



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2009 00661

(22) Data de depozit: 28.08.2009

(41) Data publicării cererii:
28.02.2011 BOPI nr. 2/2011

(71) Solicitant:
• INSTITUTUL DE CHIMIE
MACROMOLECULARĂ "PETRU PONI",
ACADEMIA ROMÂNĂ,
ALEEA GR. GHICA VODĂ, 41/A, IAȘI, IS,
RO

(72) Inventatori:
• CHIRIAC AURICA,
STR. ALEXANDRU VLAHUTĂ, NR. 7B,
AP. 16, IAȘI, IS, RO;
• NIȚĂ LOREDANA ELENA, BD. COPOSU,
NR. 42, BL. A3, SC. B, PARTER, AP. 3, IAȘI,
IS, RO;
• NEAMȚU IORDANA,
STR. THEODOR PALLADY, NR. 8, SC. B,
ET. III, AP. 9, IAȘI, IS, RO

(54) PROCEDEU DE SINTEZĂ A UNUI COMPOZIT MAGNETIC

(57) Rezumat:

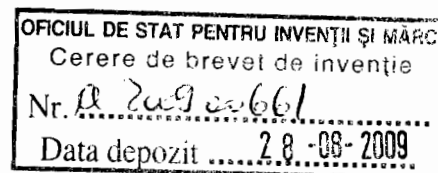
Invenția se referă la un procedeu de obținere a unui compozit magnetic, utilizat în aplicații biomedicale analitice sau clinice. Procedeu conform invenției constă din copolimerizarea poli (succinimidei) și poli(elilenglicolului) având o greutate moleculară de 4000, 10000 sau 20000, în raport gravimetric de 2:1, în dimetilformamidă 6,5 moli% față de polimer, în prezență de ferită în proporție de 3,73% față de cantitatea totală de polimer, sub formă de ferofluid stabilizat cu concentrația de 3,205%, cu agitare continuă la 140°C, sub atmosferă

de azot, în prezența a 1,5% față de cantitatea totală de polimer soluție apoasă de catalizator $Mn(CH_3-COO)_2 \cdot 4H_2O$, adăugat în picătură timp de 60 min, reacția continuând timp de 6 h la 140°C cu eliminarea apei, după care mediul de reacție se răcește și copolimerul rezultat este precipitat din metanol, spălat și uscat, pentru a rezulta un produs cu caracter combinat, hidrofil și hidrofob, cu ferită încapsulată.

Revendicări: 1



24



PROCEDEU DE SINTEZĂ A UNUI COMPOZIT MAGNETIC

Invenția se referă la un procedeu de sinteză a unui compozit magnetic sub formă de microparticule de copolimer dibloc cu caracteristici combinate de hidrofilie și hidrofobie cu ferită încapsulată în matricea polimerică, aplicabil ca instrument terapeutic în detoxifierea sângelui uman sau ca purtător magnetic de substanțe bioactive pentru transportul la țintă și eliberarea controlată a medicamentelor.

În literatura de specialitate se prezintă microparticule polimerice cu caracteristici magnetice cu aplicații atât tehnice (separare, transportul fluidelor, tonere) cât și biomedicale analitice sau clinice, ca : detoxifierea sângelui uman prin îndepărtarea selectivă și rapidă a contaminanților biologici sau chimici, purificarea acizilor nucleici și a proteinelor, separarea celulară, extracția ADN-ului, imobilizarea enzimatică, transportul la o țintă specifică al medicamentelor, sau ca sondă magnetică cu capacitatea de creștere a semnalului sau a contrastului în imagistica de rezonanță magnetică.

Astfel de particule pot fi funcționalizate în scopul de a interacționa cu entitatea biologică de interes. Datorită caracteristicilor magnetice, pot fi manipulate de către un câmp magnetic exterior așa cum se practică în hipotermie, separarea magnetică celulară, transportul țintit al principiilor bioactive (medicamente). Aplicațiile biomedicale necesită biocompatibilitate, biodegradabilitate, absența reacțiilor imunitare și a toxicității. De asemenea, sunt necesare hidrofilia suprafeței și dimensiuni relativ reduse în așa fel încât să poată evada din țesutul reticuloendotelial.

