



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2016 00320**

(22) Data de depozit: **05/05/2016**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30/07/2020** BOPI nr. 7/2020

(41) Data publicării cererii:
29/11/2017 BOPI nr. 11/2017

(73) Titular:
• **INSTITUTUL DE CHIMIE FIZICĂ "ILIE MURGULESCU"**,
*SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR. 202,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO*

(72) Inventatori:
• **VASILESCU CORA**, *STR. LOTRIOARA
NR. 5, BL. V31, SC. C, AP. 113, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO;*
• **CALDERON MORENO JOSE MARIA**,
*STR. CRÂNGULUI NR. 9-11, SECTOR 1,
BUCUREȘTI, B, RO;*

• **DROB SILVIU IULIAN**,
*STR. RÂUL DOAMNEI NR.5, BL.C4, SC.D,
AP.140, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;*
• **POPA MONICA**, *STR. CRÂNGULUI
NR. 9-11, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO*

(56) Documente din stadiul tehnicii:
**C. E. GIACOMELLI, M. J. ESPLANDIU, P. I.
ORTIZ, M. J. AVENA ȘI C. P. DE PAULI**,
**ELLIPSOMETRIC STUDY OF BOVINE
SERUM ALBUMIN ADSORBED ONTO
Ti/TiO₂ ELECTRODES**", JOURNAL OF
COLLOID AND INTERFACE SCIENCES,
VOL. 218, PP. 404-411, 1999;
CN 101387002

(54) **METODĂ DE DEPUINERE PROTEINĂ BIOMIMETICĂ
PENTRU BIOFUNCȚIONALIZAREA OSTEOINTEGRATIVĂ
A SUPRAFEȚEI NOULUI ALIAJ Ti-15Ta-5Zr**



Invenția aparține domeniului tehnic al implanturilor metalice și se referă la creșterea capacității acestora de integrare în osul uman. Pe suprafața noului aliaj de implant Ti-15Ta-5Zr s-a depus o proteină „bovine serum albumin - BSA” care stimulează și îmbunătățește procesul de osteointegrare, de fixare a implantului în os.

Este cunoscut faptul că suprafețele metalice sunt în general inerte biochimic, stimulând foarte puțin dezvoltarea de os; și suprafețele metalice acoperite cu hidroxiapatită (HA) bioactivă au capacitate osteoinductivă limitată [B.K. Culpepper, M.C. Phipps, P.P. Bonvallet, S.L. Bellis, *Enhancement of peptide coupling to hydroxyapatite and implant osseointegration through collagen mimetic peptide modified with polyglutamate domain*, *Biomaterials*, **31**, (2010) 9586]; de aceea s-au dezvoltat metode de aplicare de factori osteogenici pe suprafața implanturilor metalice. La început, s-au folosit peptide [R. G. LeBaron, K. A. Athanasiou, *Extracellular matrix cell adhesion peptides: functional applications in orthopedic materials*, *Tissue Eng.* **6** (2000)85], dar procedura a fost complicată și nu a dat rezultate foarte bune. În prezent, se folosesc proteinele ca fibrinogen, fibronectină, vitramicină, care se adsorb repede și constituie o matrice bună pentru adeziunea și dezvoltarea celulelor stem mezenchimale; aceste celule migrează în zonele bolnave ale osului, se diferențiază și alcătuiesc o matrice care, ulterior, este mineralizată și remodelată de celulele osteoblaste, formând os nou [S. P. Bruder, N. Jaiswal, N. S. Ricalton, J.D. Mosca, K. H. Kraus, S. Kadiyala, *Mesenchymal stem cells in osteobiology and applied bone regeneration*, *Clin Orthop. Relat. Res.* **284** (1998) S247].

