celem wynalazku jest otrzymanie rusztowania kostnego na bazie matrycy kriożelowej z chitozanu i agarozy oraz bioceramiki fosforanowo-wapniowej, które przez swoje strukturalne i biologiczne właściwości będzie sprzyjało procesom regeneracyjnym w miejscu implantacji.

Przedmiotem wynalazku jest kriożelowy biomateriał zbudowany z chitozanu, agarozy, oraz ceramiki fosforanowo-wapniowej w postaci proszku lub nanoproszku, rozprowadzone w 0,5–3% wodnym roztworze kwasu octowego, przy czym proporcje wagowe stałych komponentów wynoszą odpowiednio 0,5–4% (w/v) chitozanu, 0,5–5% (w/v) agarozy oraz 1–70%, (w/v) bioceramiki fosforanowo-wapniowej w odniesieniu do kwasu octowego.

Korzystnie, gdy chitozan stosuje się w ilości 2% w/v w odniesieniu do kwasu octowego.

Korzystnie, gdy agarozę stosuje się w ilości 5% w/v w odniesieniu do kwasu octowego.

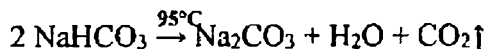
Korzystnie, gdy bioceramikę fosforanowo-wapniową stosuje się w ilości 30–70% w/v w odniesieniu do kwasu octowego.

Sposób wytwarzania makroporowatego rusztowania kostnego według wynalazku polega na tym, że do 0,5–4% (w/v) roztworu chitozanu przygotowanego w 0,5–3% (v/v) wodnym roztworze kwasu octowego, korzystnie 2% (v/v), dodaje się kolejno 0,5–5% (w/v) agarozy, korzystnie 5% oraz 1–70% (w/v) bioceramiki fosforanowo-wapniowej w postaci proszku lub nanoproszku, korzystnie 30–70% w odniesieniu do kwasu octowego, następnie do otrzymanej masy dodaje się 0,5–4% (w/v) wodorowęglanu sodu, korzystnie 2% (w/v) i całość miesza się, a następnie przekłada do formy odpornej na wysoką i ultra-niską temperaturę, gdzie inkubuje się w łaźni wodnej w temperaturze $90\text{--}95^\circ\text{C}$, korzystnie 95°C , przez 15–25 minut, korzystnie 15 minut, a następnie studzi w łaźni lodowej w temperaturze $2\text{--}4^\circ\text{C}$, po czym ostudzoną próbkę umieszcza się w fazie gazowej nad ciekłym azotem w temperaturze od -135 do -150°C na 1–3 minuty, korzystnie 1 minutę, następnie formę umieszcza się w zamrażarce w temperaturze od -60 do -80°C na okres dwóch godzin, po czym zamrożoną próbkę poddaje się procesowi liofilizacji (10^{-2} – 10^{-3} mbar) przez okres do 18 godzin lub do momentu całkowitego wysuszenia próbki, po czym po liofilizacji biomateriał poddaje się zanurzeniu w 1% w/v wodnym roztworze zasady sodowej na okres 10 minut dla próbek o objętości do 2 cm^3 lub na okres według wzoru $t = V \times 10/2$, gdzie t oznacza potrzebny czas inkubacji, a V oznacza objętość materiału, następnie po wyjęciu biomateriału z roztworu NaOH, płucze się go korzystnie trzykrotnie w wodzie dejonizowanej i suszy.

Porowatość rusztowania została osiągnięta dzięki sublimacji rozpuszczalnika oraz wytworzeniu dwutlenku węgla w wyniku reakcji NaHCO_3 z kwasem octowym (CH_3COOH):



a także podczas obróbki cieplnej:



Opracowana według wynalazku metoda wytwarzania makroporowatego rusztowania kostnego, wykorzystująca równolegle dwie reakcje, które są źródłem porogenu CO_2 , to jest reakcję wodorowęglanu sodu z kwasem octowym (1) oraz rozkład wodorowęglanu sodu pod wpływem obróbki cieplnej (2), jest metodą dotychczas niestosowaną w procesie tworzenia porowatych biomateriałów. Nowością jest również zastosowanie środka pianotwórczego (NaHCO_3) w połączeniu z procesem liofilizacji w celu wytworzenia porowatej struktury materiału.

