

RZECZPOSPOLITA  
POLSKA



Urząd Patentowy  
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **239154**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **430802**

(22) Data zgłoszenia: **02.08.2019**

(51) Int.Cl.

**A61L 27/54 (2006.01)**

**A61L 27/56 (2006.01)**

**A61L 27/58 (2006.01)**

**A61L 27/12 (2006.01)**

**A61L 27/14 (2006.01)**

(54)

**Sposób otrzymywania polilaktydowego substytutu kości gąbczastej**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

**08.02.2021 BUP 03/21**

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

**08.11.2021 WUP 32/21**

(73) Uprawniony z patentu:

**POLITECHNIKA WARSZAWSKA,  
Warszawa, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

**AGNIESZKA GADOMSKA-GAJADHUR,  
Warszawa, PL  
MONIKA BUDNICKA, Warszawa, PL  
PAWEŁ RUŚKOWSKI, Wołomin, PL  
DOROTA KOŁBUK-KONIECZNY,  
Warszawa, PL**

(74) Pełnomocnik:

**rzecz. pat. Mirosława Ważyńska**

**PL 239154 B1**

## Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania polilaktydowego substytutu kości gąbczastej nasączonego osoczem bogatopłytkowym.

Krytyczne (duże) ubytki kostne stanowią poważny problem, ponieważ nie ulegają samoistnej odbudowie [1]. Mogą powstawać w wyniku rekonstrukcji więzadeł (około 300 tys./rok), resekcji nowotworów (4,5 tys./rok), zaniku kości w wyniku osteoporozy (2,7 min/rok) [2].

Standardowe leczenie polega na przeszczepieniu tkanki. Najczęściej wykonywane są przeszczepy autogenne, w których fragment własnej kości pacjenta pobiera się z miejsca zdrowego i wprowadza w miejsce ubytku. Jest to jednak metoda ryzykowna, związana ze znaczącym odsetkiem powikłań podczas pobierania tkanki, takich jak: zakażenie miejsca przeszczepu, krwotok lub uszkodzenia nerwów. Alternatywną techniką jest wprowadzenie do ubytku wszczepu allogennego, czyli kości pobranej od dawcy, najczęściej zmarłego. W tym przypadku pojawia się problem jakości i powtarzalności uzyskanego surowca, jak i braku biogodności tkankowej. Istnieje ryzyko przeniesienia zakażeń od dawcy do biorcy i nie jest zagwarantowana regeneracja tkanki w miejscu ubytku.

Wyżej wspomniane problemy spowodowały, że zainteresowanie chirurgów zwróciło się ku syntetycznym materiałom kościocząsteczkowym. Powszechne jest użycie syntetycznych materiałów (ceramik, polimerów lub metali) jako wypełniaczy oraz czynników wzrostu osadzonych na materiałach wspomagających regenerację tkanek. W takim przypadku ważna jest odpowiednia biokompatybilność materiałów, a także ich integracja z prawidłowymi tkankami. W celu zbliżenia właściwości osteoindukcyjnych sztucznych materiałów do właściwości naturalnej kości stosuje się m.in. nasączenie tych materiałów za pomocą osocza bogatopłytkowego (PRP).

Pierwsze doniesienia dotyczące zastosowania osocza bogatopłytkowego (PRP) do regeneracji tkanki kostnej sięgają 1998 roku [3], PRP posiada właściwości regenerujące tkanki, ale nie można go zastosować samodzielnie do leczenia dużych defektów. Przeprowadzone badania wskazały konieczność połączenia PRP z materiałem osteokondukcyjnym – rusztowaniem, które zapewni przestrzenne rozmieszczenie znajdujących się w PRP czynników wzrostu [4]. Połączenie osocza bogatopłytkowego z rusztowaniem ma na celu zwiększenie lokalnego stężenia czynników wzrostu, stopniowo uwalnianych do środowiska.

