



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **113143** (13) **U**
 (51) МПК (2016.01)
A61L 27/00
A61L 27/30 (2006.01)
A61L 27/36 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
 ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
 ВЛАСНОСТІ
 УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2016 08113	(72) Винахідник(и): Суходуб Леонід Федорович (UA), Суходуб Людмила Борисівна (UA)
(22) Дата подання заявки: 22.07.2016	(73) Власник(и): СУМСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, вул. Римського-Корсакова, 2, м. Суми, 40007 (UA)
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 10.01.2017	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.01.2017, Бюл.№ 1	

(54) КОМПОЗИЦІЯ ДЛЯ ЗАПОВНЕННЯ КІСТКОВИХ ДЕФЕКТІВ

(57) Реферат:

Композиція для заповнення кісткових дефектів складається із двох основних компонентів, а саме компонента А, представленого поліаміносахаридами, компонента В, представленого біосумісною фосфатною речовиною у вигляді натрію триполіфосфату, а також сумішшю біологічно активних речовин. Як компонент А – полісахарид, застосовують хітозан з молекулярною масою ≥ 200 kDa та ступенем деацетилювання ≥ 85 % або суміш хітозану із желатином при об'ємному співвідношенні хітозану до желатину 1:1. Як біологічно-активні речовини, які безпосередньо додають до компонента А, застосовують наночастинки хітозану, модифіковані іонами Ag^+ або Mg^{2+} , або Cu^{2+} , або Fe^{3+} у вигляді дрібнодисперсного (≤ 50 мкм) ліофілізованого порошку, "Аквадетрим вітамін Д" та декаметоксин, сумарна кількість яких становить до 4 мас. % від маси компонента А. При цьому вміст компонентів в композиції становить: компонент А: хітозан або хітозан+желатин - 83-56 мас. %, компонент В: триполіфосфат натрію - 15-40 мас. %, біологічно-активні речовини - 2-4 мас. %.

UA 113143 U

Корисна модель належить до медичної інженерії, а саме до композитних полімер-неорганічних лікарських форм, призначених до використання в ортопедії та стоматології для стимулювання процесу росту нової кісткової тканини, заміщення ушкоджених чи видалених ділянок кістки, а також для пролонгованої доставки біологічно активних речовин у зону дефекту.

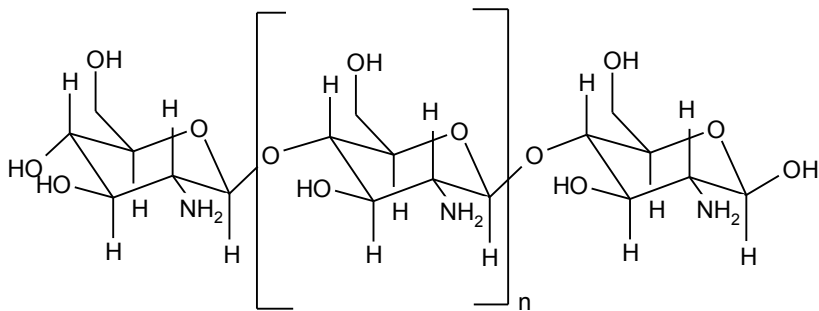
5 В сучасних умовах військових дій в Україні проблема пошуку та виробництва універсального та відносно дешевого матеріалу для відновлення цілісності кісткової тканини є однією з найгостріших проблем. Інженерія кісткової тканини вимагає пошуку новітніх матеріалів, які індукують формування нової кістки, запобігають росту небажаних сполучних тканин, поповнюють втрату кісткової маси, а також сприяють росту кровоносних судин та проліферації кісткових остеобластів на ранній стадії.

10 В даному аспекті найбільш перспективними є композитні матеріали на основі полімерів природного походження та неорганічних фосфатних сполук з розгалуженою системою пор, що сприяє проростанню нативної кісткової тканини в об'єм імплантату з поступовою його біодеградацією та заміщенням природною кісткою. Присутність полімерної складової та введені біологічно активні речовини надають матеріалу біоактивності.

Полімерна складова.

