

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10)

PL 247449 B1

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **442451**

(22) Data zgłoszenia: **2022.10.05**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2024.04.08 BUP 15/2024**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2025.07.07 WUP 27/2025**

(51) MKP:

A61L 27/12 (2006.01)

A61L 27/20 (2006.01)

A61L 27/40 (2006.01)

(73) Uprawniony z patentu:

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

(72) Twórca(-y) wynalazku:

AGATA PRZEKORA-KUŚMIERZ, Lublin, PL

MARTA TRZASKOWSKA, Urszulin, PL

VLADYSLAV VIVCHARENKO, Lublin, PL

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Anna Bełz, Lublin, PL

(54) Tytuł:

**Nanokompozytowy granulat hydroksyapatytowo-polimerowy na bazie matrycy
kurdlanowo-chitozanowej oraz sposób jego wytwarzania**

PL 247449 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest nanokompozytowy biomateriał w postaci granulatu na bazie matrycy kurdlanowo-chitozanowej wytworzony z użyciem spiekane w wysokiej temperaturze nanohydroksyapatytu, wykorzystywany w celu poprawy regeneracji tkanki kostnej. Wyprodukowany według wynalazku granulaty nanokompozytowy może służyć jako materiał implantacyjny w miejscu niewielkiego ubytku kostnego w chirurgii szczękowo-twarzowej, ortopedii i stomatologii.

Do wiodących materiałów wykorzystywanych w chirurgii tkanki kostnej należy hydroksyapatyt (HA). Istotnymi cechami implantu kostnego na bazie HA jest jego bioresorpcja wynikająca z wysokiej mikroporowatości oraz dużej powierzchni właściwej (SSA – z ang. specific surface area), a także wysoka bioaktywność (zdolność do tworzenia warstwy apatytu na powierzchni materiału), co przekłada się na dobrą osseointegrację z tkanką gospodarza (Ginebra M.P. i wsp., *EFORT Open Reviews*, 3(5), 173–183, 2018). Większość dostępnych w handlu granulatów HA jest spiekana w wysokich temperaturach ($\geq 900^{\circ}\text{C}$). Chociaż ten typ ceramiki jest wysoce biokompatybilny i wykazuje podobieństwa składowe i strukturalne z naturalnym minerałem kostnym, charakteryzuje się również niską wartością SSA ($2\text{--}5\text{ m}^2/\text{g}$), zmniejszoną bioaktywnością i rozpuszczalnością, a tym samym słabą bioresorpcją (pozostaje niezastąpiony tkanką kostną przez wiele lat po implantacji). Jest to cecha niepożądana, ponieważ w celu utworzenia miejsca dla nowo powstałej tkanki, biomateriał implantacyjny powinien ulegać degradacji i bioresorpcji. Granulat HA o wysokiej mikroporowatości i wartości SSA ($20\text{--}60\text{ m}^2/\text{g}$) można wytwarzać stosując niskie temperatury spiekania (poniżej 900°C). Niemniej jednak chociaż HA spiekany w niskich temperaturach wykazuje lepszą bioabsorbowalność, odznacza się także wysoką reaktywnością jonową, działając cytotoksycznie na komórki kostne w otaczającym mikrośrodku (Ginebra M.P. i wsp., *EFORT Open Reviews*, 3(5), 173–183, 2018; Gustavsson J. i wsp., *Acta Biomaterialia*, 7(12), 4242–4252, 2011; Klimek K. i wsp., *Materials Science and Engineering C*, 65, 70–79, 2016; Przekora A. i wsp., *Materials Letters*, 190, 213–216, 2017). Istnieje zatem ogromna potrzeba opracowania granulatu HA o wysokiej wartości SSA, który nie wykazywałby cytotoksyczności w stosunku do komórek ludzkich.

Kość jest trójskładnikowym kompozytem tworzonym przez komórki, fazę organiczną i nieorganiczną. Komponent organiczny zawiera głównie kolageny, glikoproteiny czy proteoglikany, natomiast dominującym składnikiem fazy nieorganicznej jest hydroksyapatyt (Guarino V. i wsp., *International Materials Reviews*, 57(5), 256–275, 2012). Z tego względu biomateriały kompozytowe składające się z ceramiki i polimerów wydają się być najbardziej obiecującym rozwiązaniem w medycynie regeneracyjnej (Chen Q. i wsp., *Progress in Biomaterials*, 1(1), 2, 2012). Połączenie to umożliwia tworzenie biodegradowalnych biomateriałów implantacyjnych o dobrych parametrach mechanicznych i biologicznych. Obecność ceramiki fosforanowo-wapniowej zapewnia bardzo dobre właściwości osteokondukcyjne oraz mechaniczną stabilność materiału. Natomiast polimery ulegają szybszej degradacji i poprawiają plastyczność materiału (Chen Q. i wsp., *Progress in Biomaterials*, 1(1), 2, 2012; Velasco M. i wsp., *BioMed Research International*, 1–21, 2015). Znane są połączenia takie jak: fosforan β -trójwapniowy (β -TCP) z poli (kwasem mlekowym) (PLA) (Kikuchi M. i wsp., *Journal of Biomedical Materials Research*, 48(2), 108–110, 1999), hydroksyapatyt z kwasem poli (mlekowo-ko-glikolowy) (PLGA) (Laurencin C.T. i wsp., *Bone*, 19(1 SUPPL.), 93–99, 1996), chitozanem (Xu H.H.K. i wsp., *Biomaterials*, 25(6), 1029–1037, 2004), czy kolagenem (Kane R.J. i wsp., *Acta Biomaterialia*, 17, 16–25, 2015).