Zaletą opracowanego według wynalazku sposobu wytwarzania biomateriału jest otrzymanie makroporowatej struktury oraz sieci wzajemnie połączonych ze sobą porów, która potencjalnie będzie sprzyjać unaczynieniu oraz przerastaniu biomateriału tkanką kostną. Ważnym elementem jest, że rusztowanie kostne na bazie chitozanu, agarozy i bioceramiki fosforanowo-wapniowej otrzymane sposobem według wynalazku, charakteryzuje się wysoce makroporowatą strukturą ($\varnothing$ porów $> 100 \mu\text{m}$), dobrą poręcznością chirurgiczną, brakiem toksyczności w stosunku do komórek eukariotycznych oraz korzystnymi właściwościami biologicznymi (sprzyja adhezji i proliferacji komórek kościotwórczych na jego powierzchni). Ponadto biomateriał wykazuje bardzo dużą chłonność, dzięki czemu łatwo pochłania płyny np. wodę, sól fizjologiczną, osocze, krew. Kompozyt zachowuje wszystkie swoje właściwości po procesie sterylizacji za pomocą tlenu etylenu.

Biomateriał będący przedmiotem wynalazku, ze względu na swoje bardzo dobre właściwości strukturalne i biologiczne będzie sprzyjał procesom regeneracyjnym w miejscu implantacji i może być stosowany zarówno w inżynierii tkankowej jako rusztowanie kostne do wstępnego przedoperacyjnego zasiedlania komórkami macierzystymi lub osteoprogenitorowymi *in vitro*, a także *in vivo* w medycynie regeneracyjnej jako wypełniacz niewielkich ubytków kostnych.

Przedmiot wynalazku ilustrują przedstawione poniżej przykłady:

Przykład I

Do 0,04 g chitozanu dodano 2 ml 1% (v/v) wodnego roztworu kwasu octowego i mieszano. Do uzyskanej masy dodano 0,1 g agarozy, całość zmieszano, a następnie dodano 0,6 g hydroksypapatytu w postaci nanoproszku. Całość mieszano do uzyskania jednolitej masy. Następnie dodano 0,03 g wodorowęglanu sodu, starannie wymieszano, po czym otrzymaną masę umieszczono w formie (o obj. 2 cm^3) odpornej na działanie wysokiej i ultra-niskiej temperatury. Formę inkubowano w łaźni wodnej w temperaturze 95°C przez 15 minut, a następnie ostudzono w łaźni lodowej w temperaturze 2°C . Ostudzony biomateriał umieszczono w fazie gazowej nad ciekłym azotem w temperaturze -140°C na 1 minutę. Następnie biomateriał umieszczono w zamrażarce w temperaturze -75°C na okres dwóch godzin. Zamrożoną próbkę poddano procesowi liofilizacji w średniej próżni (6×10^{-2} mbar) przez okres 18 godzin. Biomateriał wyciągnięto z formy, moczo 10 minut w 1% (w/v) wodnym roztworze zasady sodowej, w celu zneutralizowania pozostałości kwasu octowego w próbce. Po wyjęciu materiału z roztworu zasady, płukano go trzykrotnie przez okres 30 minut w wodzie dejonizowanej i suszono na powietrzu w temperaturze pokojowej przez 24 godziny. Uzyskany biomateriał poddano sterylizacji tlenkiem etylenu w temperaturze 55°C przez okres 3 godzin oraz 15-godzinnemu wentylowaniu w celu odprowadzenia tlenu etylenu po procesie sterylizacji.

Otrzymany biomateriał charakteryzuje się makroporowatą strukturą ($\varnothing$ porów $> 100 \mu\text{m}$), jest nietoksyczny, sprzyja adhezji i proliferacji osteoblastów na jego powierzchni.