B. Ananthanarayanan ș.a. au preparat peptide sintetice prin adsorbție pe suprafețe de sticlă, care au acționat sinergetic în dezvoltarea și proliferarea celulelor stem [B. Ananthanarayanan, L. Little, D.V. Schaffer, K.E. Healy, *Neural stem cell adhesion and proliferation on phospholipid bilayers functionalized with RGD peptides*, *Biomaterials* **31** (2010) 8706].

B. K. Culpepper ș.a. au aplicat peptida mimetică de collagen pe suprafața unor discuri de HA prin intermediul matricei de policaprolactonă; discurile astfel obținute au acționat timp de 2 luni pe osul tibie de iepure, stimulând formarea de os nou [B.K. Culpepper, M.C. Phipps, P.P. Bonvallet, S.L. Bellis, *Enhancement of peptide coupling to hydroxyapatite and implant osseointegration through collagen mimetic peptide modified with polyglutamate domain*, *Biomaterials* **31** (2010) 9586].

X. Hu ș.a. au funcționalizat suprafața titanului cu dopamina, carboximetilchitosan și polizaharide, și au obținut îmbunătățirea creșterii celulelor osteoblaste și în același timp reducerea activității bacteriilor [X. Hu, K.G. Neoh, Z. Shi, E.T. Kang, C. Poh, W. Wang, *An in vitro assessment of titanium functionalized with polysaccharides conjugated with vascular endothelial growth factor for enhanced osseointegration and inhibition of bacterial adhesion*, *Biomaterials* **31** (2010) 8854].

C. J. Huang ș.a. au obținut o construcție biomimetică bistratificată folosind proteine multicomponente (colagen și/sau fibronectina) conjugate cu lipide (N-hidroxisulfccinimide) care au stimulat adeziunea și împrăștierea fibroblastelor [C.J. Huang, P.Y. Tseng, Y.C. Chang, *Effects of extracellular matrix protein functionalized fluid membrane on cell adhesion and matrix remodeling*, *Biomaterials*, **31** (2010) 7183].

F. Y. Oliva ș.a. au depus albumina serică umană (HSA) pe suprafața unui electrod de titan oxidat care conține oxid TiO_2 formă anatas nanocristalină. Studiile electrochimice au arătat că proteina a redus viteza de coroziune a suportului metalic prin blocarea ariilor active electrochimic de pe suprafața acestuia [F. Y. Oliva, L. B. Avalle, O. R. Camara, *Electrochemical behaviour of human serum albumin- TiO_2 nanocrystalline electrodes studied as a function of pH. Part. 1. Voltammetric response*, *J. Electroanal. Chem.* **534** (2002) 19].

