



(21) Numer zgłoszenia: **427909**

(22) Data zgłoszenia: **28.11.2018**

(51) Int.Cl.

A61K 38/55 (2006.01)

A61K 47/34 (2017.01)

A61L 27/28 (2006.01)

A61L 27/52 (2006.01)

A61L 27/54 (2006.01)

(54) **Kompozycja zawierająca cystatynę oraz jej zastosowanie w implantologii kostnej**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
01.06.2020 BUP 12/20

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
24.01.2022 WUP 04/22

(73) Uprawniony z patentu:

**UNIWERSYTET MEDYCZNY IM. PIASTÓW
ŚLĄSKICH WE WROCŁAWIU, Wrocław, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

**PRZEMYSŁAW BARANOWSKI, Oleśnica, PL
KRZYSZTOF GOŁĄB, Wrocław, PL
JAKUB GBUREK, Wrocław, PL
JANUSZ PLUTA, Wrocław, PL
BOŻENA KAROLEWICZ, Wrocław, PL
JOANNA ANTOSZEWSKA-SMITH, Wrocław, PL
KATARZYNA JADWIGA JUSZCZYŃSKA,
Wrocław, PL
TADEUSZ PRZEMYSŁAW SEBZDA,
Bielany Wrocławskie, PL**

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Andrzej Witek

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest kompozycja farmaceutyczna zawierająca cystatynę oraz poloksamer P407 i karbomer 971P lub karbomer 974P oraz inne związki, takie jak nipaginy oraz zastosowanie jej w implantologii kostnej, w szczególności do powlekania implantów lub też do podawania w miejsce mocowania implantów w celu wspomaganie ich efektywnej osseointegracji.

Cystatyny posiadają właściwości inhibitorowe względem proteaz uczestniczących w resorpcji kości, stymulują powstawanie i mineralizację kości, działają również immunosupresyjnie i antymikrobiologicznie. Ze względu na wszystkie te właściwości pokrycie TSAD (ang. *Temporary Skeletal Anchorage Devices*) warstwą cystatynową lub jej podanie do miejsca mocowania może jednocześnie zapobiec zjawiskom resorpcji kości w okolicy TSADu, sprzyjać jego obrastaniu przez nową tkankę kostną, hamować jego odrzucenie na drodze immunologicznej, jak i zapobiegać nadkażeniom mikrobiologicznym (Goto T, Yamaza T, Tanaka T.: Cathepsins in the osteoclast. *J Electron Microsc* (Tokyo), 2003, 52(6):551–8; Everts V, Korper W, Hoeben KA, Jansen ID, Bromme D, Cleutjens KB, Heeneman S, Peters C, Reinheckel T, Saftig P, Beertsen W.: Osteoclastic bone degradation and the role of different cysteine proteinases and matrix metalloproteinases: differences between calvaria and long bone. *J Bone Miner Res*. 2006, 9, 1399–408; Danjo A, Yamaza T, Kido MA, Shimohira D, Tsukuba T, Kagiya T, Yamashita Y, Nishijima K, Masuko S, Goto M, Tanaka T.: Cystatin C stimulates the differentiation of mouse osteoblastic cells and bone formation. *Biochem Biophys Res Commun.*, 2007, 360, 199–204).

W międzynarodowym zgłoszeniu PCT WO200156627A1 opisano urządzenie medyczne do stosowania na lub w ciele pacjenta, który to wyrób jest pokryty jednym lub większą liczbą naturalnie występujących peptydów lub białek lub peptydów syntetycznych i ich analogów o działaniu przeciwdrobnoustrojowym, które to peptydy i białka są wybrane z grupy składającej się z: peptydów pochodzących z cystatyny, peptydów pochodzących z cystatyny, peptydów pochodzących z laktoferyny i specyficznych inhibitorów proteinyazy.

W polskim opisie patentowym PL219098B1 opisano kompozycję farmaceutyczną do leczenia chorób przyzębia, zarówno w stomatologicznym leczeniu otwartym i w leczeniu szpitalnym, jak też w chirurgii stomatologicznej. Kompozycja obejmuje: bazę kompozycji w ilości 20% do 50% masowych, stanowiące nośnik substancje żelujące w ilości 7 do 20% masowych, dodatki w ilości 5 do 25% masowych oraz wodę w ilości do 100% masowych. Baza kompozycji zawiera inhibitor peptydaz cysteinowych, zwłaszcza pochodzący z białka jaj, o aktywności 1–50 jednostek inhibitorowych, zawieszony w 50 g glicerolu i 50 g 0,05 molowego roztworu buforu fosforanowego o pH 6,0 do 7,5. Substancjami żelującymi są metyloceluloza, hydroksypropylometyloceluloza, sól sodowa karboksymetylocelulozy, żelatyna, pektyna cytrusowo-jabłkowa lub dekstran, bądź mieszanina tych substancji, natomiast dodatki stanowią alkohole wielowodorotlenowe.

W innym polskim opisie patentowym PL218970B1 zastrzeżono kompozycję farmaceutyczną do leczenia chorób skórnych w postaci płynów, żelów, emulsji, kremów lub maści. Składnikiem czynnym jest inhibitor cysteinowych peptydaz pochodzący z białka jaj, z moczu, z wód płodowych ludzi i zwierząt, z łożyska ludzi i zwierząt oraz z roślin, z mikroorganizmów lub wytworzony syntetycznie, o aktywności od 1 do 50 jednostek inhibitorowych. Składnik czynny jest zawieszony w 50 g glicerolu lub PEG, zmieszany z 0,05 molowym roztworem buforu fosforanowego o pH 6,0 do 7,5, przy czym jako podłoże dla składnika czynnego zawiera dodatki w postaci węglowodorów stałych, węglowodorów płynnych, wosków, emulgatorów i/lub substancji żelujących.

W kolejnym polskim opisie patentowym PL195665B1 ujawniono środek farmaceutyczny w postaci żelu do stosowania miejscowego w leczeniu chorób przyzębia zawierający substancję czynną, hydroksypropylometylocelulozę, glikol propylenowy i konserwanty. Substancję czynną stanowi inhibitor proteaz serynowych i/lub inhibitor proteaz cysteinowych w ilości nie mniej niż 100 jednostek każdego z inhibitorów w 1 g preparatu.