Rusztowania komórkowe (skafoldy) z bogatopłytkowym osoczem przeznaczone do zastosowania do regeneracji tkanki kostnej były wielokrotnie opisywane w literaturze przedmiotu, począwszy od 2004 roku. Do znanych rozwiązań zalicza się porowaty nośnik kolagenowy wypełniony PRP oraz komórkami zrębowymi szpiku kostnego [5]. Wśród znanych kombinacji polimerów naturalnych i PRP do regeneracji kości znalazły się również kapsułki z alginianu do kontrolowanego uwalniania PRP [6], rusztowanie z żelatyny otrzymane metodą freeze drying [7], czy żel fibrynowy [8]. Ze względu na dobre właściwości osteoindukcyjne stosowano również naturalną i syntetyczną ceramikę, jak zmineralizowana kość, bioszklę, fosforany wapnia (w tym hydroksyapatyt), siarczan wapnia, w formie porowatego rusztowania lub sproszkowanej [9,10]. W literaturze opisywano również połączenie polimerów syntetycznych i ceramiki, ze względu na dobre właściwości elastyczne polimerów oraz właściwości kościotwórcze ceramiki. Tu znalazły się pianka poliuretanowa modyfikowana hydroksyapatytem [11], silikon modyfikowany hydroksyapatytem [10].

Szczególnie pożądane jako materiał kościotwórczy są polimery resorbowalne, ponieważ są stopniowo zastępowane przez kość gospodarza i nie ma potrzeby ponownej operacji. Ważną pozycję wśród polimerów stosowanych w regeneracji kości zajmują poliestry, ze względu na biogodność i możliwość sterowania czasem degradacji [12,13,14]. Stąd z PRP łączono również skafoldy z poliestrów, takich jak polikaprolakton, poliglikolid uzyskane w procesie elektroprzędzenia [15], czy włókniny z poliglikolidu [16], bądź jego kopolimeru z laktydem [17]. Szczególnie obiecującym poliestrem okazał się polilaktyd (PLA) i jego kopolimery [19,20,21,22], PLA jest biogodny, degraduje w organizmie w przewidywalny sposób, co pozwala na kontrolowaną regenerację kości. Jest wydalany w naturalnych procesach fizjologicznych. Cechuje się małą masą w porównaniu do metali. Podobnie jak inne poliestry posiada właściwości sprężyste i cierne, które zbliżają go do właściwości tkanki stawów maziowych. PLA posiada udowodnione w licznych testach klinicznych właściwości osteokondukcyjne, jednak ograniczają się one do małych defektów. Stwierdzono konieczność łączenia PLA z czynnikami osteoindukcyjnymi, np. z zawartymi w PRP czynnikami wzrostu [23].

Ze względu na hydrofobowy charakter polilaktydu problemem jest jego efektywne połączenie z osoczem bogatopłytkowym. Polilaktyd wykazuje słabą nasiąkliwość osoczem, więc w celu wytwor-

rzenia homogenicznej mieszaniny z osoczem stosowano jedynie małe fragmenty polimeru, rzędu milimetrów. Opisano implant z mieszaniny poli-L-laktyd/poli-DL-laktyd (80/20) (PLDLA) z osoczem bogatopłytkowym. W celu wytworzenia implantu zastosowano granulki polimeru o średnicy od 100 do 400  $\mu\text{m}$ , o porowatości około 75%, wielkości porów od 5 do 200  $\mu\text{m}$ . Granulki zostały wymieszane z PRP, a produkt miał formę żelu [24, 25].

Celem wynalazku było opracowanie sposobu otrzymywania przestrzennego implantu kostnego z polilaktydu nasączonego osoczem bogatopłytkowym

Sposób otrzymywania polilaktydowego substytutu kości gąbczastej nasączonego osoczem bogatopłytkowym według wynalazku charakteryzuje się tym, że osoczem bogatopłytkowym nasącza się materiał polilaktydowy o porowatości otwartej powyżej 80%, o dużych porach owalnych lub kulistych o wielkości w zakresie 150–800  $\mu\text{m}$ , połączonych mniejszymi porami o wielkości do 100  $\mu\text{m}$ , o nasiąkliwości masowej względem izopropanolu powyżej 600% i o module Younga co najmniej 0,1 MPa. Stosunek objętości osocza bogatopłytkowego do materiału polilaktydowego wynosi co najmniej 2:1. Materiał polilaktydowy poddaje się wirowaniu z osoczem bogatopłytkowym lub pozostawia się zanurzony w osoczu bogatopłytkowym.

