

(19)



(10) **LT 6309 B**

(12) **PATENTO APRAŠYMAS**

(11) Patent numeris: **6309**

(51) Int. Cl. (2016.01): **A61F 2/00**

(21) Paraiškos numeris: **2014 117**

(22) Paraiškos padavimo data: **2014-10-13**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **2016-05-10**

(45) Patent paskelbimo data: **2016-08-25**

(62) Paraiškos, iš kurios dokumentas išskirtas, numeris: —

(86) Tarptautinės paraiškos numeris: —

(86) Tarptautinės paraiškos padavimo data: —

(85) Nacionalinio PCT lygio procedūros pradžios data: —

(30) Prioritetas: —

(72) Išradėjas:

**Eugenijus LIESIS, LT
Odeta BANIUKAITIENĖ, LT
Alisa PALAVENIENĖ, LT
Jolanta LIESIENĖ, LT**

(73) Patent savininkas:

UAB "Biomé", Giros g. 4-15, LT-47338 Kaunas, LT

(74) Patentinis patikėtinis/atstovas:

**Aurelija ŠIDLAUSKIENĖ, Dr. V. Šidlauskas ir partneriai, UAB, K. Būgos g. 29,
LT-44326 Kaunas, LT**

(54) Pavadinimas:

Trimatis porėtas celiuliozės karkasas kaulo inžinerijai ir jo gavimo būdas

(57) Referatas:

Išradimas priskiriamas medžiagų inžinerijos sričiai ir gali būti panaudotas odontologijoje ar kitos srities chirurgijoje kaulo audinio regeneracijai defekto vietoje. Trimatis porėtas celiuliozės karkasas, pasižymintis bio suderinamumu ir osteokondukcinėmis savybėmis, gaunamas sudarant kompozitą iš gamtinio polimero celiuliozės ir biogeninių kalcio šaltinių, būtent, autogeninio (nuosavo) kaulo, alogeninio (kito tos pačios rūšies, t.y. žmogaus, kito individo) kaulo, ksenogeninio (kitos rūšies organizmo) kaulo dalelių. Šio išradimo tikslas gauti trimatį porėtą celiuliozės karkasą, kuris pasižymėtų bio suderinamumu ir geromis osteokondukcinėmis savybėmis ir struktūra, atitinkančia natūralaus kaulo morfologiją. Išradimo tikslas pasiekiamas sudarant celiuliozės kompozitą su biogeninių kaulų 0,01 - 2000 mikronų dydžio dalelėmis, esant masių santykiui 1:0,12-6,0. Atskiru atveju celiuliozės kompozitas sudaromas su sepijos kaulo, kuriame yra mineraliniai junginiai ir polisacharidas chitinas, 0,01-2000 mikronų dydžio dalelėmis. Atskiru atveju karkaso porų paviršius padengiamas kolagenu, trombocitais praturtintu

fibrinu, įvairiais augimo faktoriais, terapeutiniais priedais. Trimatės porėtos struktūros, atitinkančios kaulo morfologiją, karkasas gaunamas celiuliozės gelį formuojant su įterptomis biogeninio kaulo dalelėmis, po to jį inkliuduojant 10-30%, vandeniniu alkoholio tirpalu ir liofilizuojant arba veikiant gelį superkritiniu anglies dioksidu 24-70 Mpa slėgyje 35 - 80° temperatūroje. Gautas blokelių formos karkasas gali būti sumalamas iki norimo dydžio granulių ir/ar iš jų pagaminama pasta.

Išradimas priklauso medžiagų inžinerijos sričiai ir gali būti panaudotas odontologijoje ar kitos srities chirurgijoje kaulo audinio regeneracijai defekto vietoje.

Trimatis porėtas celiuliozės karkasas, pasižymintis biosuderinamumu, geromis osteokondukcinėmis ir mechaninėmis savybėmis, gaunamas sudarant kompo zitą iš gamtinio polimero - celiuliozės ir biogeninių kalcio šaltinių, būtent, autogeninio (nuosavo) kaulo, alogeninio (kito tos pačios rūšies, t.y. žmogaus, kito individo) kaulo, ksenogeninio (kitos rūšies organizmo) kaulo dalelių. Kompozito struktūra, tinkama kaulo audinio regeneracijai, formuojama liofilizacijos būdu ar veikiant superkrizinio skysčiu, prieš tai inkliudavus vandeniniais alkoholio tirpalais. Gali būti blokelių ar granulių pavidalo, gali būti pagaminta pasta.