Mimo ogólnie stosunkowo wysokiej skuteczności implantacji, niepowodzenia w stosowaniu implantów u niektórych pacjentów wymuszają wręcz na badaczach konieczność poszukiwania czynników sprzyjających efektywnemu zrastaniu się tkanki kostnej z tytanową powierzchnią implantu czyli tzw. osseointegracji. W przypadku niepowodzeń obserwuje się całkowity lub częściowy brak tego zjawiska. Osseointegracja może też wystąpić jedynie przez pewien czas i zaniknąć. Nie zawsze znane są przyczyny takich niepowodzeń. Często mogą one zależeć od czynników natury biologicznej, np. kość może być zbyt słabo unaczyniona, lub jej jakość czy zwartość mogą się okazać nieodpowiednie. Obluzowanie zamocowania implantu może wiązać się także z niekorzystną remodelacją kości w miejscu mocowania

w związku z reakcjami immunologicznymi, aktywacją podrażnionych mechanicznie osteoklastów lub na skutek nadkażeń mikroorganizmami, które dostają się w głąb tkanki kostnej podczas zabiegu chirurgicznego.

W procesie remodelingu uczestniczą między innymi proteiny cysteinowe rodziny papainowej, głównie katepsyna B, L i K, które wydzielane są do macierzy międzykomórkowej przez osteoklasty. Proteazy cysteinowe są również wykorzystywane przez szereg bakterii (*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Periphyromonas gingivalis*), pasożytów (*Trypanosoma cruzi*, *Leishmania donovani*) i grzybów (*Candida albicans*, *Candida parapsilosis* i *Candida tropicalis*) w procesie inwazji do degradacji tkanek gospodarza oraz są niezbędne dla proliferacji niektórych wirusów (*Polio*, *Picornavirus*).

W warunkach fizjologicznych nadmierna aktywność tych enzymów jest ograniczana przez ich endogenne inhibitory zwane cystatynami. Dlatego też cystatyny są rozważane jako potencjalne leki w terapii chorób, w przebiegu których stwierdza się nadmierną aktywność proteolityczną lub chorób związanych z infekcją mikroorganizmami. Stwierdzono również, że cystatyny stymulują różnicowanie się osteoblastów i formowanie oraz mineralizację kości. Cystatyny posiadają także właściwości immunosupresyjne poprzez hamowanie leguminyazy i katepsyny S biorących udział w prezentacji antygenów przy udziale MHC klasy II.

Zastosowanie cystatyn w medycynie było przedmiotem patentów i zgłoszeń patentowych na świecie. W polskim dokumencie patentowym, PAT.217192, ujawniono zastosowanie liofilizatu monomeru inhibitora proteaz cysteinowych, którym jest owocystatyna, jako substancję czynną środka farmaceutycznego stosowanego w profilaktyce i/lub leczeniu zmian otępiennych, w tym zapobieganiu i hamowaniu deterioracji funkcji poznawczych, zwłaszcza postępujących wraz z rozwojem procesu otępiennego, szczególnie w chorobie Alzheimera oraz w procesie starzenia. Z kolei w japońskim zgłoszeniu patentowym, JP2017205111A, ujawniono kompozycję białkową zawierającą angiogenninę i/lub produkty jej rozkładu w ilości od 2 do 15 mg/100 mg i cystatyny i/lub produkty jej rozkładu o stosunku masowym do angiogenniny w zakresie od 0,003 do 0,6. W wyniku zastosowania kompozycji białkowej kości mogą zostać wzmocnione, przez co może ona zapobiegać i leczyć różne choroby kości, takie jak osteoporoza, złamania kości, reumatyzm i zapalenie stawów. W dokumencie US2918153789A1 ujawnienie dotyczy kompozycji doustnej do zmniejszania wrażliwości zębów. Doustna kompozycja zawiera cynk i sól miedzi zdolną do powlekania i zamykania kanalików dentystrycznych przez aglomerowanie białek, zapewniając w krótkim czasie wpływ na zapobieganie lub redukcję objawów nadwrażliwości zębów. Kompozycja zawiera środek spieniający (anionowy środek powierzchniowo czynny, taki jak alkilosiarczan sodu i laurylosiarczan sodu), niejonowy środek powierzchniowo czynny (kopolimer (poloksamer) polioksyetyleno-polioksypropylenu, polioksyetylowany uwodorniony olej rycynowy lub polioksyetylenosorbitan) oraz ester kwasu tłuszczowego. Środek spieniający może występować w ilości 0,5 do 5% wagowych w przeliczeniu na całkowitą masę doustnej kompozycji, a korzystnie 0,5 do 3,5% wagowych. Z polskiego patentu PAT.219098 znana jest kompozycja farmaceutyczna do leczenia chorób przyzębia, zarówno w stomatologicznym leczeniu otwartym i w leczeniu szpitalnym, jak też w chirurgii stomatologicznej. Kompozycja farmaceutyczna ma postać żelu o dobranej lepkości. Jej składnikiem czynnym jest baza, składająca się z inhibitora cysteinowych peptydaz, pochodzącego z białka jaj, z moczu, z wód płodowych ludzi i zwierząt, z łożyska ludzi i zwierząt oraz z roślin, o aktywności 1–50 jednostek inhibitorowych, który jest zawieszony w 50 g alkoholu wielowodorotlenowego i 50 g 0,05 molowego roztworu buforu fosforanowego o pH od 6,0 do 7,5, w ilości 20 do 50% masowych, zaś jej nośnikiem są substancje żelujące w ilości 7 do 20% masowych oraz woda w ilości do 100% masowych. Substancjami żelującymi są metyloceluloza, hydroksypropylometyloceluloza, sól sodowa karboksymetylocelulozy, żelatyna, pektyna cytrusowo-jabłkowa lub dekstran. Korzystne jest stosowanie dodatków w postaci alkoholi wielowodorotlenowych i kompozycji Nipagin.

Mimo wysokiej skuteczności implantacji (93,43%), niepowodzenia stosowania – szczególnie nieuzasadnione w żuchwie, gdzie blaszka korykalna powinna zapewniać dobrą retencję mechaniczną TSAD – wymuszają nie tylko konieczność poszukiwania czynników sprzyjających dezintegracji mini implantów, ale i aktywne próby stworzenia warunków zapobiegających ich przedwczesnej utracie. Obluzowanie zamocowania TSAD może wiązać się ze zjawiskiem remodelacji kości w miejscu wkrętu w drodze bezpośredniej aktywacji podrażnionych mechanicznie osteoklastów lub wtórnie na skutek nadkażeń mikroorganizmami, które poprzez nacięcie w dziąśle dostają się w głąb tkanki kostnej wraz z TSAD. Dlatego wciąż poszukuje się preparatów wspomagających remodelację kości, podtrzymujących proces

osseointegracji oraz hamujących, czy wręcz uniemożliwiających nadkażenie mikroorganizmami podczas zabiegów chirurgicznych. Przy czym tego typu preparat powinien także być łatwy w stosowaniu, łatwy do podawania miejscowego, niepodrażniający tkanki jamy ustnej oraz wykazujący dużą przyczepność do powierzchni implantów czy tkanek twardych. Ponadto tego typu preparat powinien charakteryzować się długim okresem stabilności. Niespodziewanie powyższe problemy rozwiązał prezentowany wynalazek.