Atrakcyjnym polimerem pod względem swoich właściwości biologicznych jest liniowy β -1,3-glukan, nazywany również kurdlanem. Unikalną właściwością kurdlanu jest zdolność do tworzenia w wodnej zawieszynie żelu o strukturze zależnej od temperatury ogrzewania. W zakresie temperatur $55\text{--}65^{\circ}\text{C}$ polimer tworzy słabo utwardzony żel, natomiast po zwiększeniu temperatury do $80\text{--}130^{\circ}\text{C}$ żel przyjmuje stabilną i zwartą formę (Zhang R. i wsp., *Biomacromolecules*, 15(4), 1079–1096, 2014). Ponadto polisacharyd ten jest nietoksyczny i powszechnie stosowany w przemyśle spożywczym jako dodatek do żywności (Miwa M. i wsp., *Food Hydrocolloids*, 119–124, 1994). Co więcej udowodniono, że kurdlan posiada właściwości przeciwnowotworowe i przeciwgrzybicze, a jego pochodne mogą działać przeciw-wirusowo i przeciwzakrzepowo. Kolejne badania wykazały, że kurdlan może uczestniczyć w stymulowaniu odpowiedzi immunologicznej (Chen Y. i wsp., *European Polymer Journal*, 141, 110096, 2020). Polimer ten znalazł zastosowanie w medycynie regeneracyjnej jako m. in. składnik opatrunków (Wójcik M. i wsp., *Materials Science and Engineering C*, 124, 112068, 2021), czy implantów kostnych (Belcarz A. i wsp., *Central European Journal of Biology*, 8(6), 534–548, 2013; Borkowski L. i wsp., *International Journal of Molecular Sciences*, 22(19), 10414, 2021; Klimek K. i wsp., *Journal of Biomedical Ma-*

terials Research – Part A, 104(10), 2528–2536, 2016; Przekora A. i wsp., Materials Science and Engineering C, 58, 891–899, 2016). Chitozan jest również powszechnie stosowany w medycynie regeneracyjnej jako organiczny komponent biomateriałów. Polisacharyd jest wysoce biokompatybilny, posiada działanie bakteriobójcze, bakteriostatyczne i jest dobrze biodegradowalny (Madhumathi K. i wsp., International Journal of Biological Macromolecules, 45(1), 12–15, 2009). Co więcej dzięki swojej hydrofilowej powierzchni promuje adhezję, proliferację i różnicowanie komórek (Muzzarelli R.A.A., Carbohydrate Polymers, 83(4), 1433–1445, 2011).

Z polskiego patentu nr PL235822B1 znany jest sposób otrzymywania makroporowatego rusztowania kostnego (implantu kostnego) składającego się z chitozanu, agarozy oraz ceramiki fosforanowo-wapniowej. Po procesie produkcyjnym, którego kluczowymi elementami są zastosowanie środka spieniającego (wodorowęglanu sodu) oraz procesu liofilizacji, materiał jest inkubowany w roztworze NaOH w celu neutralizacji pozostałości kwasu octowego. Ostateczny kształt materiału zależy od kształtu formy, w której umieszczane są składniki.

Z opisu patentów PL206394B1 oraz EP2421570B1 znany jest skład biomateriału kompozytowego (implantu kostnego) zawierającego β -1,3-glukan oraz ceramikę fosforanowo-wapniową zastosowaną w postaci granul. Sposób produkcji opiera się na zmieszaniu wodnego roztworu β -1,3-glukan z ceramiką, a następnie ogrzewaniu powstałej mieszaniny przez 5–30 minut w temperaturze 80–100°C.

Z polskiego opisu patentu PL229329B1 znany jest sposób wytwarzania rusztowania kostnego (implantu kostnego) na bazie β -1,3-glukanu oraz ceramiki fosforanowo-wapniowej. Metoda produkcji charakteryzuje się tym, że procedura przeprowadzana jest w temperaturze pokojowej.

Roztwór β -1,3-glukan w zasadzie sodowej miesza się z ceramiką fosforanowo-wapniową, całość umieszcza się w workach dializacyjnych i inkubuje w roztworze soli wapniowej.

Z opisu patentu US9757494B2 znane są dwie metody wytwarzania porowatych polisacharydowych rusztowań kostnych zawierających nanohydroksyapatyt. Pierwszy sposób charakteryzuje się dodaniem środka porotwórczego, np. chlorku sodu, chlorku wapnia czy wodorowęglanu sodu do alkalicznego roztworu polisacharydu (np. kurdlanu lub chitozanu), hydroksyapatytu oraz środka sieciującego, np. trimetafosforanu trisodowego (STMP) lub trichlorku fosforylu (POCl_3), a następnie inkubacji w temperaturze 4–80°C. Druga metoda opiera się na poddaniu procesowi sublimacji zamrożonego alkalicznego roztworu zawierającego polisacharyd, np. kurdlan czy chitozan, hydroksyapatyt oraz środek sieciujący, np. trimetafosforan trisodowy (STMP) lub trichlorek fosforylu (POCl_3).