Kaulo audinio atstatymui defekto srityje odontologai naudoja kaulo pakaitalus. Tai gali būti:

- autogeniniai pakaitalai - nuosavas kaulas iš kitos to paties žmogaus vietos. Privalumai - neiššaukia imuninės sistemos atsako. Trūkumai - reikalinga papildoma chirurginė operacija kaulo išėmimui, neretai trūksta kaulo, be to sunku jam suteikti reikiamą formą;

- alogeniniai kaulo pakaitalai - kito tos pačios rūšies (t.y. žmogaus) individo kaulas. Pagal fizikines savybes tinkamas, bet galima pernešti kito žmogaus ligų užkratus;

- ksenogeniniai kaulo pakaitalai - tai gyvūno, dažniausiai jauno jautuko kaulas, kuriame išdeginti baltymai ir likusi tik mineralinė dalis. Jo morfologija ne visai atitinka žmogaus kaulo struktūrai. Jis pernelyg greitai rezorbuojasi organizme;

- sintetiniai kaulo pakaitalai. Tarpe jų, populiariausi - trikalcio fosfatas (TCP) ir hidroksiapatitas (HA).

Dauguma kaulo pakaitalų yra miltelių ar granulių (0,5-2 mm) pavidalo.

Pagrindinis jų trūkumas - jie dažnai sušoka į monolitinį gabalą, kuriame neįauga kraujagyslės. Susidaro nepakankamo stiprumo darinys, kuris trupa įsukant metalinį implantą,

Siekiant gauti porėtą trimatę struktūrą, įvairios formos kaulo pakaitalų dalelės sumaišomos ir iš jų gaminami agregatai, įvairiais būdais suklijuojant, supresuojant ar sukepant daleles. Tam naudojamos įvairios kaulinės dalelės, TCP, HA (Winterbottom

J.M. et al. Implant, method of making same and use of the implant for the treatment of bone defects. Patent No. US 6478825 B 1, 2002-11-02) arba šios mineralinės medžiagos kartu su polimero dalelėmis (Giomo T. PLGA/HA hydroxyapatite composite bone grafts and method of making. Pub. No. US 2013/02 18291 A1, 2013-08-22). Trimatės struktūros kompozitai taip pat sudaromi elektrinio verpimo metodu (Mei Wei, Fei Peng, Zhi-kang Xu. Electrospun apatite/polymer nano-composite scaffolds. Patent No. US7879093 B2, 2011-02-01) arba naudojant sparčios prototipų gamybos technologijas (angl. Rapid Prototyping) (Sawkins, M.J., et al. 3D Cell and scaffold patterning strategies in tissue engineering. Recent Patents on Biomedical Engineering, 2013, vol. 6, no. 1, p. 3-21; Teoh, S.H., et al. Three-dimensional bioresorbable scaffolds for tissue engineering applications. Patent No. US8071007 B 1, 2011-12-06). Naudojami sintetiniai polimerai: poli(ε-kaprolaktonas), poli(L-pieno rūgštis), poli(glikolio rūgštis), poli(D,L-pieno-ko-glikolio rūgštis), polifosfazenai, polipropilenfumaratas (Muhammad, I.S.; Xiaoxue, X.; Li, L. A review on biodegradable polymeric materials for bone tissue engineering applications. Journal of Materials Science, 2009, p. 5713-5724). Iš sintetinių polimerų plačiausiai naudojamas polifis-kaprolaktonas) (Dhandayuthapani, B., et al. Polymeric scaffolds in tissue engineering application: A review. International Journal of Polymer Science, 2011, vol. 2011, p. 1-19).