Полісахариди широко застосовуються в біоінженерії завдяки наявності в хімічній структурі функціональних гідроксил-, алкіл-, аміно- груп, які можуть бути здатними до взаємодії з іншими компонентами реакційної системи за фізіологічних умов.

20 Використання хітозану як полімерної складової обумовлене його біосумісністю та здатністю до біодеградації. Хітозан, похідне хітину, є лінійним кристалічним полісахаридом, що складається з мономерів β -(1 \rightarrow 4)N-ацетил-D-глюкозаміну. Фрагмент макромолекули хітозану представлений наступною структурною формулою:

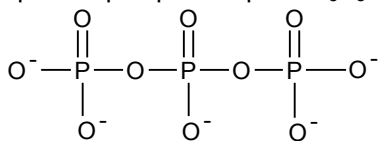


25 Структурна подібність хітозану до екстраклітинного матриксу глікозаміногліканів робить його привабливим біополімером для кісткової тканини. За рахунок еластичності та пористості хітозанові матрикси легко заповнюють кісткові дефекти різної геометрії. Тим не менше, не зважаючи на задовільні результати експериментів на тваринах, а саме збільшення остеогенезу і ангіогенної активності без утворення фіброзної тканини, хітозан не достатньо остеогенний, щоб самостійно викликати бажану швидку кісткову регенерацію на початковому етапі лікування кістки [1].

Желатин - продукт денатурації основної органічної складової кісткової тканини - колагену; це білковий продукт тваринного походження, який являє собою суміш лінійних поліпептидів з різною молекулярною масою. Його основними компонентами є гліцин, пролін і оксипролін.

35 Мінеральна складова

40 В останній час великий науковий інтерес викликають неорганічні полімери - поліфосфати (ПФ), їх загальна формула - $M(n+2)P_nO(3n+1)$. Це солі поліфосфорної кислоти, які мають у розчині два типи гідроксильних груп з різною тенденцією до дисоціації: бокові групи (дві у молекулі) є слабкими кислотами, а середні гідроксильні групи, кількість яких дорівнює кількості атомів фосфору, є сильно кислотними. Неорганічні поліфосфати визнані як терапевтичний агент, який стимулює ростовий фактор фібробластів і підсилює остеогенну диференціацію стовбурових клітин, а також, будучи адсорбованим на пористій поверхні ГА *in vivo*, підсилює кісткову регенерацію [2]. Прикладом низькомолекулярного неорганічного поліфосфату є триполіфосфат натрію $Na_5P_3O_{10}$ (ТПФ), представлений наступною структурною формулою:



45

Введення фосфатних функціональних груп в структуру хітозану (фосфорилування) представляє інтерес для тканинної інженерії. Дія поліфосфатів в ролі катіонних іонообмінників базується на їх здатності обмінювати іонно приєднані катіони (Na^+ , Ca^{2+}) на катіони біомолекул у розчині. Літературні джерела свідчать, що фосфорельовані хітозанові мембрани індукують біоміметичну депозицію кальцій фосфатів *in vitro*, що надає полімер-апатитним імплантатам остеокондуктивних властивостей [3]. Полімерна сітка, яка формується при "зшиванні" хітозану поліфосфатами, може слугувати як система для іммобілізації лікарських засобів з подальшою їх доставкою в проблемну зону шляхом дифузії [4].