Z opisu chińskiego patentu nr CN101229393A znany jest materiał implantacyjny służący do regeneracji kości składający się z kolagenu, chitozanu i hydroksyapatytu oraz sposób jego wytwarzania. Procedura charakteryzuje się tym, że roztwór hydroksyapatytu oraz pęczniącego chitozanu zostaje zmieszany z roztworem pęczniącego kolagenu. Powstały materiał jest zamrażany, a następnie poddany procesowi liofilizacji.

W polskim patencie nr PL216995B1 opisana jest metoda produkcji kompozytowego materiału zaprojektowanego do wypełniania ubytków kostnych, składającego się z gipsu, chitozanu i hydroksyapatytu. Procedura wytwarzania polega na tym, że proszek zawierający półwodny siarczan wapnia oraz wysokoreaktywny hydroksyapatyt jest zarabiany roztworem chitozanu w wodnym roztworze kwasu octowego.

W polskim opisie patentu nr PL227996B1 przedstawiono sposób produkcji materiału pełniącego rolę substytutu kości na bazie chitozanu, krzemionki oraz hydroksyapatytu. Metoda wytwarzania polega na zmieszaniu wodnego roztworu soli chitozanowej z nanoproszkiem hydroksyapatytu i opcjonalnie z glicerofosforanem wapnia przy użyciu ultradźwięków do utworzenia homogennej masy. Otrzymana pasta jest następnie wprowadzana do zolu kwasu metakrzemowego.

Z opisu patentu US2014072641A1 znana jest metoda produkcji porowatych granulek i/lub agregatów granulek na bazie fosforanu wapnia, które mogą być wykorzystane w przemyśle biomedycznym, np. jako wypełniacze kostne. Proces wytwarzania obejmuje przygotowanie co najmniej jednej mieszaniny uzyskanej poprzez zawieszenie co najmniej jednego rodzaju proszku na bazie ceramiki fosforanowo-wapniowej, np. hydroksyapatytu (HA) lub β -fosforanu trójwapniowego (β -TCP) w wodnym roztworze zawierającym co najmniej jeden naturalny polisacharyd, np. alginian sodu lub chitozan. Następnie zawiesina wytlaczana jest w przepływie laminarnym w postaci kropeł do roztworu sieciującego, np. chlorku wapnia i/lub tripolifosforanu sodu, krople ulegają żelowaniu i przyjmują postać cząsteczek. Cząsteczki są przemylwane w wodzie, suszone oraz automatycznie lub ręcznie rozdzielane.

Z opisu patentu CN101401969A znany jest proces wytwarzania porowatego granulatu implantacyjnego składającego się z kolagenu, chitozanu i hydroksyapatytu w postaci sferycznych cząsteczek. W pierwszym etapie przygotowywana jest zawiesina kolagenu i chitozanu w roztworze kwasu octowego, następnie dodawany jest nanohydroksapatyt. Powstała mieszanina jest dozowana z probówki w postaci kropeł. Następnie cząsteczki są rozdzielane, liofilizowane oraz umieszczone w roztworze środka sieciującego (glioksalu). Na końcu w celu uzyskania kulistej cząsteczki mieszaninę przemycano absolutnym etanolem.

Z opisu patentu CN105597155A znana jest jednonaczyniowa metoda produkcji nanokompozytu hydroksyapatytow-polimerowego w postaci porowatych granul. Proces obejmuje dodanie do roztworu naturalnego polimeru dwóch rodzajów prekursorowych soli: wapniowej (azotanu wapnia, chlorku wapnia) i fosforanowej (np. diwodorofosforanu potasu, wodorofosforanu potasu). Roztwór naturalnego polimeru według patentu oznacza roztwór jednego lub mieszaninę kilku rodzajów polisacharydów, np. chityny, chitozanu, chitooligosacharydu i/lub białek: kolagenu, fibroiny jedwabiu, serycyny lub ich pochodnych. Za pomocą roztworu alkalicznego (wodorotlenku sodu i wody amoniakalnej) doprowadzono mieszaninę do pH o wartości 10–12, a następnie przeprowadzono reakcję strącania. Materiał jest przemycany do zubożenia oraz suszony, np. za pomocą liofilizacji lub w temperaturze 37–40°C. Po wysuszeniu materiał jest miażdżony i przesiewany przez sита w celu uzyskania cząsteczek o trzech rozmiarach: 0,25–0,5 mm, 0,5–1 mm oraz 1–2 mm.

Znane są kompozytowe granule wyprodukowane z hydroksyapatytu oraz chitozanu zmodyfikowaną metodą chemiczną na mokro w temperaturze pokojowej. Procedura wytwarzania charakteryzuje się tym, że kwas fosforowy został wprowadzony bezpośrednio przed syntezą, a następnie otrzymaną mieszaninę wkroplono do zawiesiny wodorotlenku wapnia. Powstałą mieszaninę przechowywano przez 24 godziny w temperaturze pokojowej, a następnie poddano dekantacji. Utworzony osad przemyto wodą destylowaną, zwirowano i zamrożono. W celu wytworzenia granul materiał przesiano przez sита (Zima A., *Spectrochimica Acta – Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 193: 175–84, 2018).