Tačiau sintetiniai polimerai pasižymi mažesniu biosuderinamumu nei natūralūs, jie neretai sukelia audinių nekrozę, jų skilimo produktai, kaip kad glikolio rūgštis ir kiti rūgštiniai junginiai gali padidinti vietinį rūgštingumą, kas gali sukelti audinių pažeidimus. Be to, polimerams yrant organizme gali susidaryti ir toksiški metabolitai. Aprašyti gavimo būdai sudėtingi ir neužtikrina reikiamo porėtumo, nes dalelės yra sulipdomos arba sukepinamos. Be to, svarbus trūkumas yra tai, kad kalcio šaltiniais naudojami sintetinės kilmės mineraliniai junginiai - TCP ir HA.

Artimiausias prototipas yra celiuliozės pagrindu gaunamas trimatis karkasas, kurio paviršius mineralizuojamas modeliniame kūno skystyje (SBF -angl. simulated body fluid) (Petrauskaite, O. et al. Biomimetic mineralization on a macroporous cellulose-based matrix for bone regeneration. BioMed Research International. ISSN 2314-6133. 2013, vol. 2013, p. 1-9). Šiuo atveju porėtas karkasas yra gaunamas iš regeneruotos celiuliozės gelio liofilizacijos būdu. Gaunamas tolygiai porėtas blokas, pasižymintis morfologija, atitinkančia natūralaus kaulo struktūrą.

Prie esminių metodo trūkumų galima priskirti tai, kad celiuliozė nepasižymi bioaktyvumu, nesuauga su kauliniais audiniais, pasižymi prastomis osteokondukcinėmis savybėmis. Nors šių savybių pagerinimui karkaso paviršius mineralizuojamas SBF tirpale, tačiau gaunamas padengimas sintetiniais mineralais, kurie visada pasižymi mažesniu biosuderinamumu nei natūralūs. Be to, mineralizuojant SBF-e, padengiamas tik paviršius, ir mineralų kiekis kompozituose sudaro tik iki 12 procentų nuo celiuliozės svorio, todėl tokio karkaso osteokondukcinės savybės pagerėja nežymiai. Be to, gautas karkasas pasižymi prastomis mechaninėmis savybėmis (Jungo modulis 4 MPa).

Šio išradimo tikslas - gauti trimatį porėtą celiuliozės karkasą, kuris pasižymėtų biosuderinamumu ir geromis osteokondukcinėmis bei mechaninėmis savybėmis ir struktūra, atitinkančią natūralaus kaulo morfologiją.

Šis tikslas pasiekiamas sudarant celiuliozės kompozitą su biogeninių kaulų 0,01-2000 mikronų dydžio dalelėmis, esant masių santykiui 1: 0,12-6,0. Atskiru atveju celiuliozės kompozitas sudaromas su sepijos kaulo, kuriame yra mineralinių junginių ir polisacharidas chitinas, 0,01-2000 mikronų dydžio dalelėmis. Atskiru atveju karkaso porų paviršius padengiamas kolagenu, trombocitais praturtintu fibrinu, įvairiais augimo faktoriais, terapeutiniais priedais, kamieninėmis ląstelėmis. Trimatės porėtos struktūros, atitinkančios kaulo morfologiją, karkasas gaunamas celiuliozės geli formuojant iš acetilceliuliozės tirpalo su įterptomis biogeninio kaulo dalelėmis masių santykiu 1: 0,12-6,0, po to jį inkliuduojant 10-30 % vandeniniu alkoholio tirpalu ir liofilizuojant arba veikiant gelį superkriziniu anglies dioksidu 24-70 MPa slėgyje 35-80°C temperatūroje. Gautas blokelių formos karkasas gali būti sumalamas iki norimo dydžio granulių ir/ar iš jų pagaminama pasta.