Pierwszym przedmiotem wynalazku jest kompozycja implantologiczna zawierająca cystatynę, nośnik, substancję zobojętniającą, wodę albo bufor, charakteryzująca się tym, że zawiera cystatynę o aktywności właściwej przynajmniej 10 jednostek inhibitorowych na miligram białka w ilości 0,02% (wagowo), substancję nośną w ilości od 15,0% do 20,0% (wagowo), i substancję zobojętniającą w ilości nie większej niż konieczna do uzyskania pH wynoszącego $7,40 \pm 0,05$, korzystnie wybraną z grupy zawierającej: NaOH albo TEA, i kompozycja zawiera wodę dejonizowaną albo bufor PBS w ilości do 100% (wagowo) masy kompozycji, i zawiera substancję zwiększającą właściwości adhezyjne w ilości nie większej niż 0,25% (wagowo) masy kompozycji, przy czym kompozycja ma postać żelu w temperaturze 37°C, przy czym substancję nośną stanowi poloksamer 407, przy czym substancja nośna stanowi także substancję żelującą.

W innej korzystnej realizacji wynalazku substancję zwiększającą właściwości adhezyjne stanowi karbomer 974P albo karbomer 971P.

W następnej korzystnej realizacji wynalazku kompozycja zawiera substancje pomocnicze.

W korzystnej realizacji wynalazku substancje pomocnicze stanowią od 0% do 25% (wagowo) masy kompozycji.

W kolejnej korzystnej realizacji wynalazku substancje pomocnicze są wybrane z grupy zawierającej: parabeny (nipaginy), glicerol, glikol polioksyetylenowy-200, glikol propylenowy.

W jeszcze innej korzystnej realizacji wynalazku cystatyna jest pochodzenia zwierzęcego albo roślinnego albo ludzką rekombinowaną.

W kolejnej korzystnej realizacji wynalazku kompozycja ma postać płynną w temperaturze 20°C.

Drugim przedmiotem wynalazku jest kompozycja, jak w pierwszym przedmiocie wynalazku, do zastosowania w powlekanii implantów albo do podawania miejscowego w celu wspomaganie osseointegracji.

Przykłady realizacji wynalazku zobrazowano na rysunku, na których na Fig. 1 przedstawiono aktywność uwolnionej cystatyny w czasie z formułacji o składzie: 17% poloksameru 407 i 0,02% cystatyny, na bazie wody dejonizowanej, na Fig. 2 przedstawiono aktywność uwolnionej cystatyny w czasie z formułacji o składzie: 17% poloksameru 407, 0,1% karbomeru 974P i 0,02% cystatyny, na bazie wody dejonizowanej, na Fig. 3 przedstawiono zależność naprężenia ścinającego od szybkości ścinania dla sporządzonych żeli w temp. 20°C, na Fig. 4 przedstawiono zależność naprężenia ścinającego od szybkości ścinania dla sporządzonych żeli w temp. 37°C, na Fig. 5–8 przedstawiono zależność lepkości od temperatury dla sporządzonych żeli.

W badaniach wykazano, że cystatyna w stężeniu 0,2 mg/ml jest stabilna w warunkach otrzymania preparatu. Również obecność poloksameru 407 (w stężeniu 15%–20% w/w) i karbomeru 974P (w stężeniu 0,1–0,25% w/w) nie mają niekorzystnego wpływu na aktywność cystatyny (Przykład 8). Ponadto stwierdzono, że preparat o stężeniu 0,2 mg/mL jest stabilny przez okres co najmniej 12 miesięcy (Przykład 9). Reasumując, zarówno sposób sporządzania preparatu, jak i jego skład zapewniają otrzymanie w pełni aktywnego i stabilnego preparatu cystatynowego. Sporządzone hydrożele cechują się początkowym (do ok. 10 godziny) szybkim uwalnianiem cystatyny, natomiast w kolejnych godzinach szybkość uwalniania stopniowo zmniejsza się (Fig. 1 i 2). Hydrożele na bazie poloksameru 407 i karbomerów 971P/974P mogą zostać zastosowane jako postać o przedłużonym uwalnianiu dla białka aktywnego biologicznie, jakim jest cystatyna.

Wszystkie przygotowane hydrożele w temperaturze 20°C były lepkosprężystymi cieczami, natomiast w temperaturze ciała ludzkiego (37°C) znajdowały się w stanie żelu. Jest to znana właściwość hydrożeli zawierających poloksamer P407, zwana tiksotropią zależną od temperatury. Właściwości te są korzystne dla zastosowań preparatu jako substancji powlekającej implant, a duża lepkość zapewnia retencję preparatu w obrębie miejsca aplikacji. Płynna postać preparatu w 20°C ułatwia jego aplikację w miejscu mocowania implantu. Poniżej przedstawiono (Fig. 3 i 4) zależności naprężenia ścinającego od szybkości ścinania w temperaturach 20°C i 37°C dla żeli na bazie wody dejonizowanej o składach:

- 17% poloksameru 407 (Przykłady – kompozycja I).
- 17% poloksameru 407, 0,1% karbomeru 974P, wodorotlenek sodu do uzyskania pH 7,4 (Przykłady – kompozycja II),

W temperaturze ciała ludzkiego (37°C) formułacje na bazie poloksameru 407 znajdowały się w stanie żelu. Sporządzone hydrożele w temperaturze 37°C wykazują znacznie większą lepkość niż w temperaturze 20°C. Jest to znana właściwość hydrożeli zawierających ten polimer, zwana tiksotropią zależną od temperatury. Spowodowana jest ona tworzeniem miceli przez łańcuchy poloksameru 407 wraz ze wzrostem temperatury. Przejście z zolu w żel zachodziło w zakresie od 20,5°C do 33°C, czyli powyżej temperatury pokojowej oraz poniżej temperatury ciała ludzkiego, dzięki czemu hydrożele mogą utrzymywać płynność podczas przechowywania i aplikacji, a po kontakcie z błoną śluzową zwiększyć swoją lepkość. Poniżej przedstawiono (Fig. 5, 6, 7 i 8) zależności lepkości od temperatury dla żeli na bazie wody dejonizowanej o składach:

- 17% poloksameru 407 (Przykłady – kompozycja I).
- 17% poloksameru 407, 0,1% karbomeru 974P, wodorotlenek sodu do uzyskania pH 7,4 (Przykłady – kompozycja II)
- 17% poloksameru 407, 0,25% karbomeru 974P, wodorotlenek sodu do uzyskania pH 7,4 (Przykłady – kompozycja III)
- 15% poloksameru 407 (Przykłady – kompozycja IV)
- 15% poloksameru 407, 0,175% karbomeru 974P, wodorotlenek sodu do uzyskania pH 7,4 (Przykłady – kompozycja V)
- 20% poloksameru 407 (Przykłady – kompozycja VI)
- 20% poloksameru 407, 0,175% karbomeru 974P, wodorotlenek sodu do uzyskania pH 7,4 (Przykłady – kompozycja VII)