Din prezentarea de mai sus rezultă că studiile incipiente existente în prezent au aplicații dedicate unor materiale și funcționalizări de suprafețe foarte specifice, singulare, aplicabile pe suprafețe de titan. Invenția de față se referă la funcționalizarea suprafeței aliajului ternar inovativ Ti-15Ta-5Zr folosind o metodă adaptată compoziției aliajului și filmului pasiv existent pe suprafața sa, și anume aplicarea de albumină serică bovină (BSA) din soluție fiziologică Ringer de pH neutru.	1
<i>Expunerea invenției</i>	7
<i>Prezentarea problemei tehnice pe care o rezolvă invenția</i>	9
Această invenție rezolvă problema funcționalizării biomimetice a suprafeței noului aliaj de implant Ti-15Ta-5Zr prin acoperire cu proteina BSA, cu o rugozitate mare, care conține elemente bioactive Ca și P, din soluția de depunere chimică.	11
<i>Prezentarea soluției tehnice</i>	13
Ca proteină, s-a folosit albumina din serul de bovine (bovine serum albumin), BSA care este foarte asemănătoare cu proteinele din corpul uman; s-a dizolvat această proteină în soluția fiziologică Ringer de pH = 7,4, care simulează condițiile normale de funcționare ale unui implant metalic în corpul uman. Prin metoda depunerii chimice, s-a acoperit suprafața noului aliaj cu BSA cu consum extrem de mic de energie electrică și mână de lucru.	15
Noutatea invenției constă în aceea că acoperirea cu BSA s-a aplicat pentru prima dată pe suprafața noului aliaj de implant Ti-15Ta-5Zr și s-a folosit soluția Ringer de pH = 7,4 ca mediu de depunere.	17
<i>Prezentarea avantajelor invenției în raport cu stadiul tehnicii</i>	19
Invenția prezintă următoarele avantaje:	21
- depunerea de proteină biomimetică BSA pentru osteointegrarea implantului prin stimularea aderenței celulelor osoase;	23
- această depunere crește rezistența la coroziune a suprafeței aliajului;	25
- se lucrează în soluții fiziologice, netoxice, nepoluante, sigure;	27
- depunerea se realizează la temperatura de 37°C cu consum foarte scăzut de energie electrică;	29
- prețul de cost al acoperirii cu BSA este foarte scăzut.	29
<i>Prezentarea în detaliu a unui exemplu de realizare a invenției revendicate</i>	31
Pregătirea substratului metalic:	31
- șlefuire progresivă cu hârtie abrazivă de diferite granulații, până la granulația 600;	33
- degresare în baie ultrasonică în acetonă "histological grade" timp de 30 min;	35
- degresare în baie ultrasonică în apă ultrapură Milipore timp de 30 min;	37
- uscare în aer timp de 5 min;	37
- imersare în soluția de depunere în recipient de sticlă, foarte bine spălat și uscat la etuvă, la 250°C; s-au asigurat 10 ml de soluție pentru fiecare 1 cm de suprafață metalică.	39
Pregătirea soluției de depunere:	39
- soluția fiziologică Ringer cu pH = 7,4 s-a obținut prin dizolvarea următoarelor substanțe "histological grade" în 1 l apă ultrapură Milipore: NaCl - 6,8; KCl - 0,4; CaCl ₂ - 0,2; MgSO ₄ · 7H ₂ O - 0,2048; NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O - 0,1438; NaHCO ₃ - 1,1; glucoză - 1;	41
- adaos de proteină BSA 2 g/L.	43
Depunerea proteinei biomimetice:	43
- temperatura 37°C menținută de o etuvă controlată digital;	45
- timp de imersie 6 zile, 144 h;	47
- scoatere și spălare cu apă ultrapură Milipore;	47
- uscare în aer timp de 30 min.	47
<i>Caracterizarea depunerii de proteină biomimetică pentru biofuncționalizarea suprafeței noului aliaj Ti-15Ta-5Zr</i>	49
Imaginile AFM arată formarea unor agregate cvasisferice, cu dimensiuni de 200...300 nm (fig. 1) foarte favorabile adeziunii celulare. Rugozitatea medie pătratică, RMS (root mean square roughness), de 76,8 nm, și cea medie a suprafeței, Rav (average surface roughness), de 60,8 nm, reprezintă o suprafață rugoasă potrivită pentru aderența celulelor osoase.	51
	53

RO 132259 B1

Micrografiile SEM confirmă rezultatele AFM, și anume se evidențiază o depunere consistentă, densă, uniformă (fig. 2). Spectrul EDS conține elementele specifice proteinei, C și N; de asemenea, apar elementele constitutive ale aliajului Ti, Ta, Zr, O; apar și elementele Ca și P elemente componente ale osului uman care stimulează aderarea și multiplicarea celulelor osteoblaste, deci formarea de os.

Spectrele Raman (fig. 3) evidențiază aceleași benzi pentru acoperirea cu BSA (b) comparativ cu pudra de BSA (a): banda de la 1000 cm^{-1} ; dubletul de benzi de la 830 cm^{-1} și 850 cm^{-1} ; dubletul Fermi de la 1340 cm^{-1} și 1360 cm^{-1} ; banda vibrațională imida de la $1600\text{--}1700\text{ cm}^{-1}$; banda de la 1655 cm^{-1} care indică o structură predominant α -helical.