Gaunamo karkaso privalumai - naudojami ne sintetiniai, o natūralūs komponentai: gamtinis polimeras - celiuliozė ir smulkinti biogeniniai kaulai. Celiuliozė yra necitotoksiška, pasižymi biosuderinamumu. Jos irimo produktai nėra toksiški. Biogeniniais kaulais gali būti naudojami autogeninis, alogeninis ar ksenogeninis (bet kurio gyvūno) kaulas. Atskiru atveju gali būti naudojamas smulkintas sepijos kaulas, kuriame be mineralinių junginių yra ir polisacharidas chitinas, pasižymintis priešuždegiminėmis, antimikrobinėmis ir koaguliacinėmis savybėmis, kas suteikia papildomus privalumus. Celiuliozės ir smulkintų kaulų dalelių masių santykis kompozitel: 0,12-6,0.

Išradimo rezultatus iliustruoja brėžiniai. Fig. 1 - 1-ame pavyzdyje pagaminto karkaso skerspjūvio vaizdas, gautas mikrokompiuterinės tomografijos metodu. Fig. 2 - 1-ame pavyzdyje pagaminto karkaso trimatis vaizdas, gautas mikrokompiuterinės tomografijos metodu. Fig. 3 - II-ame pavyzdyje pagaminto karkaso skerspjūvio vaizdas, gautas mikrokompiuterinės tomografijos metodu. Fig. 4 - II-ame pavyzdyje pagaminto karkaso trimatis vaizdas, gautas mikrokompiuterinės tomografijos metodu. Fig. 5 - ląstelių proliferacija karkasuose.

Būdo atlikimas.

Smulkinti kaulai įvedami į acetilceliuliozės tirpalą, iš kurio gaunamas regeneruotos celiuliozės gelis su įterptomis kaulų dalelėmis. Smulkintų kaulų dalelių dydis 0,01-2000 mikronų, optimalus dydis - iki 200 mikronų. Porėta struktūra, atitinkanti kaulo morfologiją, suformuojama celiuliozės gelį su įterptomis biogeninių kaulo dalelėmis liofilizuojant arba veikiant gelį superkritiniu anglies dioksidu 24-70 MPa slėgyje 35-80 - °C temperatūroje, prieš tai jį inkliudavus 10-30 % vandeniniais alkoholio tirpalais. Galima naudoti įvairius vandenyje tirpius alkoholius, tačiau tinkamiausias yra etanolis. Kompozitas pasižymi geromis mechaninėmis savybėmis - Jungo modulis sudaro ne mažiau 8 MPa. Kompozito morfologija (porėta struktūra) pilnai atitinka žmogaus kaulo morfologijai (lentelė). Poros savo dydžiu tinkamos vaskuliarizacijai (kraujagyslių tinklui susidaryti) ir ląstelių proliferacijai. Bandymais su pelėmis nustatyta, kad kompozite po 2 savaičių buvo išplitęs kraujagyslių tinklas. Poros tarpusavyje susisiekančios, todėl užtikrina maistinių medžiagų ir metabolitų transportą.

Lentelė. Pagamintų kompozitų ir natūralaus kaulo struktūriniai parametrai

Karkasai, gauti pagal 1,2,3 pavyzdžius	Struktūriniai parametrai				
	Skeleto tūrio dalis, %	Porėtumas, %	Savitasis paviršiaus plotas, mm-l	Vidutinis sijų storis, mm	Porų skersmuo, mm
Nr.1	25	75 -	15	0,20	0,1-1,1
Nr.2	27	73	14	0,21	0,1-1,1
Nr.3	28	72	19	0,18	0,2-0,6

Zandikaulio kaulas (priklauso nuo vietos)	7-49	72-93	9-30	0,12-0,41	0,4-1,7
--	------	-------	------	-----------	---------

Tiriant žmogaus osteoblastų linijos ląstelių MG-63 proliferaciją, nustatyta, kad pagaminti karkasai pasižymi geresnėmis osteokondukcinėmis savybėmis nei prototipe gautas karkasas (Fig. 5).