P r z y k ł a d 1. Kompozycja I

Cystatyna	0,02 g
Poloksamer 407	17 g
Woda dejonizowana	ad 100,0 g

Do części odważonego rozpuszczalnika dodaje się 17 g poloksameru 407, następnie dodaje się resztę wody dejonizowanej do masy 99,98 g. Całość miesza się w celu zwilżenia wprowadzonego poloksameru, a następnie umieszcza się w temperaturze 2–8°C na 24 h w celu uzyskania klarownego roztworu. Po tym czasie roztwór poloksameru przenosi się do 0,02 g zliofilizowanej cystatyny, miesza się do rozpuszczenia cystatyny i uzyskania homogennej mieszaniny o pH 7,4. Następnie roztwór przesącza się przez filtr strzykawkowy o średnicy porów 0,22 µm w warunkach aseptycznych. Przesączony roztwór zatapia się w ampułkach o objętości 2 mL w warunkach aseptycznych. Otrzymany środek przeznaczony jest do powlekania implantów kostnych.

P r z y k ł a d 2. Kompozycja II

Cystatyna	0,02 g
Karbomer 974P	0,1 g
Poloksamer 407	17 g
10M r-r NaOH	q.s.
Woda dejonizowana	ad 100,0 g

Do ok. 60 g wody dejonizowanej dodaje się 0,1 g karbomeru 974P, a następnie miesza do uzyskania jednorodnej mieszaniny. Następnie, przy ciągłym mieszaniu, dodaje się małymi porcjami 17 g poloksameru 407 do masy ok. 77 g. Po zwilżeniu wprowadzonego poloksameru całość umieszcza się w temperaturze 2–8°C na 24 h w celu jego rozpuszczenia. Następnie mieszaninę doprowadza się do pH = 7,40 ± 0,05 za pomocą 2–5 kropli (w zależności od potrzeb) 10M roztworu NaOH oraz wodą dejonizowaną do masy 80 g. Po doprowadzeniu do odpowiedniego pH przygotowany żel sterylizuje się w autoklawie w warunkach 121°C i nadciśnieniu 1 atm. przez 15 min. Po procesie sterylizacji żel schładza się, a następnie w warunkach aseptycznych dodaje się do niego 20 g przesączonego przez filtr strzykawkowy o średnicy porów 0,22 µm 17% roztworu poloksameru 407 zawierającego 0,02 g zliofilizowanej cystatyny. Całość miesza się do uzyskania homogennej mieszaniny. Gotowy roztwór zatapia się w ampułkach o objętości 2 mL w warunkach aseptycznych. Otrzymany środek przeznaczony jest do powlekania implantów kostnych.

P r z y k ł a d 3. Kompozycja III

Cystatyna	0,02 g
Karbomer 974P	0,25 g
Poloksamer 407 1	7 g
10M r-r NaOH	q.s.
Woda dejonizowana	ad 100,0 g

Do ok. 60 g wody dejonizowanej dodaje się 0,25 g karbomeru 974P, a następnie miesza do uzyskania jednorodnej mieszaniny. Następnie, przy ciągłym mieszaniu, dodaje się małymi porcjami 17 g poloksameru 407 do masy ok. 77 g. Po zwilżeniu wprowadzonego poloksameru całość umieszcza się w temperaturze 2–8°C na 24 h w celu jego rozpuszczenia. Następnie mieszaninę doprowadza się do pH = 7,40 ± 0,05 za pomocą 2–5 kropli (w zależności od potrzeb) 10M roztworu NaOH oraz wodą dejonizowaną do masy 80 g. Po doprowadzeniu do odpowiedniego pH przygotowany żel sterylizuje się w autoklawie w warunkach 121°C i nadciśnieniu 1 atm. przez 15 min. Po procesie sterylizacji żel schładza się, a następnie w warunkach aseptycznych dodaje się do niego 20 g przesączonego przez filtr strzykawkowy o średnicy porów 0,22 µm 17% roztworu poloksameru 407 zawierającego 0,02 g zliofilizowanej cystatyny. Całość miesza się do uzyskania homogennej mieszaniny. Gotowy roztwór zatapia się w ampułkach o objętości 2 mL w warunkach aseptycznych. Otrzymany środek przeznaczony jest do powlekania implantów kostnych.

P r z y k ł a d 4. Kompozycja IV

Cystatyna	0,02 g
Poloksamer 407	15 g
Woda dejonizowana	ad 100,0 g

Do części odważonego rozpuszczalnika dodaje się 15 g poloksameru 407, następnie dodaje się resztę wody dejonizowanej do masy 99,98 g. Całość miesza się w celu zwilżenia wprowadzonego poloksameru, a następnie umieszcza się w temperaturze 2–8°C na 24 h w celu uzyskania klarownego roztworu. Po tym czasie roztwór poloksameru przenosi się do 0,02 g zliofilizowanej cystatyny, miesza się do rozpuszczenia cystatyny i uzyskania homogennej mieszaniny o pH 7,4. Następnie roztwór przesącza się przez filtr strzykawkowy o średnicy porów 0,22 µm w warunkach aseptycznych. Przesączony roztwór zatapia się w ampułkach o objętości 2 mL w warunkach aseptycznych. Otrzymany środek przeznaczony jest do powlekania implantów kostnych.

P r z y k ł a d 5. Kompozycja V

Cystatyna	0,02 g
Karbomer 974P	0,175 g
Poloksamer 407	15 g
10M r-r NaOH	q.s.
Woda dejonizowana	ad 100,0 g

Do ok. 60 g wody dejonizowanej dodaje się 0,175 g karbomeru 974P, a następnie miesza do uzyskania jednorodnej mieszaniny. Następnie, przy ciągłym mieszaniu, dodaje się małymi porcjami 15 g poloksameru 407 do masy ok. 77 g. Po zwilżeniu wprowadzonego poloksameru całość umieszcza się w temperaturze 2–8°C na 24 h w celu jego rozpuszczenia. Następnie mieszaninę doprowadza się do pH = 7,40 ± 0,05 za pomocą 2–5 kropli (w zależności od potrzeb) 10M roztworu NaOH oraz wodą dejonizowaną do masy 80 g. Po doprowadzeniu do odpowiedniego pH przygotowany żel sterylizuje się w autoklawie w warunkach 121°C i nadciśnieniu 1 atm. przez 15 min. Po procesie sterylizacji żel schładza się, a następnie w warunkach aseptycznych dodaje się do niego 20 g przesączonego przez filtr strzykawkowy o średnicy porów 0,22 µm 15% roztworu poloksameru 407 zawierającego 0,02 g zliofilizowanej cystatyny. Całość miesza się do uzyskania homogennej mieszaniny. Gotowy roztwór zatapia się w ampułkach o objętości 2 mL w warunkach aseptycznych. Otrzymany środek przeznaczony jest do powlekania implantów kostnych.