Przykład II

Do 0,04 g chitozanu dodano 2 ml 0,5% (v/v) wodnego roztworu kwasu octowego i mieszano. Do uzyskanej masy dodano 0,06 g agarozy, całość zmieszano, a następnie dodano 0,8 g hydroksypapatytu w postaci nanoproszku. Całość mieszano do uzyskania jednolitej masy. Następnie dodano 0,02 g wodorowęglanu sodu, starannie wymieszano, po czym otrzymaną masę umieszczono w formie (o obj. 2 cm^3) odpornej na działanie wysokiej i ultra-niskiej temperatury. Formę inkubowano w łaźni wodnej w temperaturze 90°C przez 20 minut, a następnie ostudzono w łaźni lodowej w temperaturze 4°C . Ostudzony biomateriał umieszczono w fazie gazowej nad ciekłym azotem w temperaturze -140°C

na 1,5 minuty. Następnie biomateriał umieszczono w zamrażarce w temperaturze -80°C na okres dwóch godzin. Zamrożoną próbkę poddano procesowi liofilizacji w średniej próżni (8×10^{-2} mbar) przez okres 18 godzin. Biomateriał wyciągnięto z formy, moczo 10 minut w 0,1% (w/v) wodnym roztworze zasady sodowej, w celu zneutralizowania pozostałości kwasu octowego w próbce. Po wyjęciu materiału z roztworu zasady, płukano go trzykrotnie przez okres 30 minut w wodzie dejonizowanej i suszono na powietrzu w temperaturze pokojowej przez 24 godziny. Uzyskany biomateriał poddano sterylizacji tlenkiem etylenu w temperaturze 55°C przez okres 3 godzin oraz 15-godzinnemu wentylowaniu w celu odprowadzenia tlenu etylenu po procesie sterylizacji.

Otrzymany biomateriał charakteryzuje się makroporową strukturą ($\varnothing$ porów $> 100 \mu\text{m}$), jest nietoksyczny, sprzyja adhezji i proliferacji osteoblastów na jego powierzchni.

Przykład III

Do 0,06 g chitozanu dodano 2 ml 2% (v/v) wodnego roztworu kwasu octowego i mieszano. Do uzyskanej masy dodano 0,08 g agarozy, całość zmieszano, a następnie dodano 0,6 g hydroksyapatytu w postaci nanoproszku. Całość mieszano do uzyskania jednolitej masy. Następnie dodano 0,04 g wodorowęglanu sodu, starannie wymieszano, po czym otrzymaną masę umieszczono w formie (o obj. 2 cm^3) odpornej na działanie wysokiej i ultra-niskiej temperatury. Formę inkubowano w łaźni wodnej w temperaturze 95°C przez 15 minut, a następnie ostudzono w łaźni lodowej w temperaturze 2°C . Ostudzony biomateriał umieszczono w fazie gazowej nad ciekłym azotem w temperaturze -135°C na 1 minutę. Następnie biomateriał umieszczono w zamrażarce w temperaturze -80°C na okres dwóch godzin. Zamrożoną próbkę poddano procesowi liofilizacji w średniej próżni ($6,2 \times 10^{-2}$ mbar) przez okres 18 godzin. Biomateriał wyciągnięto z formy, moczo 10 minut w 1% (w/v) wodnym roztworze zasady sodowej, w celu zneutralizowania pozostałości kwasu octowego w próbce. Po wyjęciu materiału z roztworu zasady, płukano go trzykrotnie przez okres 30 minut w wodzie dejonizowanej i suszono na powietrzu w temperaturze pokojowej przez 24 godziny. Uzyskany biomateriał poddano sterylizacji tlenkiem etylenu w temperaturze 55°C przez okres 3 godzin oraz 15-godzinnemu wentylowaniu w celu odprowadzenia tlenu etylenu po procesie sterylizacji.

Otrzymany biomateriał charakteryzuje się makroporową strukturą ($\varnothing$ porów $> 100 \mu\text{m}$), jest nietoksyczny, sprzyja adhezji i proliferacji osteoblastów na jego powierzchni.