Osteokondukcinių savybių ivertinimo metodas. Tyrimui naudojamos žmogaus osteoblastų linijos ląstelės MG-63 (ATCCW CRL_1427™) (American Type Collection Culture, JAV). Išaugintos ląstelės sėjamos ant mėginių prieš tai juos sterilizavus UV jonizuojančia spinduliuote, švitinant 24 val. Mėginiai, mirkomi 1 val. mitybinėje terpėje, patalpinami į 24 duobučių plokšteles (vienas mėginys vienoje plokštelėje) ir supilstoma ant jų ląstelių suspensija. Karkasai su pasėtomis ląstelėmis laikomi termostate 37 °C temperatūroje esant 5 % CO₂. Tiriamos medžiagos poveikis ląstelių augimui vertinamas, nustačius DNR kiekį po 1, 3 ir 7 dienų. DNR kiekis nustatomas, naudojant fluorescenciją Quant-iT[®] PicoGreen[®] (Life Technologies, JAV) pagal gamintojo nurodymus.

Karkaso porų paviršius gali būti padengtas kolagenu, trombocitais praturtintu fibrinu, įvairiais augimo faktoriais, terapeutiniais priedais, kamieninėmis ląstelėmis. Karkasas gaunamas blokelių formos, iš kurio galima lengvai išpjauti norimo pavidalo implantus, gali būti sumaltas iki norimo dydžio granulių, gali būti suformuota pasta.

Pasta gaminama sumaišant sumaltą kompozitą su gliceroliu, polietilenglikoliu (molekulinė masė 400-600) ar kitu hidrogeliu.

1 pavyzdys

25 g acetilceliuliozės ištirpina 261 ml acetono-amoniako tirpalo (tūrių santykis lygus 1 : 0,45), prideda 15 galogeninio kaulo granulių (granulių dydis neviršija 200 mikronų), gerai išmaišo. Gautą dispersiją išpilsto į norimo tūrio ir formos indus ir išlaiko, kol susiformuoja kietas gelis. Gautą gelį kruopščiai išplauna distiliuotu vandeniu. Po to, 24 valandas palaiko 25 % etanolio tirpale ir liofilizuoja. Kompozito Jungo modulis sudaro 8 MPa. Mėginio skerspjūvio vaizdas, gautas mikrokompjuterinės tomografijos metodu, pateiktas Fig. 1, o trimatis vaizdas - Fig. 2. Ląstelių proliferacijos karkase duomenys pateikti Fig. 5.

2 pavyzdys

25 g acetilceliuliozės ištirpina 267 ml acetono-amoniako tirpalo (tūrių santykis lygus 1 :0,5), prideda 12 g susmulkinto (dalelių dydis neviršija 100 mikronų) sepijos kaulo, gerai išmaišo. Gautą dispersiją išpilsto į norimo tūrio ir formos indus ir išlaiko, kol susiformuoja kietas gelis. Gautą geli kruopščiai išplauna distiliuotu vandeniu. Po to, 24 valandas palaiko 20 % etanolio tirpale ir liofilizuoja.

Iš susmulkinto sepijos kaulo, prieš jį naudojant, išplauna baltymus. Tam sepijos kaulo miltelius užpila 0,5 M natrio šarmo tirpalu ir maišo 5 val. 80 °C temperatūroje. Po to kruopščiai išplauna distiliuotu vandeniu, išdžiovina ir persijoja.

Kompozito Jungo modulis sudaro 10 MPa. Mėginio skerspjūvio vaizdas, gautas mikrokompiuterinės tomografijos metodu, pateiktas Fig. 3, o trimatis vaizdas - Fig. 4. Ląstelių proliferacijos karkase duomenys pateikti Fig. 5.

3 pavyzdys

10 g acetilceliuliozės ištirpina 10 1,5 ml acetono-amoniako tirpalo (tūrių santykis lygus 1 :0,45), prideda 12 g smulkinto ksenogeninio kaulo (jautuko) granulių (granulių dydis neviršija 200 mikronų), gerai išmaišo. Gautą dispersiją išpilsto į norimo tūrio ir formos indus ir išlaiko, kol susiformuoja kietas gelis. Gautą geli kruopščiai išplauna distiliuotu vandeniu ir veikia superkriziniu anglies dioksidu esant 80 °C temperatūrai, 30 MPa slėgyje.

Kompozito Jungo modulis sudaro 20 MPa. Ląstelių proliferacijos karkase duomenys pateikti Fig. 5.