Korzystnie materiał polilaktydowy poddaje się wirowaniu z osoczem bogatopłytkowym z szybkością obrotową do 2000 rpm.

Korzystnie materiał polilaktydowy modyfikuje się uprzednio za pomocą fosforanów wapnia. Materiał polilaktydowy zmodyfikowany za pomocą fosforanów wapnia korzystnie wiruje się w osoczu bogatopłytkowym z prędkością obrotową do 5000 rpm.

Wirowanie materiału polilaktydowego z osoczem bogatopłytkowym korzystnie prowadzi się w temperaturze od 20 do 37°C, w czasie od 2 do 15 min.

Korzystnie materiał polilaktydowy pozostawia się zanurzony w osoczu bogatopłytkowym w czasie od 10 min. do 24 h, w temperaturze od 30 do 37°C.

Sposób według wynalazku pozwala na równomierne nasączenie materiału polilaktydowego, stanowiącego implant kostny, przez osocze bogatopłytkowe, bez uszkodzenia struktury wewnętrznej trójwymiarowego rusztowania z polilaktydu. Zastosowanie wirowania w przypadku materiału polilaktydowego o morfologii innej, niż zdefiniowana zgodnie z wynalazkiem powoduje zniszczenie struktury wewnętrznej materiału albo nierównomierne nasączenie osoczem. Obserwuje się pękanie ścianek porów i zgniecenie porów. Naniesienie powłoki fosforanowo-wapniowej na materiał polilaktydowy pozwala na zwiększenie wydajności nasączenia implantu w warunkach statycznych i uodparnia strukturę wewnętrzną na niszczący wpływ wyższej prędkości wirowania.

Sposób według wynalazku pozwala na otrzymanie przestrzennych implantów polilaktydowych nasączonych równomiernie osoczem bogatopłytkowym.

Na rysunku przedstawiono:

Fig. 1. – Obrazy SEM w powiększeniu 100x przedstawiające morfologię wewnętrzną materiału polilaktydowego niespełniającego (1a) i spełniającego (1b) kryteria opisane w wynalazku. Przedstawiono strukturę wewnętrzną po wirowaniu z prędkością 2000 rpm (1c,d) i 5000 rpm (1e,f).

Fig. 2. – Zdjęcia z aparatu cyfrowego przedstawiające przekrój materiału polilaktydowego niespełniającego (2a) i spełniającego (2b) kryteria opisane w wynalazku po wirowaniu z osoczem bogatopłytkowym, z prędkością 2000 rpm.

Fig. 3. – Zdjęcie z aparatu cyfrowego przedstawiające przekrój materiału polilaktydowego niespełniającego kryteriów opisanych w wynalazku po wirowaniu z osoczem bogatopłytkowym, z prędkością 5000 rpm.

Sposób według wynalazku został bliżej przedstawiony w przykładach.

**P r z y k ł a d 1**

Przestrzenny materiał polilaktydowy, cechujący się występowaniem porów owalnych i kulistych o wielkości 300–800  $\mu\text{m}$ , z mniejszymi porami w ściankach do 100  $\mu\text{m}$  (perforacje) wewnątrz struktury (Fig. 1b), posiadający moduł Younga  $0,35 \pm 0,03$  MPa, nasiąkliwość masową względem izopropanolu  $1650 \pm 50\%$ , porowatość otwartą  $96,0 \pm 0,1\%$ , wirowano z osoczem w stosunku objętościowym do osocza 1:2, z szybkością 2000 rpm, przez 8 minut, w temperaturze 37°C. Uzyskano jednorodne rozprowadzenie osocza w substytucie (Fig. 2b). Ciemniejsze zabarwienie świadczy o obecności osocza. Zachowaną morfologię wewnętrzną substytutu po wirowaniu z osoczem przedstawiono na Fig. 1d.