Біологічно активні речовини

Наночастинки хітозану були отримані відомим методом іонотропного гелеутворення з використанням натрієвої солі триполіфосфату завдяки взаємодії протилежно заряджених іонів макромолекул хітозану, як полікатіону, та негативно зарядженої молекули натрієвої солі триполіфосфату ($\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$), яка при кислих значеннях ($\text{pH}=3$) присутня в розчині у вигляді фосфонієвого аніону $\text{P}_3\text{O}_{10}^{5-}$. Для підсилення протимікробної дії, властивій наночастинкам хітозану, останні були додатково модифіковані іонами Ag^+ , Mg^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} . Суспензії наночастинок, легованих іонами металів, проявляють сильнішу протимікробну дію, ніж суспензія наночастинок чистого хітозану, і значно перевищують протимікробну активність відповідних іонів металів. Найбільшу протимікробну активність проявили наночастинки хітозану, леговані іонами Ag^+ . Їх мінімальна інгібуюча концентрація (МІК) в порівнянні з МІК наночастинок чистого хітозану для мікроорганізмів *E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans* знизилась в 8, 4, та 2 рази відповідно, а в порівнянні з МІК іону Ag^+ - в 5, 40 та 10 разів відповідно [5]. Позитивно заряджені групи хітозану, приєднуючись до негативно зарядженої поверхні мікробної клітини, порушують її метаболізм [6]. Очевидно, що іони металів, додані до розчину хітозану, зшивають його молекули та роблять структуру більш щільною, в результаті чого збільшується ефект протимікробної дії.

Серед наукових розробок, присвячених матеріалам для відновлення кісткової тканини, відома заливна композиція для сполучення кісткових фрагментів, яка складається з водорозчинного хітозану, допованованого білком β ig-h3 (300 мкг/мл - 600 мкг/мл) або морфогенним білком BMP-4 (100-300 нг/мл), та 5 % розчину триполіфосфату (винахід US № 2006018973 (A1) -Composition for stimulating bone-formation and bone consolidation (МПК А61К 31/722; А61К 33/42; А61К 38/18; А61L 24/00; А61L 27/46; опубл.26.01.2006). При цьому доля триполіфосфату складає від 20 до 80 % відносно водорозчинного хітозану, а вказані компоненти одночасно вводять в ділянку дефекту з допомогою здвоєного шприца для запобігання миттєвого розповсюдження матеріалів на оточуючі дефект тканини. За свідченням авторів при сполученні водорозчинного хітозану та триполіфосфату відбувається миттєве затвердіння композиції, яка стимулює ріст кістки на ранній стадії. Однак, недоліком даного матеріалу є неможливість *in situ* (після введення компонентів у зону дефекту) відкорегувати його кислотність. Адже відомо, що 5 % розчин триполіфосфату є лужним середовищем з $\text{pH}>9$, що може викликати негативну реакцію оточуючих тканин. Також в умовах відсутності перемішування не гарантований рівномірний розподіл та повна взаємодія компонентів у зоні їх введення.

Відомий також винахід RU № 2421229 - Пористый композиционный хитозан-желатиновый матрикс для заполнения костных дефектов (МПК А61К 31/722; А61К 33/06; А61L27/56; А61L27/12; А61L27/26; опубл. 20.06.2011 р.), який окрім хітозану включає до 60 мас. % желатини та 0,4 мас. % лаурилсульфату натрію і карбонату амонію як поро- та піноутворювачів. Після змішування всіх компонентів суміш ліофільно висушували, потім відмивали та знову сушили при температурі 80 °С для видалення карбонату амонію. При цьому формувалася губчатий матеріал, пористість якого складала більше 90 %. Однак, недоліком даної технології окрім певної її складності є введення лаурилсульфату, який в промисловості використовується як засіб для очищення та змочування, а також як піноутворювач при виробництві миючих засобів. Лаурилсульфат може бути сильним алергеном для людини, тому експерти не рекомендують його використовувати в продуктах, розрахованих на тривалий контакт зі шкірою.

За хімічним та компонентним складом найбільш близьким до запропонованої корисної моделі є винахід US 2012/0251536 A1 Biopolymer Hybrid Gel-Depot Delivery System (МПК А61К 39/395; А61К 38/22; А61К 31/566; А61 К 38/28), який вибрано за найближчий аналог. Авторами представлена гідрогелева композиція, спрямована для контрольованого та пролонгованого постачання біологічно-активних агентів з метою терапевтичного лікування дефектних зон організму, в тому числі кісткових. Композиція складається з поліаміносахариду (компонент А: хітин, гіалуронат, хітозан переважно молекулярної маси 50-80 кДа), біосумісних фосфатних або сульфамідних сполук (компонент В: триполіфосфат, діамінокарбоксисульфонат), використаних