Znany jest biokompatybilny materiał kompozytowy (implant kostny) składający się z chitozanu, β -1,3-glukanu oraz bioceramiki fosforanowo-wapniowej, którą stanowi granul hydroksyapatytu lub beta-fosforan trójwapniowy (β -TCP). Pierwszym etapem produkcji rusztowania jest zmieszanie chitozanu w roztworze kwasu octowego z wodnym roztworem β -1,3-glukanu. Do powstałej mieszaniny dodawana jest faza ceramiczna (granule ceramiczne) i próbkę ogrzewa się w temperaturze 90°C. Po schłodzeniu materiał ulega zubożeniu w 1% roztworze NaOH (Przekora A. i wsp., *Journal of Biotechnology* 182–183(1): 46–53, 2014).

Dotychczas nie zostały opracowane i opisane w dostępnej literaturze naukowej mezoporowate nanokompozytowe granule na bazie matrycy z chitozanu i kurdlanu oraz nanohydroksyapatytu. Zgodnie z aktualnym stanem wiedzy, najbardziej zbliżonym biomateriałem implantacyjnym do przedmiotu wynalazku jest rusztowanie kostne na bazie kurdlanu, chitozanu i granulatu bioceramicznego (Przekora A. i wsp., *Journal of Biotechnology* 182–183(1): 46–53, 2014). Niemniej jednak wspomniany biomateriał nie jest granulem, ale implantem kostnym (w formie walca lub prostopadłościanu) o niskiej mezoporowatości i tym samym SSA, a sposób jego produkcji jest odmienny od przedmiotu wynalazku, tj. wymaga neutralizacji materiału w zasadzie sodowej (NaOH) oraz nie wykorzystuje środka spieniającego i procesu liofilizacji w celu wprowadzenia porów do mikrostruktury biomateriału. Z kolei patent nr PL235822B1 opisuje makroporowate rusztowanie kostne (implant kostny w formie walca), którego sposób otrzymywania wprawdzie jest zbliżony do przedmiotu wynalazku, jednak zawiera dodatkowe etapy w postaci neutralizacji biomateriału w zasadzie sodowej (NaOH) oraz 3-krotnego płukania materiału w wodzie dejonizowanej.

Wynalazek rozwiązuje problem otrzymywania nanokompozytowego granulatu z użyciem kurdlanu, chitozanu oraz nanoproszku hydroksyapatytu, który charakteryzuje się biokompatybilnością, stosunkowo dużą powierzchnią właściwą (SSA w zakresie 23–30 m²/g) oraz wysoką mezoporowatością (porowatość w zakresie 45–50%, wielkość porów w zakresie 2–15 μ m). Dzięki tym właściwościom materiał w postaci granul ma pożądane parametry mikrostrukturalne, ułatwiające dostęp dla płynów ustrojowych, enzymów i komórek kościogubnych (osteoklastów), co gwarantuje jego całkowitą bioresorpcję po implantacji w miejscu ubytku kostnego. Co ważne, matryca na bazie chitozanu i kurdlanu (spoiwo dla nanocząstek HA) jest również łatwo biodegradowalna w zakwaszonym środowisku podczas procesu resorpcji za pośrednictwem osteoklastów (Przekora A. i wsp., *Carbohydrate Polymers*, 119914, 2022).

Granule otrzymuje się dzięki zastosowaniu spiekanego w wysokiej temperaturze nanohydroksyapatytu (> 900°C, korzystnie 1100°C) w celu uniknięcia efektu cytotoksycznego związanego z wysoką

reaktywnością jonową ceramiki spiekanej w niskiej temperaturze ($< 900^{\circ}\text{C}$). Ponadto istotne jest zastosowanie połączenia procesu liofilizacji ze środkiem spieniającym (wodorowęglanem sodu, NaHCO_3), którego reakcja z kwasem octowym (CH_3COOH) oraz rozkład pod wpływem wysokiej temperatury są źródłem dwutlenku węgla (CO_2), który jest porogenerem generującym powstanie mezoporów w mikrostrukturze granul (z definicji są to pory o średnicy w zakresie $2\text{--}50\text{ }\mu\text{m}$) (Sachot N. i wsp., *Current Organic Chemistry*, 18(18), 2299–2314, 2014; Karageorgiou V. i wsp., *Biomaterials*, 26(27), 5474–5491, 2005).

Nanokompozytowy granulat hydroksyapatytowo-polimerowy według wynalazku zsyntetyzowany jest z biopolimerów: kurdlanu i chitozanu oraz bioceramiki fosforanowo-wapniowej w postaci nanoproszku hydroksyapatytu spiekane w temperaturze $> 900^{\circ}\text{C}$, korzystnie 1100°C , zawieszonych w $0,5\text{--}2\%$ wodnym roztworze kwasu octowego, gdzie proporcje wagowe komponentów wynoszą: $4\text{--}8\%$ (w/v) kurdlanu, $1\text{--}4\%$ (w/v) chitozanu oraz $20\text{--}50\%$ (w/v) nanoproszku hydroksyapatytu w stosunku do kwasu octowego.