Przykład 2, porównawczy.

Przestrenny materiał polilaktydowy, cechujący się występowaniem porów podłużnych o długości do 400  $\mu\text{m}$ , bez mniejszych porów w ściankach (perforacji) wewnątrz struktury (Fig. 1a), posiadający moduł Younga  $0,48 \pm 0,03$  MPa, nasiąkliwość masową względem izopropanolu  $1380 \pm 50\%$ , porowatość otwartą  $94,5 \pm 0,1\%$ , wirowano z osoczem bogatopłytkowym w stosunku objętościowym polilaktydu do osocza 1:2, z szybkością 2000 rpm, przez 8 minut, w temperaturze  $37^\circ\text{C}$ . Uzyskano niejednorodne rozprowadzenie osocza w substytucie (Fig. 2a). Ciemniejsze zabarwienie świadczy o obecności osocza. Morfologię wewnętrzną części substytutu z osoczem przedstawiono na Fig. 1c.

Przykład 3, porównawczy.

Zastosowano materiał polilaktydowy jak w przykładzie 2 (Fig. 1a), z tym, że wirowano go z osoczem bogatopłytkowym, z szybkością 5000 rpm, przez 15 minut, w  $37^\circ\text{C}$ . Uzyskano jednorodne rozprowadzenie osocza w substytucie (Fig. 3), ale nie zachowano struktury wewnętrznej (Fig. 1e).

Przykład 4

Zastosowano materiał polilaktydowy jak w przykładzie 1, z tym, że wirowano go z osoczem bogatopłytkowym, z szybkością 5000 rpm, przez 15 minut, w  $37^\circ\text{C}$ . Uzyskano jednorodne rozprowadzenie osocza w substytucie, ale nie zachowano struktury wewnętrznej (Fig. 1f).

Przykład 5

Zastosowano materiał polilaktydowy jak w przykładzie 1, na który naniesiono powłokę fosforowo-wapniową. Materiał wirowano z osoczem bogatopłytkowym, z szybkością 5000 rpm, przez 15 minut, w  $37^\circ\text{C}$ . Uzyskano jednorodne rozprowadzenie osocza w substytucie, z zachowaniem struktury wewnętrznej.

Przykład 6

Zastosowano materiał polilaktydowy jak w przykładzie 1, na który naniesiono powłokę fosforowo-wapniową. Zanurzono go w osoczu bogatopłytkowym w stosunku objętościowym polilaktydu do osocza 1:2, na 24 h w  $37^\circ\text{C}$ . Uzyskano jednorodne rozprowadzenie osocza w materiale.

Literatura:

- [1] EH Schemitsch. Size Matters: Defining Critical In Bone Defect Size! J Orthop Trauma. 2017,31, S20.
- [2] Europejska Fundacja Osteoporozy I Chorób Mięśniowo-Szkieletowych, Raport Osteoporoza – Cicha Epidemia W Polsce, Kraków, 2015.
- [3] RE Marx, ER Carlson, RM Eichstaedt, SR Schimmele, JE Strauss, KR Georgeff. Platelet-rich plasma: growth factor enhancement for bone grafts. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 1998, 85, 638.
- [4] GM Raghoobar, J Schortinghuis, RS Liem, JL Ruben, JE van der Wal, A Vissink. Does platelet-rich plasma promote remodeling of autologous bone grafts used for augmentation of the maxillary sinus floor? Clin Oral Implants Res. 2005, 16, 349.
- [5] P Arpornmaeklong, M Kochel, R Depprich, NR Kübler, KK Würzler. Influence of platelet rich plasma (PRP) on osteogenic differentiation of rat bone marrow stromal cells. An in vitro study. Int J Oral Maxil Surg. 2004, 33, 60.
- [6] HH Lu, JM Vo, HS Chin, J Lin, M Cozin, R Tsay, S Eisig R Landesberg. Controlled delivery of platelet-rich plasma-derived growth factors for bone formation. J Biomed Mater Res. 2008, 86A, 1128.
- [7] A Hokugo, M Ozeki, O Kawakami, K Sugimoto, K Mushimoto, S Morita, Y Tabata. Augmented Bone Regeneration Activity of Platelet-Rich Plasma by Biodegradable Gelatin Hydrogel. Tis Eng. 2005, 11, 1224.
- [8] Shi-Jiang Zhu, Byung-Ho Choi, Jae-Hyung Jung, Seoung-Ho Lee, Jin-Young Huh, Tae-Min YHJ Lee, J Li. A comparative histologic analysis of tissue-engineered bone using platelet-rich plasma and platelet-enriched fibrin glue. Oral Surg Oral Med, Oral Path, Oral Radiol, Endod. 2006, 102, 175.
- [9] KH Schuckert, S Jopp, M Osadnik. The use of platelet rich plasma, bone morphogenetic protein-2 and different scaffolds in oral and maxillofacial surgery – literature review in comparison with own clinical experience. J Oral Maxil Res. 2011, 2, e2.
- [10] E Anitua, R Tejero, MH Alkhraisat, MH Alkhraisat, G Orive. Platelet-rich plasma to improve the bio-functionality of biomaterials. BioDrugs. 2013, 27, 97.