в ролі "зшиваючих агентів". При цьому співвідношення А:В =1:1÷1:2. Для підвищення еластичності та збільшення терміну стабільності гідрогелю до складу матеріалу був введений протеоглікан (компонент Д-хондроїтин сульфат). Як біологічно активні агенти запропоновано лікарські засоби, вакцини, молекули ДНК. Прикладом виконання показано, що на першому етапі готують суспензію порошку гідроксіапатиту, яку додають до 2 мас. % розчину хітозану (М.М. 150 к Да) в 1 % оцтовій кислоті. До отриманої композиції додають суміш з 1 мас. % розчину хондроїтин сульфату та 100 мМ розчин триполіфосфату. Після неінтенсивного перемішування при кімнатній температурі відбувається спонтанне утворення гідрогелю з високим ступенем синерезису - самочинним зменшенням розмірів гелю за рахунок виділення дисперсійного середовища (наразі за даними авторів збідненого хітозаном. Пропонується ін'єкційно подавати компоненти для формування гідрогелю *in situ* (в зоні дефекту). Для цього застосувати двокамерний шприц, в якому відокремити компоненти А та С від компонента В для запобігання передчасного формування гідрогелю в шприці, що унеможливує проходження матеріалу через голку. Очевидна ефективність матеріалу як системи для доставки лікарських засобів, які адсорбуються, піддаються ферментативній деградації або втрачають свою активність при оральному або внутрішньо-м'язовому їх введенні. Дана композиція є ефективною, як матеріал для відновлення кісткової тканини, оскільки є додатковим джерелом іонів кальцію та фосфору.

Але, на наш погляд, матеріал має ряд недоліків, а саме: а) при формуванні гідрогелю *in situ* від твердої фракції матеріалу за рахунок процесу синерезису відділяється рідка фракція дисперсійного середовища, яка є водною суспензією залишків компонентів, що не увійшли до складу гідрогелю. За даними експертів матеріали у рідкому стані в умовах організму піддаються розмиванню потоком крові та рознесенню на непередбачені операційним процесом ділянки, що викликає негативний відгук організму; б) складнощі, пов'язані з застосуванням матеріалу - обмежена придатність компонентів матеріалу, яка залежить від форми, умов та терміну їх зберігання; компоненти потребують підготовки перед забором в двокамерний шприц, їх агрегатний стан повинен забезпечувати проходження через канал голки.

В основу запропонованої нами корисної моделі поставлена технічна задача створити біосумісний з нативним оточенням матеріал для застосування в хірургічній медицині, який має стимулювати процес відновлення кісткової тканини, заміщувати ушкоджені чи видалені ділянки кістки, в якому молекули природного катіоніту хітозану, будучи хімічно "зшитими" триполіфосфатом натрію, утворюють гранульовані (кулькоподібної) форми матеріал, на поверхневій мембрані якого присутні фосфатні групи, здатні в умовах організму іммобілізувати сигнальні біомолекули, такі, наприклад, як фактори росту; форма матеріалу забезпечує заповнення дефектів складної геометрії з мінімальним зазором між кісткою та імплантатом, а простір між гранулами сприяє формуванню нових кісткових тканин по всьому об'єму імплантату; присутність легованих іонами металів наночастинок хітозану надасть матеріалу протимікробних властивостей; технологія виготовлення дозволяє отримати готовий до використання матеріал з контрольованою нейтральною кислотністю, без застосування допоміжних хімічних речовин. Матеріал не спричинюватиме побічних ефектів, буде зручним при стерилізації та використанні, матиме тривалий термін зберігання.