Korzystnie, gdy kurdlan stosowany jest w stężeniu 4% w/v w odniesieniu do kwasu octowego.

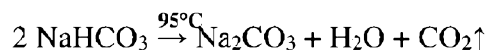
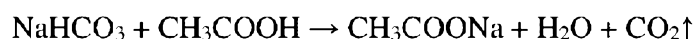
Korzystnie, gdy chitozan stosowany jest w stężeniu 2% w/v w odniesieniu do kwasu octowego.

Korzystnie, gdy nanoproszek hydroksyapatytu stosowany jest w ilości 40% w/v w odniesieniu do kwasu octowego.

Sposób wytwarzania nanokompozytowego granulatu hydroksyapatytowo-polimerowego według wynalazku polega na tym, że do $1\text{--}4\%$ (w/v) roztworu chitozanu, korzystnie 2% (w/v), przygotowanego w $0,5\text{--}2\%$ (v/v) wodnym roztworze kwasu octowego, korzystnie 2% (v/v), dodaje się kolejno $4\text{--}8\%$ (w/v) kurdlanu, korzystnie 4% , oraz $20\text{--}50\%$ (w/v) nanoproszku hydroksyapatytu (spiekane w temperaturze $> 900^{\circ}\text{C}$, korzystnie 1100°C), korzystnie 40% w odniesieniu do kwasu octowego, następnie do uzyskanej masy dodaje się $0,5\text{--}2\%$ (w/v) wodorowęglanu sodu, korzystnie 2% (w/v) i całość miesza się, po czym mieszalinę przenosi się do formy termicznie odpornej, i inkubuje się w łaźni wodnej w temperaturze $90\text{--}95^{\circ}\text{C}$, korzystnie 95°C , przez $15\text{--}25$ minut, korzystnie 20 minut, a następnie schładza w łaźni lodowej w temperaturze $4\text{--}6^{\circ}\text{C}$, po czym próbkę umieszcza się w zamrażarce w temperaturze od -65 do -80°C na okres 2 godzin, następnie zamrożoną próbkę poddaje się procesowi liofilizacji ($1\text{--}15\text{ Pa}$) przez okres do 19 godzin lub do momentu całkowitego wysuszenia próbki, po czym otrzymany materiał poddaje się zanurzeniu w roztworze soli fizjologicznej buforowanej fosforanami (PBS) z jonami wapnia i magnezu na okres do $1,5$ godziny, następnie pozostawia się do wyschnięcia na powietrzu, po czym uzyskany materiał poddaje się procesowi granulacji oraz selekcji z wykorzystaniem sit laboratoryjnych celem uzyskania granul o pożądanej wielkości, korzystnie $0,3\text{--}0,4\text{ mm}$.

Mezoporowata mikrostruktura materiału została wytworzona dzięki połączeniu następujących czynników:

- zastosowania procesu liofilizacji, podczas której dochodzi do sublimacji rozpuszczalnika
- wykorzystania środka pianotwórczego – wodorowęglanu sodu (NaHCO_3), którego reakcja z kwasem octowym (CH_3COOH) oraz rozkład pod wpływem wysokiej temperatury są źródłem dwutlenku węgla (CO_2):



Zaletą opracowanego według wynalazku sposobu wytwarzania granul nanokompozytowych jest otrzymanie optymalnych właściwości mikrostrukturalnych dzięki zastosowaniu połączenia procesu liofilizacji ze środkiem spieniającym. Warto podkreślić, że w opisanym sposobie produkcji matryca na bazie kurdlanu i chitozanu będzie służyć jako spoiwo dla cząstek nanoHA. Ważną cechą granulatu wg wynalazku jest zastosowanie do jego produkcji spiekane w wysokiej temperaturze nanohydroksyapatytu ($> 900^{\circ}\text{C}$, korzystnie 1100°C) w celu uniknięcia efektu cytotoksycznego związanego z wysoką reaktywnością jonową ceramiki spiekanej w niskiej temperaturze ($< 900^{\circ}\text{C}$). Uzyskane właściwości granul, a mianowicie brak toksyczności w stosunku do komórek eukariotycznych, wysoka mezoporowatość ($45\text{--}50\%$ wielkość porów w zakresie $2\text{--}15\text{ }\mu\text{m}$) oraz duża powierzchnia właściwa (SSA w zakresie $23\text{--}30\text{ m}^2/\text{g}$) potencjalnie będą sprzyjać procesowi regeneracji w miejscu implantacji, jednocześnie zapewniając dobrą bioresorpcję granulatu przez osteoklasty. Dzięki zastosowaniu opisanego w patencie sposobu produkcji, granulaty posiadają mezoporowatą mikrostrukturę (średnica porów w zakresie $2\text{--}15\text{ }\mu\text{m}$) oraz stosunkowo dużą powierzchnię właściwą (SSA), dzięki którym będą łatwo dostępne dla płynów ustrojowych,

osteoklastów i enzymów (m.in. metaloproteinaz macierzy pozakomórkowej) podczas przebudowy kości, a tym samym będą łatwo bioabsorbowalne. Ponadto matryca na bazie chitozanu i kurdlanu (spoiwo dla nanocząstek HA) będzie łatwo biodegradowalna w zakwaszonym środowisku podczas procesu resorpcji za pośrednictwem osteoklastów. Materiał według wynalazku wykazuje zdolność do całkowitej bioreSORPCJI po implantacji w miejscu ubytku kostnego, dzięki czemu po spełnieniu swojej funkcji granulaty nie będzie zalegać w organizmie. Materiał nie traci swoich właściwości w przypadku sterylizacji przy użyciu tlenu etylenu.