S-au dezvoltat metode de preparare multifazice a particulelor polimerice cu caracteristici magnetice prin tehnica de depunere strat cu strat sau prin procese de polimerizare în fază eterogenă (emulsie, suspensie, dispersie, micro- și miniemulsie). Materialul compozit rezultat prezintă una dintre structuri: (1) material magnetic ca miez încapsulat în coaja polimerică, (2) material magnetic dispersat în matricea polimerică după polimerizare și (3) material magnetic coajă adsorbit în porii polimerului pre-format ca miez.

Acizii poli(aminici) de tipul poli(acidului aspartic) și copolimerii lor au fost intens studiați ca purtători polimerici pentru substanțele bioactive în cadrul sistemelor de eliberare controlată

a medicamentelor. Polimerii pe bază de acizi aminici ca poli(acidul aspartic) aduc avantajul unei polipeptide ce conferă legare specifică cu țesuturile și prezența a două grupe funcționale (amino- și hidroxil-) pentru funcționalizarea cu receptori specifici cum ar fi chelatorii radionucleari sau anticorpii mononucleari.

În particular, poli(succinimida) ca produs intermediar în sinteza poli(acidului aspartic) din acid D,L-aspartic, datorită biocompatibilității, biodegradabilității și lipsei de toxicitate, este unul dintre cei mai promițători purtători macromoleculari de medicamente deoarece ea posedă caracteristici structurale și fizico-chimice corespunzătoare scopului menționat. Combinarea în aceeași macromoleculă a caracteristicilor de hidrofilie ale poli(etilenglicolului) și hidrofobie datorată poli(succinimidei) este importantă datorită potențialelor aplicații biologice și farmaceutice care necesită solubilizare în mediu apos și capacitatea de a crea situs-uri pentru funcționalizare de-a lungul macromoleculei. Prezența componentei magnetice oferă sensibilitatea în prezența unui câmp magnetic exterior.

Brevetul U.S. Pat. 4.582.622 (1986) prezintă prepararea de particule magnetice din gelatină, polizaharidă solubilă în apă, fosfat de sodiu și substanțe magnetice. Brevetele U.S. Pat. 4.628.037 (1986) și 4.554.088 (1985) descriu microparticule cu miez de oxid metalic magnetic încapsulat în coajă de polimer siloxanic. În brevetul U.S. Pat. 4.452.773 (1984) particulele de dimensiuni coloidale cu miez feromagnetic sunt acoperite cu o polizaharidă solubilă în apă sau cu un derivat al acesteia cu grupe funcționale. Brevetul U.S. Pat. 4.695.392 (1987) descrie particule responsive magnetic cu miez de ferită înconjurat de o coajă siloxanică, la care pot fi cuplate o mare varietate de molecule organice și/sau biologice.

În brevetele U.S. Pat. 4.554.088 (1985) și 4.628.037 (1986) un miez de oxid metalic superparamagnetic este înconjurat de un polimer siloxanic; microparticulele magnetice sintetizate au suprafață superficială mare și sunt aplicate în teste de imunitate și purificări. Datorită dimensiunilor reduse se îndepărtează dificil din suspensia de celule și deseori este excesivă legarea nespecifică la celulele normale.

Folosirea microparticulelor polimerice magnetice ca fază solidă în diverse tipuri de teste a fost prezentată în brevetele : U.S. Pat. 4.152.210 (1979) și 4.343.901 (1982) pentru imobilizare de enzime; U.S. Pat. 3.970.518 (1976), 4.230.685 (1980) și 4.672.040 (1987) pentru separări de celule și U.S. Pat. 4.554.088 (1985), 4.628.037 (1986), 3.933.997 (1976) pentru teste de imunitate.