Поставлена задача вирішується тим, що у відомому матеріалі, який складається із двох основних компонентів Л та В, де як компонент А застосовують поліаміносахариди, а як компонент В - триполіфосфат натрію, а також суміші біологічно активних речовин, згідно з корисною моделлю, компонент Л представлений 2-3 мас. % розчином хітозану (молекулярна маса М.М. ≥ 200 кДа, ступінь деацетилювання (СД) ≥ 85 %) в 1 мас. % оцтовій кислоті або сумішшю розчину хітозану та 4-8 мас. % розчину желатину (1:1, об'ємні частки), а концентрація компонента В складає 25-100 мМ, при цьому до компонента А як біологічно активні речовини додані наночастинок хітозану, модифіковані іонами Ag^+ , або Mg^{2+} , або Cu^{2+} , або Fe^{3+} у вигляді дрібнодисперсного ліофілізованого порошку, комерційні лікарські засоби - "аквадетрим вітамін Д" та декамеюксин, сумарна кількість яких складає від 2 до 4 мас. % від маси компонента А, а вміст матеріалів є наступним і складає:

компонент А: хітозан або хітозан+желатин	83-56 мас. %
компонент В: триполіфосфат натрію	15-40 мас. %
біологічно активні речовини	2-4 мас. %.

Втілення всіх вказаних ознак, в тому числі відмінних, дозволить отримати біоматеріал у формі ліофілізованих або висушених при кімнатній температурі кулькоподібних гранул для заповнення кісткових дефектів та стимулювання пронесу відновлення кісткової тканини, що забезпечить заповнення дефектів складної геометрії з мінімальним зазором між кісткою та імплантатом, а простір між гранулами сприятиме формуванню нових кісткових тканин по всьому об'єму імплантату; присутні біологічно активні речовини, а саме наночастинки хітозану, модифіковані іонами Ag^+ , або Mg^{2+} , або Cu^{2+} , або Fe^{3+} у вигляді дрібнодисперсного ліофілізованого порошку, аквадетрим вітамін Д та розчин декаметоксину, іммобілізовані в хімічно "зшитій" триполіфосфатом натрію хітозановій або хітозан-желатиновій матриці нададуть матеріалу протимікробних властивостей; фосфатні групи, присутні на поверхневій мембрані гранул, здатні в умовах організму іммобілізувати сигнальні біомолекули, такі, наприклад, як фактори росту фібробластів; матеріал є стимулятором проліферативної та біосинтетичної активності остеобластів, підсилює остеогенну диференціацію стовбурових клітин, в період відновлення та росту нової кісткової тканини.

Вище сказане було підтверджено під час *in vivo* досліджень в експериментально-біологічній клініці ДУ "Інститут патології хребта та суглобів ім. проф. М.І. Ситенка НАМН України" (м. Харків). Було засвідчено утворення нової кісткової тканини в оточенні фрагментів біоматеріалу без формування прошарків з'єднувальної тканини, без ознак запальної реакції. У фрагментах біоматеріалу спостерігались адгезовані клітини, як прообраз формування остеоїду. Вище наведене демонструється наступними прикладами виконання:

Приклад 1.

1. Розчиняємо 0,2 г хітозану (М.М. 200 кДа, СД 85 %) в 10 мл 1 мас. % розчину оцтової кислоти при температурі 37 °С протягом 6 годин та фільтруємо для отримання однорідної суспензії; додаємо 6 мг дрібнодисперсного (≤ 50 мкм) порошку модифікованих іонами Mg^{2+} наночастинок хітозану, 2 мкл комерційно придбаного препарату "Вітамін Д", 1 мг декаметоксину. Застосовуємо перемішування ультразвуком протягом 1 хвилини.

2. Крапельним методом (1 мл/хв) вводимо суспензію, утворену на стадії 1 в 1 мас. % водний розчин нагрію триполіфосфату (25 мМ) при періодичному перемішуванні. При цьому утворюються кульки композитного матеріалу, які вигримуємо у вказаному розчині протягом 12 год. при кімнатній температурі та значенні рН=9-10.

3. Фільтруванням відділяємо утворений матеріал від розчину триполіфосфату з наступним промиванням в дистильованій воді до нейтрального значення рН та висушуванням при кімнатній температурі; в іншому випадку промитий матеріал заморожується при температурі -18 °С з подальшим ліофільним висушуванням при температурі -180° С.

Приклад 2.