Ze względu na bardzo dobre właściwości biologiczne i mikrostrukturalne, bioabsorbowalne nanokompozytowe granulaty będą sprzyjać procesom regeneracyjnym w miejscu ubytku kostnego i mogą być stosowane jako materiał implantacyjny w chirurgii szczękowo-twarzowej, ortopedii i stomatologii.

Przedmiot wynalazku ilustrują przedstawione poniżej przykłady:

Przykład I

Do 4 ml 1% (v/v) wodnego roztworu kwasu octowego dodano 0,08 g chitozanu i mieszano. Do uzyskanej masy dodano 0,16 g kurdlanu, całość zmieszano, a następnie dodano 0,8 g nanoproszku hydroksyapatytu i całość mieszano do uzyskania jednolitej masy. Następnie dodano 0,04 g wodorowęglanu sodu, wymieszano i otrzymaną masę przeniesiono do formy odpornej na działanie wysokiej i ultraniskiej temperatury o obj. 2 cm³. Formę inkubowano w łaźni wodnej w temperaturze 94°C przez 20 minut, a następnie ostudzono w łaźni lodowej w temperaturze 2°C. Następnie biomateriał umieszczono w zamrażarce w temperaturze -80°C na okres 2 godzin. Zamrożoną próbkę poddano procesowi liofilizacji w średniej próżni (10 Pa) przez okres 19 godzin. Uzyskany materiał przeniesiono do roztworu PBS i moczo no przez 1,5 godziny. Po wyjęciu materiał suszono na powietrzu w temperaturze pokojowej przez 48 godzin. Następnie materiał poddano procesowi granulowania i selekcji przez sита laboratoryjne celem uzyskania granul o średnicy 0,3–0,4 mm. Uzyskane granulaty poddano sterylizacji tlenkiem etylenu (3 godziny, 55°C). W celu odprowadzenia tlenu etylenu po procesie sterylizacji, zapakowane granulaty poddano 15-godzinnemu wentylowaniu.

Otrzymany granulaty charakteryzuje się brakiem cytotoksyczności, sprzyja adhezji i proliferacji osteoblastów na jego powierzchni, posiada całkowitą porowatość ok. 48% oraz SSA ok. 25 m²/g.

Przykład II

Do 4 ml 2% (v/v) wodnego roztworu kwasu octowego dodano 0,08 g chitozanu i mieszano. Do uzyskanej masy dodano 0,24 g kurdlanu, całość zmieszano, a następnie dodano 1,2 g nanoproszku hydroksyapatytu i całość mieszano do uzyskania jednolitej masy. Następnie dodano 0,08 g wodorowęglanu sodu, wymieszano i otrzymaną masę przeniesiono do formy odpornej na działanie wysokiej i ultraniskiej temperatury o obj. 2 cm³. Formę inkubowano w łaźni wodnej w temperaturze 95°C przez 20 minut, a następnie ostudzono w łaźni lodowej w temperaturze 2°C. Następnie biomateriał umieszczono w zamrażarce w temperaturze -80°C na okres 2 godzin. Zamrożoną próbkę poddano procesowi liofilizacji w średniej próżni (10 Pa) przez okres 19 godzin. Uzyskany materiał przeniesiono do roztworu PBS i moczo no przez 1 godzinę. Po wyjęciu materiał suszono na powietrzu w temperaturze pokojowej przez 48 godzin. Następnie materiał poddano procesowi granulowania i selekcji przez sита laboratoryjne celem uzyskania granul o średnicy 0,2–0,3 mm. Uzyskane granulaty poddano sterylizacji tlenkiem etylenu (3 godziny, 55°C). W celu odprowadzenia tlenu etylenu po procesie sterylizacji, zapakowane granulaty poddano 15-godzinnemu wentylowaniu.

Otrzymany granulaty charakteryzuje się brakiem cytotoksyczności, sprzyja adhezji i proliferacji osteoblastów na jego powierzchni, posiada całkowitą porowatość ok. 47% oraz SSA ok. 28 m²/g.