Se mai descrie în brevetul US Pat 4.339.337 (1982) prepararea de microparticule polimerice magnetice prin dispersarea particulelor magnetice în soluția unui polimer dizolvat într-un compus aromatic vinilic polimerizabil și polimerizarea ulterioară a amestecului. În brevetul

US Pat 4.358.388 (1982) nanoparticulele magnetice sunt dispersate într-o fază organică ce conține dizolvat inițiatorul și un monomer aromatic vinilic. Faza organică este ulterior emulsionată și polimerizată pentru a rezulta un latex.

Microsfere magnetice pe bază de glutaraldehidă se sintetizează prin polimerizarea acesteia în prezență de nanoparticule magnetice (US Pat 4.267.234 - 1981 și 4.267.235 - 1981) și pe bază de poli(acroleină) prin polimerizarea *in-situ* a acroleinei (US Pat 4.438.239 - 1984).

Sinteza de particule compozite de oxid metalic încapsulat în polimer vinilic este prezentată în brevetul U.S. Pat. 5.834.121, 1998. În brevetul U.S. Pat. 6.204.033 din 2001 se prezintă sinteza de particule magnetice încapsulate în poli(vinil alcool), cu capacitatea de funcționalizare la grupele hidroxilice pentru a se cupla cu biomolecule.

În brevetul US Pat 7.547.473 din 2005, se prepară microparticule cu caracter magnetic prin depunerea unei polizaharide carboxilate cu funcționalități diferite ca: agenți chelatori sau schimbători de ioni, pe suprafața nanoparticulelor magnetice. Microparticulele pot fi aplicate pentru adsorbția de cationi metalici, diferite specii anionice, molecule de medicament sau biomolecule, acționând ca adsorberi pentru apele uzate sau separarea biochimică, purtător cu funcție de țintire a medicamentelor sau genelor, agent de contrast pentru imagistica de rezonanță magnetică.

Particulele magnetice sunt folosite ca reactivi pentru purificarea și extracția acizilor nucleici. Brevetele U.S. Pat. 5.750.338 din 1998 și 5.898.071 din 1999 utilizează particule magnetice încapsulate în polimer siloxanic în prezență de poli(etilenglicol) pentru captarea, extracția și eliberarea țintită a unui acid nucleic în detecția secvențelor specifice din ADN. De asemenea, brevetul U.S. Pat. 6.027.945 din 2000 descrie aplicarea de particule polimerice siloxanice cu caracter magnetic și diametru de 4 - 7 micrometri pentru extracția și purificarea acizilor nucleici. Procesele și produsele descrise în brevetele menționate au un lucru în comun, și anume particulele magnetice sunt preparate prin precipitarea unei soluții de săruri cu un anumit raport molar al Fe(II) și Fe(III) în prezența agenților de complexare, sau în timpul sintezei acoperirilor polimerice. Acest proces determină un dezavantaj comun: microparticulele rezultate din polimeri cu nanoparticule magnetice încapsulate au o distribuție largă de dimensiuni în domeniul 100 Å - 100 μ și o structură geometrică de tip amorf, ovoidală, nu sferică. Dimensiunile mici favorizează legarea nespecifică la celulele normale sau la pereții containerului de stocare. De asemenea conținutul de oxid magnetic variază.

Problema pe care o rezolvă invenția este realizarea unui compozit magnetic sub formă de microparticule de copolimer dibloc cu caracteristici combinate de hidrofilie și hidrofobie și

ferită încapsulată în matricea polimerică în timpul sintezei, prin copolicondensarea în mediu de solvent organic a poli(succinimidei) și a poli(etilenglicolului), cu aplicații biomedicale.