Evaluarea metodei de depunere de proteină biomimetică pentru biofuncționalizarea suprafeței noului aliaj Ti-15Ta-5Zr

Caracteristicile acoperirii cu BSA au fost evaluate din rezistența la coroziune în soluție fiziologică Ringer neutră și alcalină, care simulează condiții severe de funcționare ale unui implant în organismul uman.

Rezistența la coroziune a depunerii de proteină biomimetică

Determinarea rezistenței la coroziune a substratului metalic acoperit în comparație cu cel neacoperit (tabel) s-a evaluat din valorile curentului, i_{cor} și vitezei V_{cor} de coroziune și de „Ion release”, care indică cantitatea de ioni eliberați în țesuturile înconjurătoare și din valorile rezistenței de polarizare, R_p care arată rezistența opusă de stratul de BSA la trecerea ionilor metalici prin acesta.

Principalii parametri de coroziune ai aliajului Ti-20Zr-5Ta-2Ag acoperit cu BSA și neacoperit în soluție Ringer de diferite valori de pH, la 37°C

Parametru	Ringer pH = 7,40		Ringe pH = 8,98	
	Neacoperit	Acoperit BSA	Neacoperit	Acoperit BSA
i_{cor} ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$)	0,010	0,0084	0,061	0,053
V_{cor} ($\mu\text{m}/\text{an}$)	0,092	0,0677	0,556	0,485
R_p ($\text{k}\Omega\text{ cm}^2$)	191	215	183	209
Ion release (ng/cm^2)	9,35	6,88	56,49	49,27
Clasa de rezistență	FS	FS	FS	FS

FS - Foarte Stabil

Din tabel rezultă că valorile i_{cor} , V_{cor} și „Ion release” pentru aliajul acoperit cu BSA sunt mai mici decât cele pentru aliajul neacoperit, și anume: procesul de coroziune al aliajului acoperit este mult mai mic decât a celui neacoperit; rezistența de polarizare R_p a aliajului acoperit a crescut în comparație cu cea a aliajului neacoperit, ceea ce indică faptul că aliajul acoperit cu BSA opune o rezistență mai mare la trecerea ionilor metalici din substrat în soluție. Cele mai bune valori ale parametrilor de coroziune au fost obținute în soluția Ringer neutră care reprezintă condiția normală din corpul uman în care funcționează un implant. În soluții Ringer alcalină, care simulează condiții de funcționare în caz de infecții sau inflamații, au fost înregistrați parametri de coroziune mai puțin favorabili datorită agresivității ușor mai ridicate a acestei soluții; totuși, în toate cele trei soluții, atât aliajul acoperit, cât și cel neacoperit se încadrează în clasa de rezistență „Foarte Stabil”. Prin urmare, acoperirea cu BSA protejează substratul de eliberare de ioni și minimizează astfel reacțiile adverse, crescând biocompatibilitatea noului aliaj.

Metodă de depunere a unei proteine biomimetice, respectiv albumina serică bovină, pe suprafața unui aliaj Ti-15Ta-5Zr, printr-o metodă chimică adaptată compoziției aliajului și filmului pasiv existent pe suprafața sa, caracterizată prin aceea că depunerea are loc din soluție fiziologică Ringer cu <i>pH</i> neutru și include următoarele etape:	3
- pregătirea substratului metalic prin șlefuire, degresare în acetonă și apoi în apă ultrapură într-o baie ultrasonică, uscare în aer;	5
- imersarea aliajului în soluția de depunere care este într-o cantitate de 10 ml/cm ² ;	7
- depunerea proteinei biomimetice la o temperatură de 37°C, timp de 6 zile;	9
- spălarea produsului obținut cu apă ultrapură și uscarea acestuia în aer.	11

(51) Int.Cl.
A61L 27/06 (2006.01),
A61L 27/30 (2006.01)