Przykład IV

Do 0,04 g chitozanu dodano 2 ml 2% (v/v) wodnego roztworu kwasu octowego i mieszano. Do uzyskanej masy dodano 0,1 g agarozy, całość zmieszano, a następnie dodano 0,8 g hydroksyapatytu w postaci nanoproszku. Całość mieszano do uzyskania jednolitej masy. Następnie dodano 0,04 g wodorowęglanu sodu, starannie wymieszano, po czym otrzymaną masę umieszczono w formie (o obj. 2 cm^3) odpornej na działanie wysokiej i ultra-niskiej temperatury. Formę inkubowano w łaźni wodnej w temperaturze 95°C przez 15 minut, a następnie ostudzono w łaźni lodowej w temperaturze 2°C . Ostudzony biomateriał umieszczono w fazie gazowej nad ciekłym azotem w temperaturze -135°C na 1 minutę. Następnie biomateriał umieszczono w zamrażarce w temperaturze -80°C na okres dwóch godzin. Zamrożoną próbkę poddano procesowi liofilizacji w średniej próżni ($6,2 \times 10^{-2}$ mbar) przez okres 18 godzin. Biomateriał wyciągnięto z formy, moczo 10 minut w 1% (w/v) wodnym roztworze zasady sodowej, w celu zneutralizowania pozostałości kwasu octowego w próbce. Po wyjęciu materiału z roztworu zasady, płukano go trzykrotnie przez okres 30 minut w wodzie dejonizowanej i suszono na powietrzu w temperaturze pokojowej przez 24 godziny. Uzyskany biomateriał poddano sterylizacji tlenkiem etylenu w temperaturze 55°C przez okres 3 godzin oraz 15-godzinnemu wentylowaniu w celu odprowadzenia tlenu etylenu po procesie sterylizacji.

Otrzymany biomateriał charakteryzuje się makroporową strukturą ($\varnothing$ porów $> 100 \mu\text{m}$), jest nietoksyczny, sprzyja adhezji i proliferacji osteoblastów na jego powierzchni.

Przykład V

Do 0,04 g chitozanu dodano 2 ml 2% (v/v) wodnego roztworu kwasu octowego i mieszano. Do uzyskanej masy dodano 0,1 g agarozy, całość zmieszano, a następnie dodano 1,4 g hydroksyapatytu w postaci nanoproszku. Całość mieszano do uzyskania jednolitej masy. Następnie dodano 0,04 g wodorowęglanu sodu, starannie wymieszano, po czym otrzymaną masę umieszczono w formie (o obj. 2 cm^3) odpornej na działanie wysokiej i ultra-niskiej temperatury. Formę inkubowano w łaźni wodnej w temperaturze 95°C przez 25 minut, a następnie ostudzono w łaźni lodowej w temperaturze 2°C . Ostudzony biomateriał umieszczono w fazie gazowej nad ciekłym azotem w temperaturze -145°C na 1,5 minuty. Następnie biomateriał umieszczono w zamrażarce w temperaturze -80°C na okres dwóch godzin. Zamrożoną próbkę poddano procesowi liofilizacji w średniej próżni (8×10^{-2} mbar)

przez okres 18 godzin. Biomateriał wyciągnięto z formy, moczoło 10 minut w 1% (w/v) wodnym roztworze zasady sodowej, w celu zneutralizowania pozostałości kwasu octowego w próbce. Po wyjęciu materiału z roztworu zasady, płukano go trzykrotnie przez okres 30 minut w wodzie dejonizowanej i suszono na powietrzu w temperaturze pokojowej przez 24 godziny. Uzyskany biomateriał poddano sterylizacji tlenkiem etylenu w temperaturze 55°C przez okres 3 godzin oraz 15-godzinnemu wentylowaniu w celu odprowadzenia tlenu etylenu po procesie sterylizacji.

Otrzymany biomateriał charakteryzuje się makroporową strukturą ($\varnothing$ porów > 100 μm), jest nietoksyczny, sprzyja adhezji i proliferacji osteoblastów na jego powierzchni.