1. До 5 мл 2 мас. % розчину хітозану (М.М. 200 кДа, СД 85 %) в 1 мас. % оцтовій кислоті, отриманого при температурі 37 °С протягом 6 годин, додаємо 5 мл водного розчину желатину з концентрацією 8 мг/мл. Додаємо 2 мг дрібнодисперсного (≤ 50 мкм) порошку модифікованих іонами Ag^+ наночастинок хітозану, 3 мкл комерційно придбаного препарату "Вітамін Д", 1 мг декаметоксину. Застосовуємо перемішування ультразвуком протягом 1 хвилини. Подальші дії аналогічні прикладу 1.

Таким чином, застосування композиції для заповнення кісткових дефектів дозволить прискорити утворення нової кісткової тканини, скоротити післяопераційний період завдяки стимуляції проліферативної та біосинтетичної активності остеобластів, підсилення остеогенної диференціації стовбурових клітин в період відновлення та росту нової кісткової тканини.

Промислове використання.

Використання матеріалу в операційних процесах лікування кісткових тканин в ортопедії та стоматології можливе та рекомендоване, що доведено проведеними *in vivo* дослідженнями.

Список використаних джерел інформації:

1. F. Zhao, Y. J. Yin, W. W. Lu, J. C Leong, W. J. Zhang, J. Y. Zhang, M. F. Zhang and K. D. Yao Preparation and histological evaluation of biomimetic three-dimensional /Biomaterials. - 2002. - V.23. - P. 3227.

2. K. Doi, T.Kubo, R. Takeshita, S. Kajihara, S. Kato, Y. Kawazoe, T. Shiba and Y. Akagawa Inorganic polyphosphate adsorbed onto hydroxyapatite for guided boneregeneration: An animal study / Dental Materials Journal - 2014. - V. 33(2). - P. 179-186

3. Amaral, I. F., Granja, P. L. Barbosa, M. A. Chemical modification of chitosan by phosphorylation: an XPS, FT-IR and SEM study / J. Biomater. Sci. Polymer Edn.-2005. - Vol. 16, № 12. - P. 1575-1593.

4. Aiedeh, K. M., Taha, M. O., Al-Hiari, Y., Bustanji, Y., and Alkhatib, H. S. / Effect of ionic crosslinking on the drug release properties of chitosan diacetate matrices / J. Pharm. Sci.-2007. - V. 96 (1) - P. 38-43.

5. Суходуб, Л.Б. Протимікробна активність наночастинок хітозану, легованих Ag^+ , Cu^{2+} , Fe^{3+} Mg^{2+} іонами / Annals of Mechnikov Institute. 2015. - №. 1. - P. 39-43. - Режим доступу: www.imiamn.org.ua /journal.htm. www.

6. Singla, A. K. Chitosan: Some pharmaceutical and biological aspects an update / J. Pharm. Pharmacol. - 2001. - V. 53. - P. 1047-1067.

10

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Композиція для заповнення кісткових дефектів, яка складається із двох основних компонентів, а саме компонента А, представленого поліаміносахаридами, компонента В, представленого біосумісною фосфатною речовиною у вигляді натрію триполіфосфату, а також сумішшю біологічно активних речовин, яка **відрізняється** тим, що як компонент А - полісахарид, застосовують хітозан з молекулярною масою ≥ 200 kDa та ступенем деацетилювання ≥ 85 % або суміш хітозану із желатином при об'ємному співвідношенні хітозану до желатину 1:1, як біологічно-активні речовини, які безпосередньо додають до компонента А, застосовують наночастилки хітозану, модифіковані іонами Ag^+ або Mg^{2+} , або Cu^{2+} , або Fe^{3+} у вигляді дрібнодисперсного (≤ 50 мкм) ліофілізованого порошку, "Аквадетрим вітамін Д" та декаметоксин, сумарна кількість яких становить від 2 до 4 мас. % від маси компонента А, при цьому концентрація компонента В знаходиться на рівні 25-100 мМ і вміст складових компонентів в композиції за масою складає:

компонент А: хітозан або хітозан+желатин	83-56 мас. %
компонент В: триполіфосфат натрію	15-40 мас. %
біологічно активні речовини	2-4 мас. %.

Комп'ютерна верстка Д. Шеверун

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601