P r z y k ł a d 6. Kompozycja VI

Cystatyna	0,02 g
Poloksamer 407	20 g
Woda dejonizowana	ad 100,0 g

Do części odważonego rozpuszczalnika dodaje się 20 g poloksameru 407, następnie dodaje się resztę wody dejonizowanej do masy 99,98 g. Całość miesza się w celu zwilżenia wprowadzonego poloksameru, a następnie umieszcza się w temperaturze 2–8°C na 24 h w celu uzyskania klarownego roztworu. Po tym czasie roztwór poloksameru przenosi się do 0,02 g zliofilizowanej cystatyny, miesza się do rozpuszczenia cystatyny i uzyskania homogennej mieszaniny o pH 7,4. Następnie roztwór przesącza się przez filtr strzykawkowy o średnicy porów 0,22 µm w warunkach aseptycznych. Przesączony roztwór zatapia się w ampułkach o objętości 2 mL w warunkach aseptycznych. Otrzymany środek przeznaczony jest do powlekania implantów kostnych.

Przykład 7. Kompozycja VII

Cystatyna	0,02 g
Karbomer 974P	0,175 g
Poloksamer 407	20 g
10M r-r NaOH	q.s.
Woda dejonizowana	ad 100,0 g

Do ok. 60 g wody dejonizowanej dodaje się 0,175 g karbomeru 974P, a następnie miesza do uzyskania jednorodnej mieszaniny. Następnie, przy ciągłym mieszaniu, dodaje się małymi porcjami 20 g poloksameru 407 do masy ok. 77 g. Po zwilżeniu wprowadzonego poloksameru całość umieszcza się w temperaturze 2–8°C na 24 h w celu jego rozpuszczenia. Następnie mieszaninę doprowadza się do pH = 7,40 ± 0,05 za pomocą 2–5 kropli (w zależności od potrzeb) 10M roztworu NaOH oraz wodą dejonizowaną do masy 80 g. Po doprowadzeniu do odpowiedniego pH przygotowany żel sterylizuje się w autoklawie w warunkach 121°C i nadciśnieniu 1 atm. przez 15 min. Po procesie sterylizacji żel schładza się, a następnie w warunkach aseptycznych dodaje się do niego 20 g przesączonego przez filtr strzykawkowy o średnicy porów 0,22 μm 20% roztworu poloksameru 407 zawierającego 0,02 g zliofilizowanej cystatyny. Całość miesza się do uzyskania homogennej mieszaniny. Gotowy roztwór zatapia się w ampułkach o objętości 2 mL w warunkach aseptycznych. Otrzymany środek przeznaczony jest do powlekania implantów kostnych.

Przykład 8. Kompozycje preparatów oraz ich aktywność antypapainowa.

	Skład	Aktywność cystatyny
Kompozycja 1	17% poloksameru 407 0,02% cystatyny	1,246 j/mL
Kompozycja 2	17% poloksameru 407 0,1% karbomeru 974P 0,02% cystatyny NaOH do uzyskania pH 7,4	1,167 j/mL
Kompozycja 3	17% poloksameru 407 0,25% karbomeru 974P 0,02% cystatyny NaOH do uzyskania pH 7,4	1,197 j/mL
Kompozycja 4	15% poloksameru 407 0,02% cystatyny	1,211 j/mL
Kompozycja 5	15% poloksameru 407 0,175% karbomeru 974P 0,02% cystatyny NaOH do uzyskania pH 7,4	1,259 j/mL
Kompozycja 6	20% poloksameru 407 0,02% cystatyny	1,270 j/mL
Kompozycja 7	20% poloksameru 407 0,175% karbomeru 974P 0,02% cystatyny NaOH do uzyskania pH 7,4	1,222 j/mL
Kompozycja referencyjna	0,02% cystatyny (wodny roztwór)	1,251 j/mL

Przykład 9. Stabilność przykładowego preparatu w okresie 12 miesięcy.

Skład żelu	Aktywność cystatyny w czasie t=0	Aktywność cystatyny po 12 miesiącach
17% poloksameru 407 0,02% cystatyny	1,246 j/mL	1,358 j/mL
17% poloksameru 407 0,1% karbomeru 974P 0,02% cystatyny NaOH do uzyskania pH 7,4	1,167 j/mL	1,160 j/mL
17% poloksameru 407 0,25% karbomeru 974P 0,02% cystatyny NaOH do uzyskania pH 7,4	1,197 j/mL	1,250 j/mL
15% poloksameru 407 0,02% cystatyny	1,211 j/mL	1,201 j/mL
15% poloksameru 407 0,175% karbomeru 974P 0,02% cystatyny NaOH do uzyskania pH 7,4	1,259 j/mL	1,265 j/mL
20% poloksameru 407 0,02% cystatyny	1,270 j/mL	1,243 j/mL
20% poloksameru 407 0,175% karbomeru 974P 0,02% cystatyny NaOH do uzyskania pH 7,4	1,222 j/mL	1,182 j/mL

Zastrzeżenia patentowe

1. Kompozycja zawierająca cystatynę, nośnik, substancję zobojętniającą, wodę albo bufor, **znamienna tym**, że zawiera cystatynę o aktywności właściwej przynajmniej 10 jednostek inhibitorowych na miligram białka w ilości 0,02% (wagowo), substancję nośną w ilości od 15,0% do 20,0% (wagowo), i substancję zobojętniającą w ilości nie większej niż konieczna do uzyskania pH wynoszącego $7,40 \pm 0,05$, korzystnie wybraną z grupy zawierającej: NaOH albo TEA, i kompozycja zawiera wodę dejonizowaną albo bufor PBS w ilości do 100% (wagowo) masy kompozycji, i zawiera substancję zwiększającą właściwości adhezyjne w ilości nie większej niż 0,25% (wagowo) masy kompozycji, przy czym kompozycja ma postać żelu w temperaturze 37°C, przy czym substancję nośną stanowi poloksamer 407, przy czym substancja nośna stanowi także substancję żelującą.
2. Kompozycja wg. zastr. od 1 do 2, **znamienna tym**, że substancję zwiększającą właściwości adhezyjne stanowi karbomer 974P albo karbomer 971P.
3. Kompozycja wg. zastr. od 1 do 3, **znamienna tym**, że zawiera substancje pomocnicze.
4. Kompozycja wg. zastr. od 1 do 4, **znamienna tym**, że substancje pomocnicze stanowią od 0% do 25% (wagowo) masy kompozycji.
5. Kompozycja wg. zastr. od 1 do 5, **znamienna tym**, że substancje pomocnicze są wybrane z grupy zawierającej: parabeny (nipaginy), glicerol, glikol polioksyetylenowy-200, glikol propylenowy.
6. Kompozycja wg. zastr. od 1 do 6, **znamienna tym**, że cystatyna jest pochodzenia zwierzęcego albo roślinnego albo ludzką rekombinowaną.
7. Kompozycja wg. zastr. od 1 do 7, **znamienna tym**, że kompozycja ma postać płynną w temperaturze 20°C.
8. Kompozycja, jak zdefiniowano w zastr. od 1 do 7, do zastosowania w powlekanii implantów albo do podawania miejscowego w celu wspomaganie osseointegracji.