Przykład III

Do 4 ml 2% (v/v) wodnego roztworu kwasu octowego dodano 0,08 g chitozanu i mieszano. Do uzyskanej masy dodano 0,16 g kurdlanu, całość zmieszano, a następnie dodano 1,6 g nanoproszku hydroksyapatytu i całość mieszano do uzyskania jednolitej masy. Następnie dodano 0,08 g wodorowęglanu sodu, wymieszano i otrzymaną masę przeniesiono do formy odpornej na działanie wysokiej i ultraniskiej temperatury o obj. 2 cm³. Formę inkubowano w łaźni wodnej w temperaturze 95°C przez 20 minut, a następnie ostudzono w łaźni lodowej w temperaturze 2°C. Następnie biomateriał umieszczono w zamrażarce w temperaturze -80°C na okres 2 godzin. Zamrożoną próbkę poddano procesowi liofilizacji w średniej próżni (10 Pa) przez okres 19 godzin. Uzyskany materiał przeniesiono do roztworu PBS i moczo no przez 1,5 godziny. Po wyjęciu materiał suszono na powietrzu w temperaturze pokojowej przez 48 godzin. Następnie materiał poddano procesowi granulowania i selekcji przez sита laboratoryjne celem uzyskania granul o średnicy 0,3–0,4 mm. Uzyskane granulaty poddano sterylizacji tlenkiem etylenu

(3 godziny, 55°C). W celu odprowadzenia tlenu etylenu po procesie sterylizacji, zapakowane granulki poddano 15-godzinemu wentylowaniu.

Otrzymany granulát charakteryzuje się brakiem cytotoksyczności, sprzyja adhezji i proliferacji osteoblastów na jego powierzchni, posiada całkowitą porowatość ok. 50% oraz SSA ok. 30 m²/g.

Przykład IV

Do 4 ml 2% (v/v) wodnego roztworu kwasu octowego dodano 0,08 g chitozanu i mieszano. Do uzyskanej masy dodano 0,24 g kurdlanu, całość zmieszano, a następnie dodano 2,0 g nanoproszku hydroksyapatytu i całość mieszano do uzyskania jednolitej masy. Następnie dodano 0,08 g wodorowęglanu sodu, wymieszano i otrzymaną masę przeniesiono do formy odpornej na działanie wysokiej i ultraniskiej temperatury o obj. 2 cm³. Formę inkubowano w łaźni wodnej w temperaturze 95°C przez 20 minut, a następnie ostudzono w łaźni lodowej w temperaturze 2°C. Następnie biomateriał umieszczono w zamrażarce w temperaturze -80°C na okres 2 godzin. Zamrożoną próbkę poddano procesowi liofilizacji w średniej próżni (10 Pa) przez okres 19 godzin. Uzyskany materiał przeniesiono do roztworu PBS i moczo 1–1,5 godziny. Po wyjęciu materiał suszono na powietrzu w temperaturze pokojowej przez 48 godzin. Następnie materiał poddano procesowi granulowania i selekcji przez sита laboratoryjne celem uzyskania granul o średnicy 0,3–0,4 mm. Uzyskane granule poddano sterylizacji tlenkiem etylenu (3 godziny, 55°C). W celu odprowadzenia tlenu etylenu po procesie sterylizacji, zapakowane granulki poddano 15-godzinemu wentylowaniu.

Otrzymany granulát charakteryzuje się brakiem cytotoksyczności, sprzyja adhezji i proliferacji osteoblastów na jego powierzchni, posiada całkowitą porowatość ok. 4 % oraz SSA ok. 30 m²/g.

Przykład V

Do 4 ml 2% (v/v) wodnego roztworu kwasu octowego dodano 0,08 g chitozanu i mieszano. Do uzyskanej masy dodano 0,32 g kurdlanu, całość zmieszano, a następnie dodano 2,0 g nanoproszku hydroksyapatytu i całość mieszano do uzyskania jednolitej masy. Następnie dodano 0,08 g wodorowęglanu sodu, wymieszano i otrzymaną masę przeniesiono do formy odpornej na działanie wysokiej i ultraniskiej temperatury o obj. 2 cm³. Formę inkubowano w łaźni wodnej w temperaturze 90°C przez 20 minut, a następnie ostudzono w łaźni lodowej w temperaturze 2°C. Następnie biomateriał umieszczono w zamrażarce w temperaturze -80°C na okres 2 godzin. Zamrożoną próbkę poddano procesowi liofilizacji w średniej próżni (10 Pa) przez okres 19 godzin. Uzyskany materiał przeniesiono do roztworu PBS i moczo 1–1,5 godziny. Po wyjęciu materiał suszono na powietrzu w temperaturze pokojowej przez 48 godzin. Następnie materiał poddano procesowi granulowania i selekcji przez sита laboratoryjne celem uzyskania granul o średnicy 0,4–0,6 mm. Uzyskane granule poddano sterylizacji tlenkiem etylenu (3 godziny, 55°C). W celu odprowadzenia tlenu etylenu po procesie sterylizacji, zapakowane granulki poddano 15-godzinemu wentylowaniu.

Otrzymany granulát charakteryzuje się brakiem cytotoksyczności, sprzyja adhezji i proliferacji osteoblastów na jego powierzchni, posiada całkowitą porowatość ok. 47% oraz SSA ok. 30 m²/g.