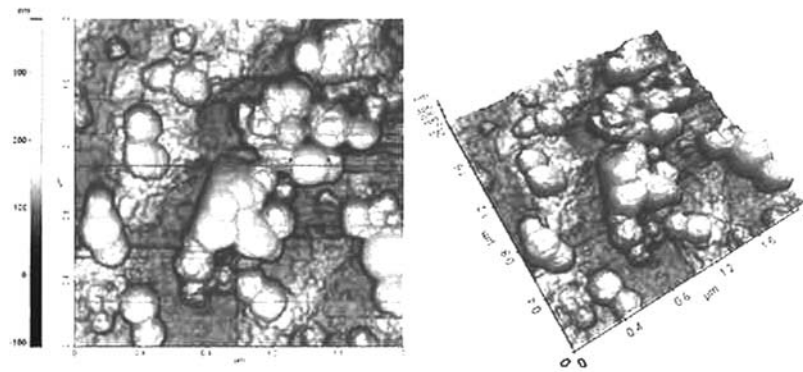


Fig. 1

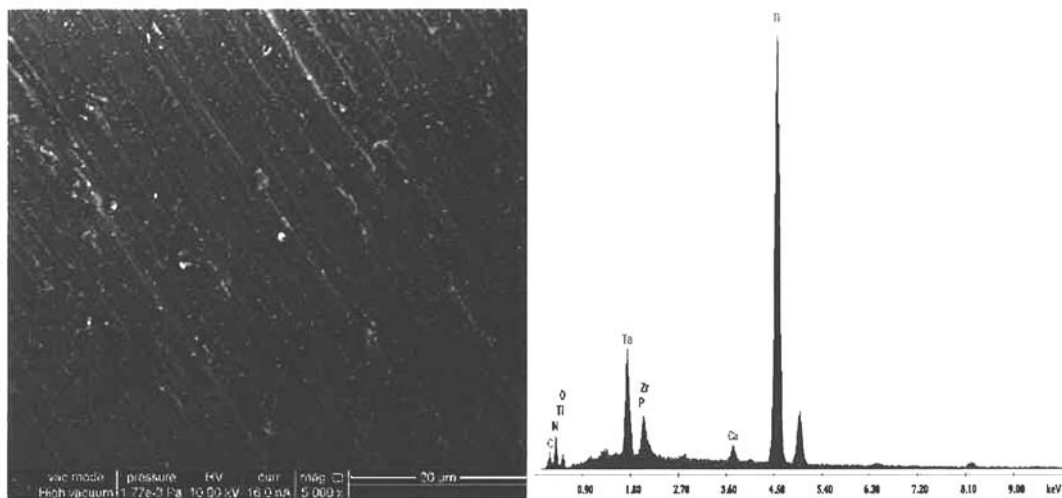


Fig. 2

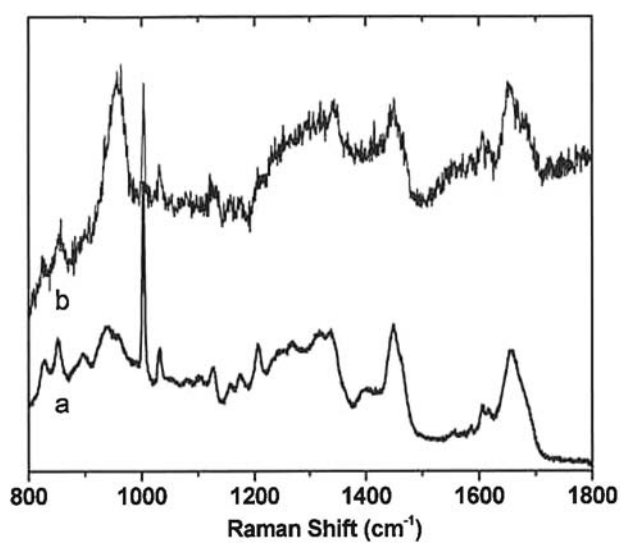


Fig. 3