4 pavyzdys

Pagaminto karkaso pavirstų padengia kolageno sluoksniu. Tam įvairios kilmės (žmogaus, kiaulės, žiurkės, karvės, rekombinantinio) I tipo kolageną ištirpina 0,1 M acto rūgštyje pagal Sigma Aldrich pateikiamą metodiką, po to tirpalą praskiedžia 10 kartų fosfatinio buferiu ir titruoja su 0,1 M natrio šarmu iki pH 7. Norimos formos karkasą patalpina į centrifugos mėgintuvėlį, užpila kolageno tirpalu ir centrifuguoja 10 min 4000-6000 aps/min greičiu. Po to karkasą liofilizuoja.

Išradimo apibrėžtis

1. Trimatis porėtas celiuliozės karkasas kaulo audinio inžinerijai, pasižymintis morfologija, atitinkančia natūralaus kaulo struktūrą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jį sudaro celiuliozės kompozitas su biogeninių kaulų 0,01-2000 mikronų dydžio dalelėmis, esant masių santykiui 1: 0,12-6,0.

2. Trimatis porėtas celiuliozės karkasas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jį sudaro celiuliozės kompozitas su sepijos kaulo, kuriame yra mineralinių junginių ir chitinas, 0,01-2000 mikronų dydžio dalelėmis.

3. Trimatis porėtas celiuliozės karkasas pagal 1 ir 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jo paviršius padengtas kolagenu, trombocitais praturtintu fibrinu, įvairiais augimo faktoriais, terapeutiniais priedais, kamieninėmis ląstelėmis.

4. Trimačio porėto celiuliozės karkaso kaulo audinio inžinerijai gavimo būdas iš regeneruotos celiuliozės gelio, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad geli formuoja iš acetilceliuliozės tirpalo su įterptomis biogeninio kaulo dalelėmis masių santykiu 1: 0,12-6,0.

5. Trimačio porėto celiuliozės karkaso kaulo audinio inžinerijai gavimo būdas liofilizuojant regeneruotos celiuliozės gelį gautą pagal 4 punktą b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad celiuliozės gelį su įterptomis biogeninio kaulo dalelėmis prieš liofilizaciją inkliuduoja 10-30 % vandeniniu alkoholio tirpalu.

6. Trimačio porėto celiuliozės karkaso gavimo būdas pagal 4 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad celiuliozės geli su įterptomis kaulo dalelėmis inkliuduoja 10-30 % vandeniniu alkoholio tirpalu ir veikia superkrizinio anglies dioksidu 24-70 MPa slėgyje 35-80 °C temperatūroje.

7. Trimačio porėto celiuliozės karkaso gavimo būdas pagal 4, 5 ir 6 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad blokelių formos karkasą sumala iki norimo dydžio granulių ir/ar iš jų pagamina pastą.

1/5

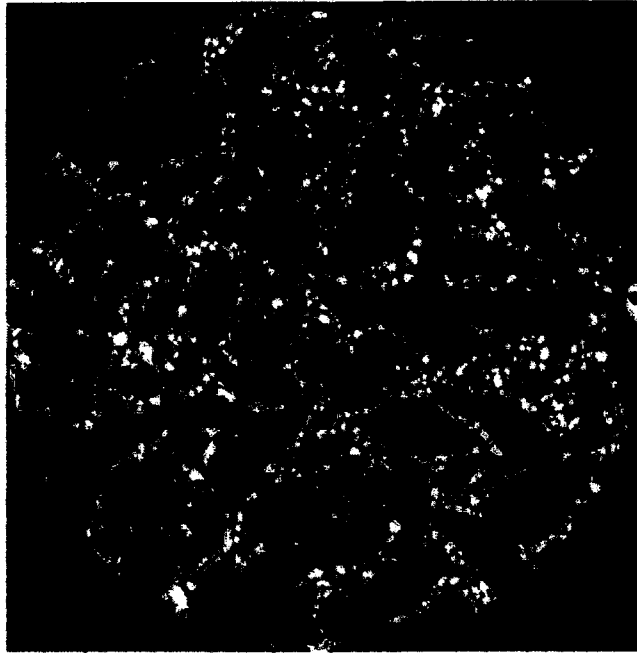
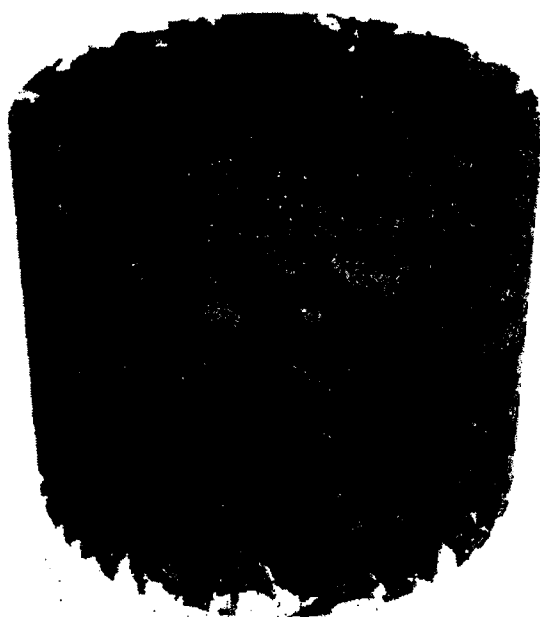