Rysunki

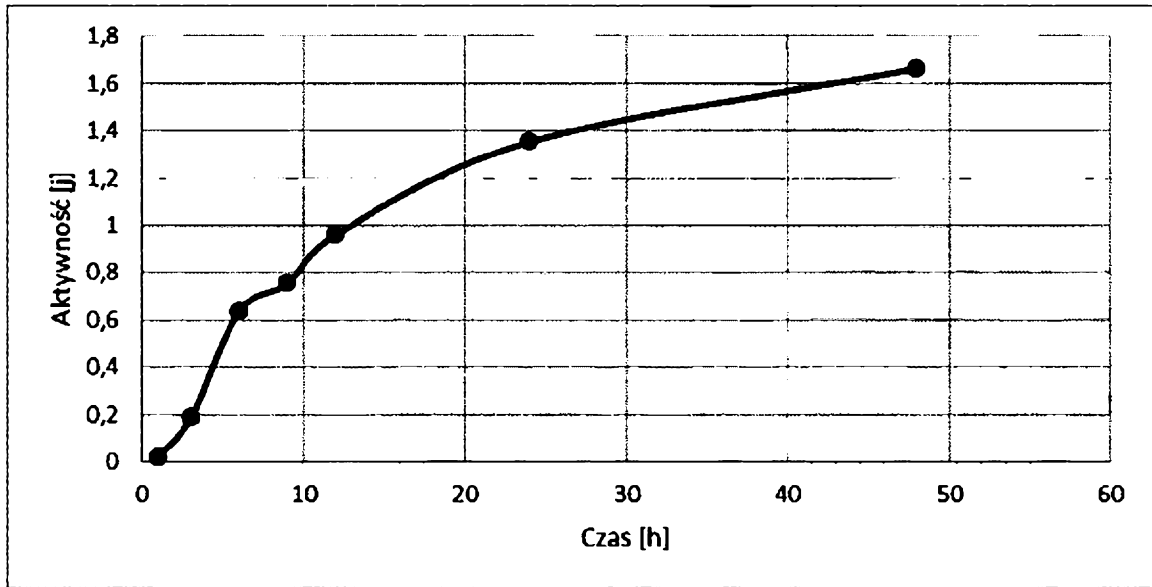


Fig. 1

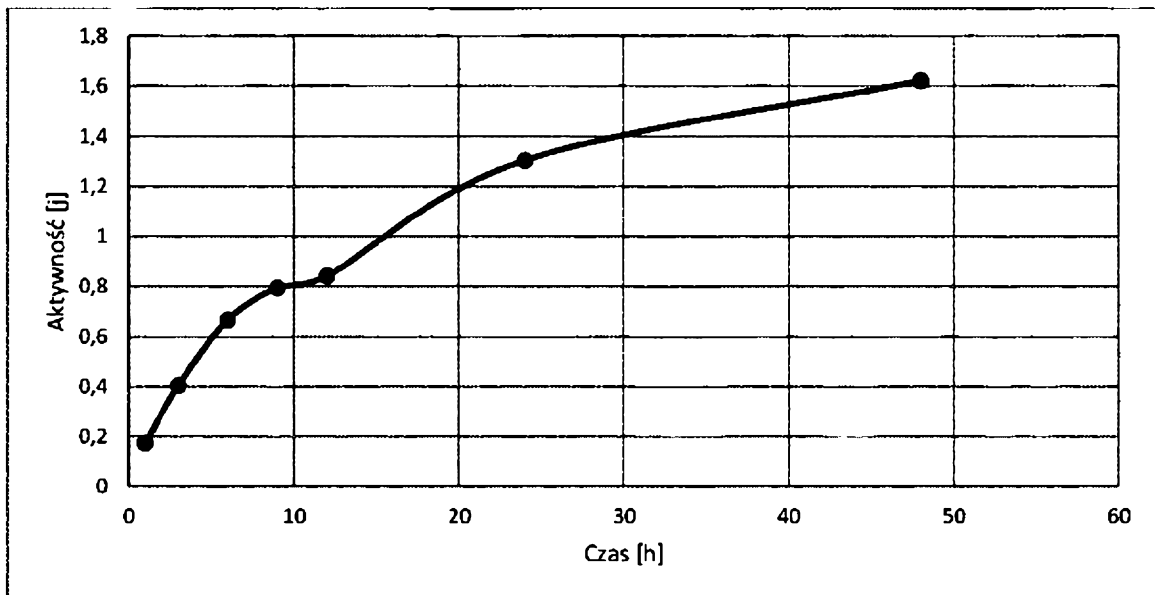


Fig. 2

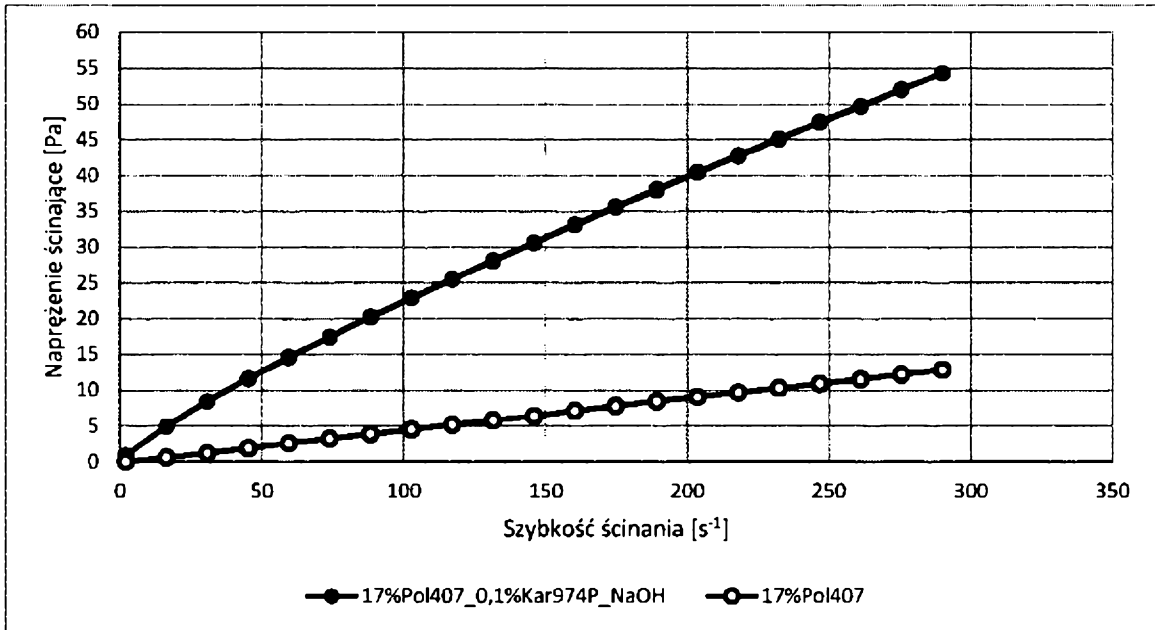