Procedeul de sinteză a compozitului magnetic conform invenției, înlătură dezavantajele menționate prin aceea că se copolicondensează în atmosferă de azot și în mediu organic de dimetilformamidă, la temperatura de 140 ° C, timp de 7 ore, un amestec de poli(succinimidă) și poli(etilenglicol) cu greutate moleculară de : 4000, 10000 sau 20000, în raport gravimetric de 2 : 1, în prezență de ferită sub formă de ferrofluid stabilizat (cu concentrația de 3,205 %), în proporție de 3,73 % ferită față de cantitatea totală a celor doi polimeri și de catalizator $Mn(CH_3COO)_2 \cdot 4H_2O$ în proporție de 1,5 % față de cantitatea totală a celor doi polimeri.

Procedeul conform invenției prezintă următoarele avantaje :

- Este un procedeu ecologic, fără emanații toxice, simplu de aplicat și sigur în exploatare, cu un număr redus de faze tehnologice.
- Copolimerul dibloc sintetizat prezintă grupe funcționale care îi permit solubilizarea în apă cât și funcționalizarea cu o mare varietate de grupe funcționale în scopul cuplării covalente sau a conjugării cu substanțe bioactive.
- Se realizează un control bun al dimensiunii microparticulelor și domeniul de distribuție îngust al acestora.
- Conținutul de oxid metalic poate fi variat conform aplicației.
- Stabilitate de stocare cât și operațională în circuitul sanguin.

Se dă în continuare un exemplu de realizare a invenției.

EXEMPLU

Intr-o instalație de laborator în sine cunoscută, compusă dintr-un vas de reacție de 50 ml cu fund rotund și patru găuri, echipat cu agitator, trapă Dean-Stark cu condensator de reflux, termometru, racord la azot și baie de ulei pentru încălzire, se alimentează sub agitare puternică poli(succinimida) (PSI) (4g, corespunzător 0,040 moli unități succinimidă), poli(etilenglicolul) (PEG) (2g, corespunzător 0,032 moli unități etilenglicol) cu greutatea moleculară de 4000, 10.000 sau 20.000, solvite în 30 ml dimetilformamidă (0,39 moli, corespunzător 6,5 moli % față de polimer) și ferita sub formă de ferrofluid stabilizat cu concentrația de 3,205 % (6g, corespunzător 3,73 % față de polimer). Se încălzește sistemul la 140°C menținând sub agitare și barbotând un curent de azot. Când temperatura de reacție atinge valoarea de 140°C, se adaugă prin picurare timp de 60 minute, cantitatea de 0,09 g $Mn(CH_3COO)_2 \cdot 4H_2O$ (0,367 mmoli, 1,5 % față de polimer) catalizator dizolvat în 5 ml apă.

Se continuă reacția pentru încă 6 ore. În acest timp se aplică un vid slab pentru a elimina aproximativ 10 ml apă. Se răcește mediul de reacție menținând agitarea. Dispersia rezultată de copolimer dibloc cu ferită încapsulată prin sinteză, se filtrează și se spală de câteva ori cu metanol în exces, pentru a îndepărta reactanții nereacționați. Se usucă la 45 °C sub presiune redusă. Spectroscopic nu se detectează poli(succinimidă) reziduală.

Deoarece copolimerul dibloc cu ferită încapsulată sintetizat este hidrofil, impuritățile cu moleculă mică (catalizator, solvent) pot fi îndepărtate prin dializa amestecului de reacție pentru 2 săptămâni, conducând la o puritate finală de peste 98%. Apa se îndepărtează prin uscare la vid, spălare cu metanol și uscare.

Copolimerul dibloc poli(succinimidă)-b-poli(etilenglicol) cu ferită încapsulată sintetizat ca instrument terapeutic în detoxifierea sângelui uman sau ca purtător magnetic de substanțe bioactive pentru transportul la țintă și eliberarea controlată a medicamentelor, a fost caracterizat din punct de vedere al compoziției chimice, dimensiunii particulelor, stabilității termice și magnetizării. În tabelul 1 sunt prezentate datele rezultate prin spectroscopia în infraroșu apropiat cu analiză chimică NIR-CI și distribuția dimensiunilor prin difuzia luminii laser, iar în tabelul 2 sunt înregistrate temperaturile caracteristice procesului de descompunere termică, pierderile în greutate corespunzătoare temperaturii maxime de descompunere și susceptibilitatea magnetică determinată pentru o anumită intensitate a câmpului magnetic.