Fig. 1

2/5



1.0 mm

Fig. 2

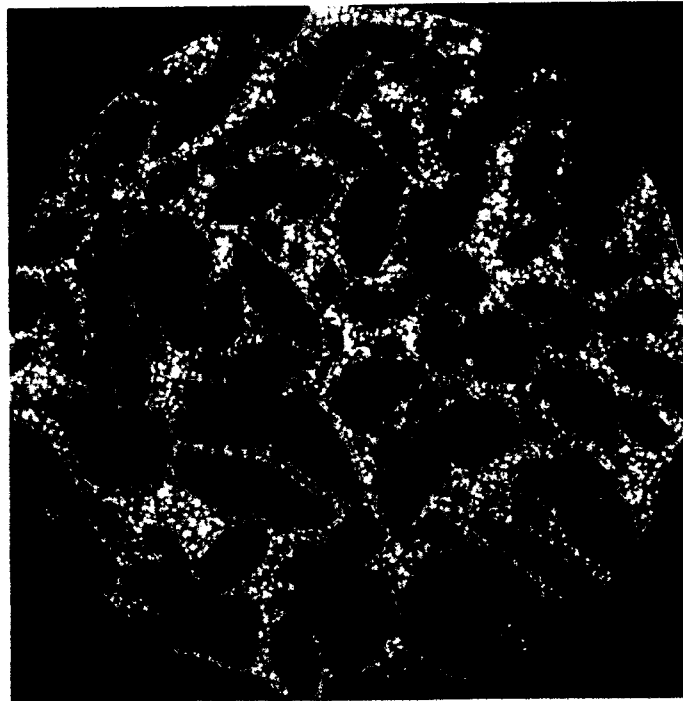
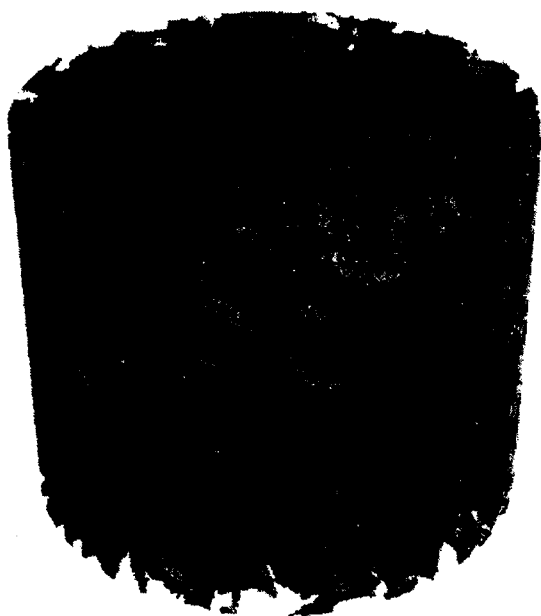


Fig. 3

4/5



1.0 mm

Fig. 4