- [11] JH Yun, JH Yoo, SH Choi, MH Lee, SJ Lee, U Sun, SNS Oh. Synergistic effect of bone marrow-derived mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma on bone regeneration of calvarial defects in rabbits. *Tissue Eng Regen Med.* 2012, 9, 17.
- [12] WY Ip, S Gogolewski. Clinical Application of Resorbable Polymers in Guided Bone Regeneration. *Macromol Symp.* 2007, 253, 139.
- [13] SP Avera, WA Stampleg, BS McAllister. Histologic and clinical observation of resorbable and non resorbable barrier membranes used in maxillary sinus graft containment, *Int J Oral Maxil Implants.* 1997, 12, 88.
- [14] S Slomkowski. Biodegradable Polyesters for Tissue Engineering, *Macromol Symp.* 2007, 253, 47, 58.
- [15] PS Wolfe, JJ Ericksen, DG Simpson, GL Bowlin, SA. Sell. Incorporating Platelet-Rich Plasma into Electrospun Scaffolds for Tissue Engineering Applications, *Tissue Eng Part A.* 2011, 17, 2723.
- [16] EJ Park, ES Kim, HP Weber, RF Wright, DJ Mooney. (). Improved bone healing by angiogenic factor-enriched platelet-rich plasma and its synergistic enhancement by bone morphogenetic protein-2. *Int j oral maxil implants.* 2008, 23, 818.
- [17] HS Kwak, J Nam, J Lee, HJ Kim, JJ Yoo. () Meniscal repair in vivo using human chondrocyte-seeded PLGA mesh scaffold pretreated with platelet-rich plasma. *J Tissue Eng Regen Med.* 2017, 11, 471.
- [18] B Rai, SH Teoh, KH Ho. An in vitro evaluation of PCL-TCP composites as delivery systems for platelet-rich plasma, *J Control Rel,* 2005, 107, 330.
- [19] S Gogolewski, L Pineda, CM Büsing. Bone regeneration in segmental defects with resorbable polymeric membranes: IV. Does the polymer chemical composition affect the healing process? *Biomaterials.* 2000, 21, 2513.
- [20] JO Hollinger. Preliminary report on the osteogenic potential of a biodegradable copolymer of polylactide (PLA) and polyglycolide (PGA). *J Biomat Mat Res Part B: Applied Biomat.* 1983, 17, 71.
- [21] CS Leiggenger, R. Curtis, AA Müller, D Pflüger, S Gogolewski, BA Rahn. Influence of copolymer composition of polylactide implants on cranial bone regeneration. *Biomaterials,* 2006, 27, 202.
- [22] G Schmidmaier, K Baehr, S Mohr, M Kretschmar, S Beck, B Wildemann. Biodegradable polylactide membranes for bone defect overage: biocompatibility testing, radiological and histological evaluation in a sheep model. *Clinical Oral Implants Res.* 2006, 17, 439.
- [23] M Tatullo, M Marrelli, F Paduano. The regenerative medicine in oral and maxillofacial surgery: the most important innovations in the clinical application of mesenchymal stem cells. *Int J Med Sci.* 2015, 12, 72.
- [24] K Ficek, J Filipek, P Wojciechowski, K Kopec, SZ Ewa, S Błazewicz. A bioresorbable polylactide implant used in bone cyst filling. *J Mater Sci: Mater Med.* 2016, 27, 33.
- [25] B Błaszczuk, W Kaspera, K Ficek, M Kajor, M Binkowski, E Stodolak-Zych, A Grajoszek, J Stojko, H Bursig, P Ładziński. Effects of Polylactide Copolymer Implants and Platelet-Rich Plasma on Bone Regeneration within a Large Calvarial Defect in Sheep. *BioMed Res Int.* 2018, Article ID 4120471.

## Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób otrzymywania polilaktydowego substytutu kości gąbczastej nasączonego osoczem bogatopłytkowym, **znamienny tym**, że osoczem bogatopłytkowym nasącza się materiał polilaktydowy o porowatości otwartej powyżej 80%, o dużych porach owalnych lub kulistych o wielkości w zakresie 150–800  $\mu\text{m}$ , połączonych mniejszymi porami o wielkości do 100  $\mu\text{m}$ , o nasiąkliwości masowej względem izopropanolu powyżej 600% i o module Younga co najmniej 0,1 MPa, ewentualnie zmodyfikowany uprzednio przez naniesienie powłoki z fosforanów wapnia, przy czym materiał polilaktydowy poddaje się wirowaniu z osoczem bogatopłytkowym lub pozostawia się zanurzony w osoczu bogatopłytkowym, a stosunek objętości osocza bogatopłytkowego do materiału polilaktydowego wynosi co najmniej 2:1.

2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że materiał polilaktydowy niemodyfikowany uprzednio za pomocą fosforanów wapnia poddaje się wirowaniu z osoczem bogatopłytkowym z prędkością obrotową do 2000 rpm.
3. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że materiał polilaktydowy zmodyfikowany uprzednio za pomocą fosforanów wapnia poddaje się wirowaniu w osoczu bogatopłytkowym z prędkością obrotową do 5000 rpm.
4. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że wirowanie materiału polilaktydowego z osoczem bogatopłytkowym prowadzi się w temperaturze od 20 do 37°C, w czasie od 2 do 15 min.
5. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że materiał polilaktydowy pozostawia się zanurzony w osoczu bogatopłytkowym w czasie od 10 min do 24 h, w temperaturze od 20 do 37°C.