Tabelul 1

*Analiza NIR-CI și distribuția dimensiunii microparticulelor
de co(PSI-b-PEG) cu ferită încapsulată*

Proba	Predicția de compoziție prin analiza spectroscopică NIR-CI Copolimer / ferită	Distribuția dimensiunii particulelor Diametru microparticule, μ		
		Dv10 ¹⁾	Dv50 ²⁾	Dv90 ³⁾
4000	0,33 / 0,67	1,269	5,883	17,154
10000	0,50 / 0,50	1,717	11,311	20,503
20000	0,59 / 0,41	1,929	7,418	18,851

1) Dv10 – valoarea diametrului pentru care 10% din volumul probei are particule cu diametrul mai mic decât această valoare

2) Dv50 - valoarea diametrului pentru care 50% din volumul probei are particule cu diametrul mai mare de această valoare și 50% din volumul probei are particule cu diametrul mai mic de această valoare.

3) Dv90 - valoarea diametrului pentru care 10% din volumul probei are particule cu diametrul mai mic decât această valoare.

Tabelul 2

*Analiza termogravimetrică și magnetizarea microparticulelor
de co(PSI-b-PEG) cu ferită încapsulată*

Proba	Analiza termogravimetrică ^{x)}				Magnetizarea	
	T _i , °C	T _{max} , °C	T _f , °C	ΔW, %	Susceptibilitate magnetică, uem/g	Intensitatea câmpului magnetic, Oe
4000	75	100 360	600	10 20	20,3	19048
10000	75	100 350	600	10 18	8,8	19042
20000	90	120 340	600	22 30	4,6	19032

T_i (°C) - temperatura de început a descompunerii
T_{max} (°C) - temperatura descompunerii maxime
T_f (°C) - temperatura finală a descompunerii
ΔW - Pierdere în greutate pe intervalul T_i (°C) - T_{max} (°C)
x) - copolimerul dibloc cu ferită încapsulată prezintă două peak-uri de descompunere, reprezentate de cele două valori pentru Tmax și ΔW

Rezultatele indică faptul că microparticulele au o distribuție îngustă de dimensiuni cuprinsă în domeniul 1 – 20 micrometri. Măsurătorile magnetice relevă o scădere a magnetizării la saturare de la 20,3 la 4,6 uem/g cu creșterea greutății moleculare a poli(etilenglicolului) de la 4.000 la 20.000.

REVENDICARE

Procedeu de sinteză a unui compozit magnetic sub formă de microparticule de copolimer dibloc cu caracteristici combinate de hidrofilie și hidrofobie și ferită încapsulată în matricea polimerică în timpul sintezei, *caracterizat prin aceea că* se copolicondensează în atmosferă de azot și în mediu organic de dimetilformamidă 6,5 moli % față de polimer, în prezență de ferită în proporție de 3,73 % față de cantitatea totală de polimer, adăugată sub formă de ferrofluid stabilizat cu concentrația de 3,205 %, poli(succinimida) și poli(etilenglicolul) cu greutate moleculară de : 4000, 10000 sau 20000, în raport gravimetric de 2 : 1, la 140°C, sub agitare continuă și barbotare de azot, în prezență de catalizator $Mn(CH_3 COO)_2 \cdot 4 H_2 O$ în soluție apoasă, în proporție de 1,5 % față de cantitatea totală de polimer, adăugat cu picătura timp de 60 minute și continuarea reacției timp de 6 ore la aceeași temperatură, cu eliminarea unei cantități de 10 ml apă, răcire, spălare cu metanol , uscare la 45 °C și presiune redusă.