Fig. 3

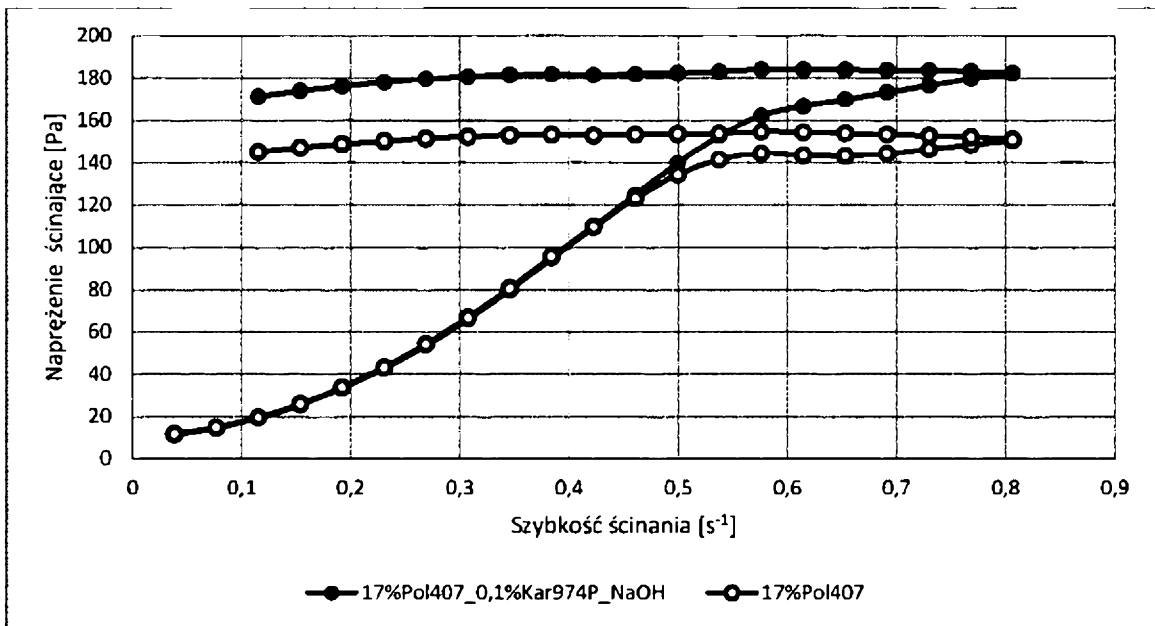


Fig. 4

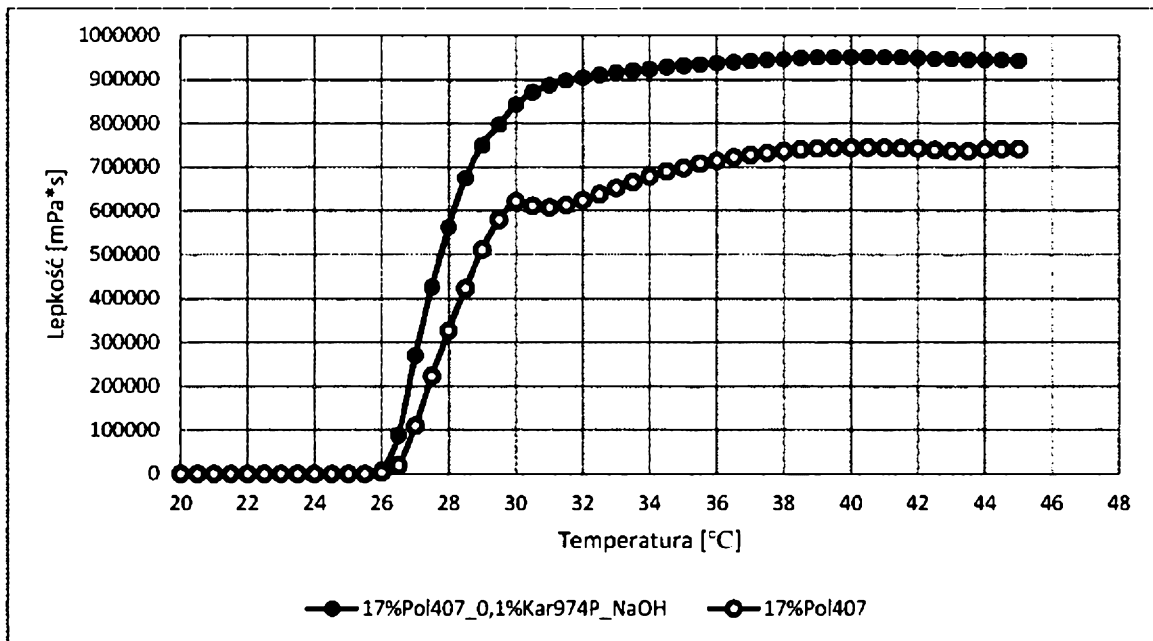


Fig. 5