Zastrzeżenia patentowe

1. Rusztowanie kostne na bazie chitozanu w roztworze kwasu octowego oraz bioceramiki fosforanowo-wapniowej, **znamiennie tym**, że stanowi go chitozan, agaroza oraz bioceramika fosforanowo-wapniowa w postaci proszku lub nanoproszku, rozprowadzone w 0,5–3% wodnym roztworze kwasu octowego, przy czym proporcje wagowe stałych komponentów wynoszą odpowiednio 0,5–4% (w/v) chitozanu, 0,5–5% (w/v) agarozę oraz 1–70% (w/v) bioceramiki fosforanowo-wapniowej w odniesieniu do kwasu octowego.
2. Rusztowanie kostne według zastrzeżenia 1, **znamiennie tym**, że chitozan stosuje się w ilości 2% w/v w odniesieniu do kwasu octowego.
3. Rusztowanie kostne według zastrzeżenia 1, **znamiennie tym**, że agarozę stosuje się w ilości 5% w/v w odniesieniu do kwasu octowego.
4. Rusztowanie kostne według zastrzeżenia 1, **znamiennie tym**, że bioceramikę fosforanowo-wapniową stosuje się w ilości 30–70% w/v w odniesieniu do kwasu octowego.
5. Sposób wytwarzania makroporowego rusztowania kostnego na bazie chitozanu w roztworze kwasu octowego, bioceramiki fosforanowo-wapniowej, **znamiennie tym**, że do 0,5–4% (w/v) roztworu chitozanu przygotowanego w 0,5–3% (v/v) wodnym roztworze kwasu octowego, korzystnie 2% (v/v), dodaje się kolejno 0,5–5% (w/v) agarozę oraz 1–70% (w/v) bioceramiki fosforanowo-wapniowej w postaci proszku lub nanoproszku, w odniesieniu do kwasu octowego, następnie do otrzymanej masy dodaje się 0,5–4% (w/v) wodorowęglanu sodu i całość miesza się, a następnie przekłada do formy odpornej na wysoką i ultra-niską temperaturę, gdzie inkubuje się w łaźni wodnej w temperaturze 90–95°C, korzystnie 95°C, przez 15–25 minut, korzystnie 15 minut, a następnie studzi w łaźni lodowej w temperaturze 2–4°C, po czym ostudzoną próbkę umieszcza się w fazie gazowej nad ciekłym azotem w temperaturze od -135 do -150°C na 1–3 minuty, korzystnie 1 minutę, następnie formę umieszcza się w zamrażarce w temperaturze od -60 do -80°C na okres dwóch godzin, po czym zamrożoną próbkę poddaje się procesowi liofilizacji (10^{-2} – 10^{-3} mbar) przez okres do 18 godzin lub do momentu całkowitego wysuszenia próbki, po czym po liofilizacji biomateriał poddaje się zanurzeniu w 1% w/v wodnym roztworze zasady sodowej na okres 10 minut dla próbek o objętości do 2 cm^3 lub na okres według wzoru $t = V \times 10/2$, gdzie t oznacza potrzebny czas inkubacji, a V oznacza objętość materiału, następnie po wyjęciu biomateriału z roztworu NaOH, płucze się go korzystnie trzykrotnie w wodzie dejonizowanej i suszy.
6. Rusztowanie kostne według zastrzeżenia 5, **znamiennie tym**, że chitozan stosuje się w ilości 2% w/v w odniesieniu do kwasu octowego.
7. Rusztowanie kostne według zastrzeżenia 5, **znamiennie tym**, że agarozę stosuje się w ilości 5% w/v w odniesieniu do kwasu octowego.
8. Rusztowanie kostne według zastrzeżenia 5, **znamiennie tym**, że bioceramikę fosforanowo-wapniową stosuje się w ilości 30–70% w/v w odniesieniu do kwasu octowego.
9. Rusztowanie kostne według zastrzeżenia 5, **znamiennie tym**, że wodorowęglan sodu stosuje się w ilości 2% w/v w odniesieniu do kwasu octowego.
10. Rusztowanie kostne według zastrzeżenia 5, **znamiennie tym**, że biomateriał płucze się w wodzie dejonizowanej przez okres 30 minut.