Rysunki

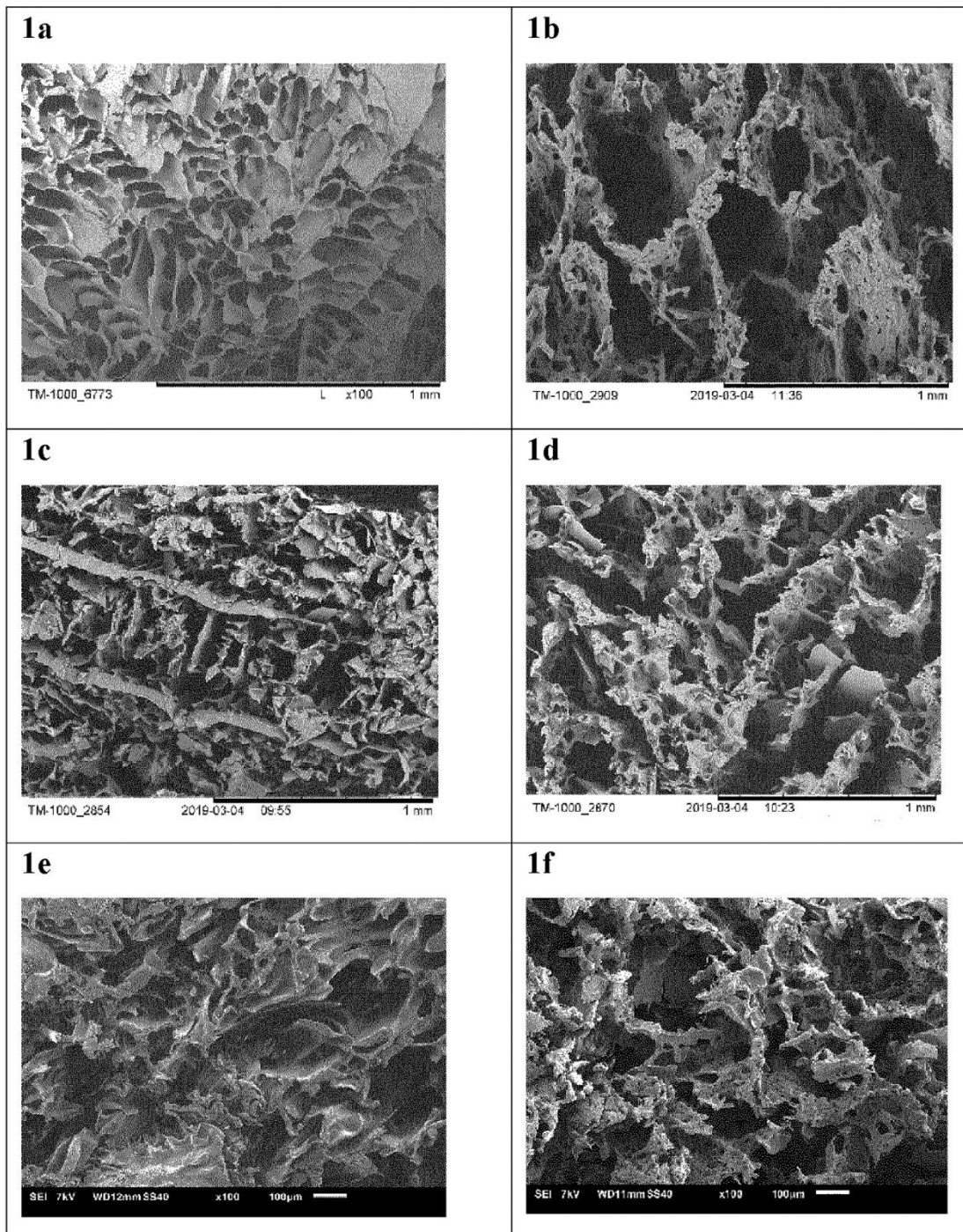
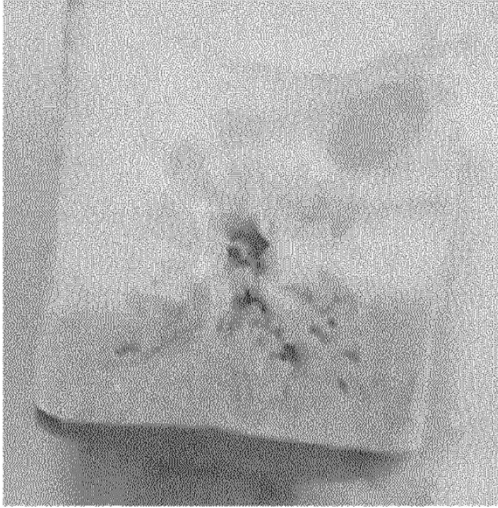
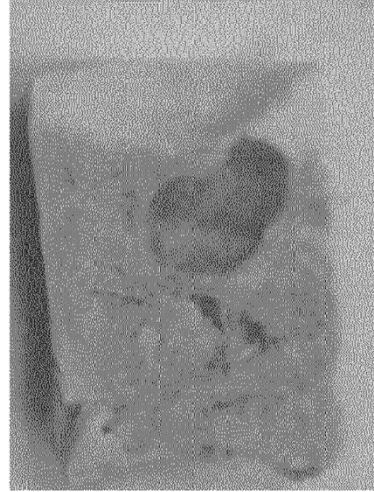