Przykład VI

Do 4 ml 1% (v/v) wodnego roztworu kwasu octowego dodano 0,04 g chitozanu i mieszano. Do uzyskanej masy dodano 0,16 g kurdlanu, całość zmieszano, a następnie dodano 1,6 g nanoproszku hydroksyapatytu i całość mieszano do uzyskania jednolitej masy. Następnie dodano 0,04 g wodorowęglanu sodu, wymieszano i otrzymaną masę przeniesiono do formy odpornej na działanie wysokiej i ultraniskiej temperatury o obj. 2 cm³. Formę inkubowano w łaźni wodnej w temperaturze 95°C przez 20 minut, a następnie ostudzono w łaźni lodowej w temperaturze 2°C. Następnie biomateriał umieszczono w zamrażarce w temperaturze -80°C na okres 2 godzin. Zamrożoną próbkę poddano procesowi liofilizacji w średniej próżni (10 Pa) przez okres 19 godzin. Uzyskany materiał przeniesiono do roztworu PBS i moczo przez 1,5 godziny. Po wyjęciu materiał suszono na powietrzu w temperaturze pokojowej przez 48 godzin. Następnie materiał poddano procesowi granulowania i selekcji przez sита laboratoryjne celem uzyskania granul o średnicy 0,3–0,4 mm. Uzyskane granule poddano sterylizacji tlenkiem etylenu (3 godziny, 55°C). W celu odprowadzenia tlenu etylenu po procesie sterylizacji, zapakowane granulki poddano 15-godzinemu wentylowaniu.

Otrzymany granulát charakteryzuje się brakiem cytotoksyczności, sprzyja adhezji i proliferacji osteoblastów na jego powierzchni, posiada całkowitą porowatość ok. 47% oraz SSA ok. 25 m²/g.

Zastrzeżenia patentowe

1. Nanokompozytowy granulat hydroksyapatytowo-polimerowy na bazie matrycy kurdlanowo-chitozanowej **znamienny tym**, że stanowi go kurdlan, chitozan, oraz bioceramika fosforanowo-wapniowa w postaci nanoproszku hydroksyapatytu spiekanego w temperaturze $> 900^{\circ}\text{C}$, korzystnie 1100°C , rozproszone w wodnym roztworze kwasu octowego o stężeniu 0,5–2%, gdzie proporcje wagowe stałych komponentów wynoszą 4–8% (w/v) kurdlanu, 1–4% (w/v) chitozanu i 20–50% (w/v) ceramiki fosforanowo-wapniowej w stosunku do kwasu octowego.
2. Nanokompozytowy granulat według zastrz. 1, **znamienny tym**, że kurdlan występuje w ilości 4% w/v w stosunku do kwasu octowego.
3. Nanokompozytowy granulat zastrz. 1 **znamienny tym**, że chitozan występuje w ilości 2% w/v w stosunku do kwasu octowego.
4. Nanokompozytowy granulat według zastrz. 1 **znamienny tym**, że nanoproszek hydroksyapatytu występuje w ilości 40% w/v w stosunku do kwasu octowego.
5. Sposób wytwarzania nanokompozytowego granulatu hydroksyapatytowo-polimerowego **znamienny tym**, że do 1–4% (w/v) roztworu chitozanu, przygotowanego w 0,5–2% (v/v) wodnym roztworze kwasu octowego, dodaje się kolejno 4–8% (w/v) kurdlanu, oraz 20–50% (w/v) spiekanego w temperaturze $> 900^{\circ}\text{C}$, korzystnie 1100°C nanoproszku hydroksyapatytu, w odniesieniu do kwasu octowego, następnie do uzyskanej masy dodaje się 0,5–2% (w/v) wodorowęglanu sodu i całość miesza się, po czym mieszaninę inkubuje się w temperaturze $90\text{--}95^{\circ}\text{C}$, korzystnie 95°C , przez 15–25 minut, korzystnie 20 minut, a następnie schładza w temperaturze $4\text{--}6^{\circ}\text{C}$, po czym otrzymany materiał zamraża się w temperaturze od -65 do -80°C przez okres 2 godzin, następnie zamrożony materiał poddaje się procesowi liofilizacji (1–15 Pa) przez okres do 19 godzin lub do momentu całkowitego wysuszenia próbki, po czym otrzymaną masę zanurza się w roztworze soli fizjologicznej buforowanej fosforanami (PBS) z jonami wapnia i magnezu na okres do 1,5 godziny, po czym wysuszony na powietrzu materiał poddaje się granulacji.
6. Sposób według zastrz. 5 **znamienny tym**, że kurdlan jest używany w ilości 4% w/v w stosunku do kwasu octowego.
7. Sposób według zastrz. 5 **znamienny tym**, że chitozan jest używany w ilości 2% w/v w stosunku do kwasu octowego.
8. Sposób według zastrz. 5 **znamienny tym**, że nanoproszek hydroksyapatytu jest używany w ilości 40% w/v w stosunku do kwasu octowego.
9. Sposób według zastrz. 5 **znamienny tym**, że wodorowęglan sodu (NaHCO_3) jest używany w ilości 2% w/v w stosunku do kwasu octowego.
10. Sposób według zastrz. 5 **znamienny tym**, że kwas octowy (CH_3COOH) jest używany w stężeniu 2% v/v.
11. Sposób według zastrz. 5 **znamienny tym**, że proces liofilizacji prowadzi się przez okres do 19 godzin lub do momentu całkowitego wysuszenia próbki.
12. Sposób według zastrz. 5 **znamienny tym**, że po zgranulowaniu poddaje się go selekcji z wykorzystaniem sit laboratoryjnych celem uzyskania granul o pożądanej wielkości, korzystnie 0,3–0,4 mm.