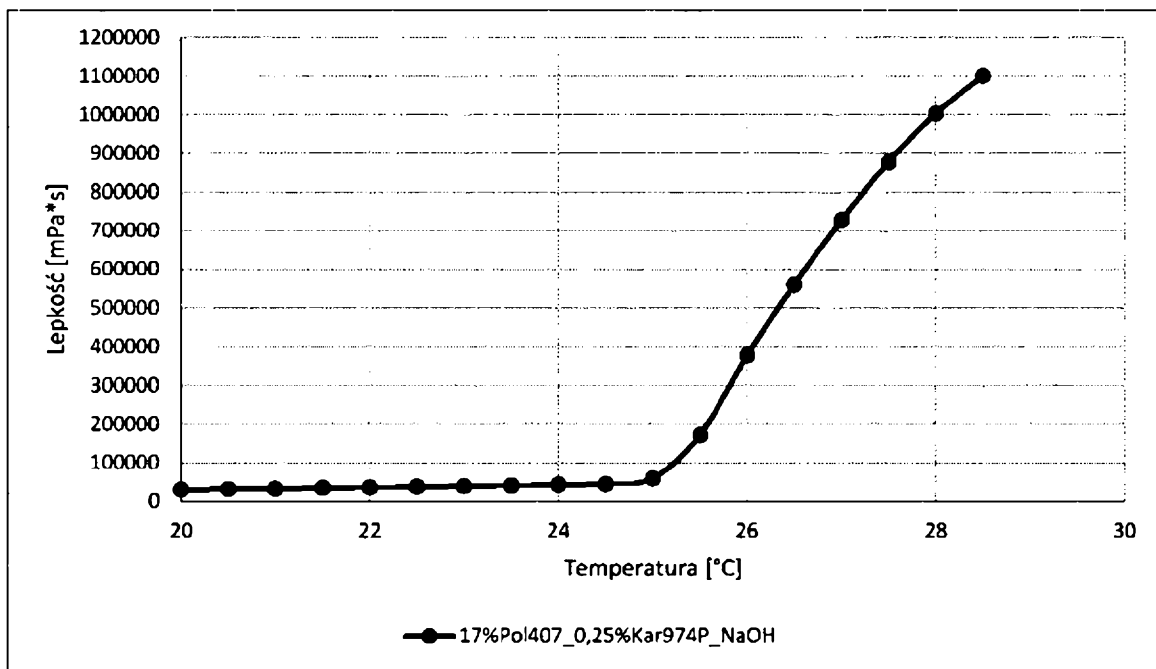


Fig. 6

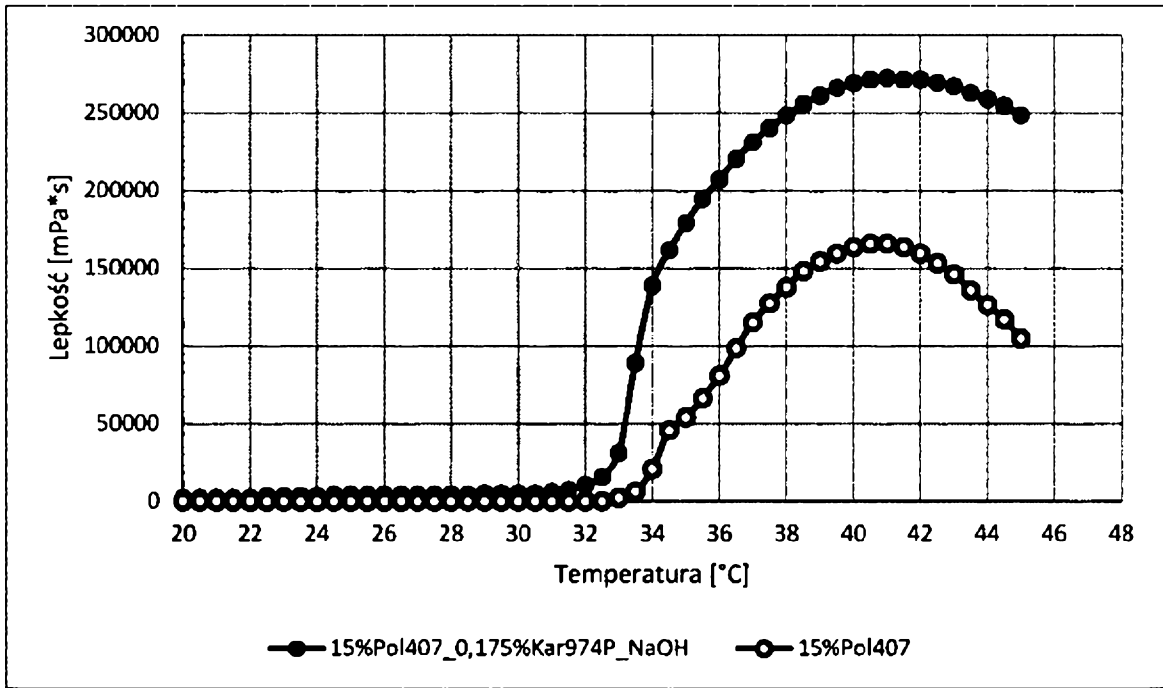


Fig. 7

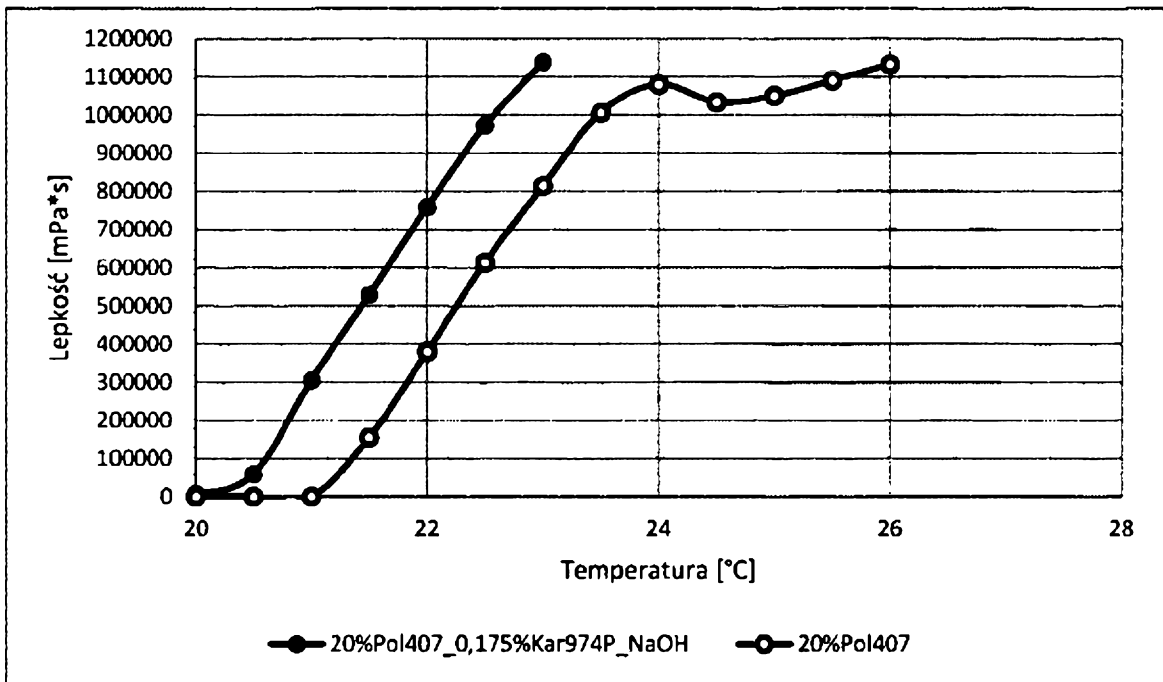


Fig. 8