Fig. 1

2a

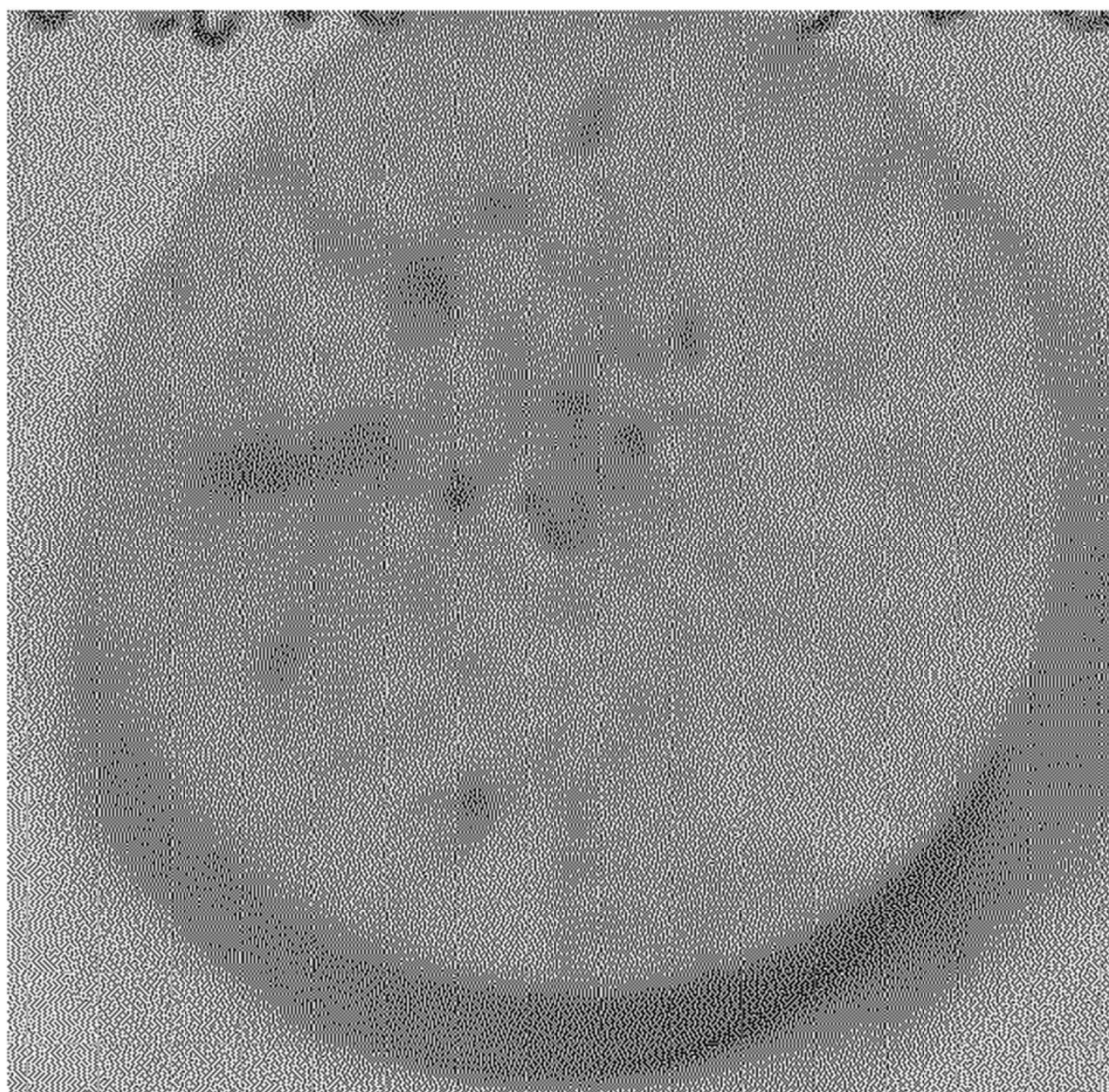


2b



**Fig. 2**





**Fig. 3**