



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2010 01112

(22) Data de depozit: 15.11.2010

(41) Data publicării cererii:
30.07.2013 BOPI nr. 7/2013

(71) Solicitant:
• INSTITUTUL NAȚIONAL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU
METALE NEFEROASE ȘI RARE - IMNR,
BD.BIRUIŢEI NR.102, COMUNA
PANTELIMON, IF, RO

(72) Inventatori:
• PITICESCU ROXANA MIOARA,
ȘOS. NICOLAE TITULESCU NR. 155,
BL. 21, SC. C, ET. 2, AP. 90, SECTOR 1,
BUCUREȘTI, B, RO;

• POPESCU LAURA MĂDĂLINA,
STR. DELINEȘTI NR.4, BL.TD 45, AP.14,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
• BURUIANĂ TINCA, BD.INDEPENDENȚEI
NR.11, BL.A1-4, SC.C, AP.11, IAȘI, IS, RO;
• VASILE EUGENIU, STR. NADA FLORILOR
NR.2, BL.2, SC.2, ET.7, AP.74, SECTOR 2,
BUCUREȘTI, B, RO

(54) PULBERI HIBRIDE NANOSTRUCTURATE PENTRU
APLICAȚII MEDICALE

(57) Rezumat:

Invenția se referă la o compoziție de pulberi hibride nanostructurate, pentru aplicații medicale în terapia și diagnosticul sistemului osos. Compoziția conform invenției este constituită din hidroxiapatită și poliuretan funcționalizat cu grupări finale de tiol, în raport în greutate de 4...1:1...4, în care hidroxiapatita prezintă

morfologie sub formă de fibre subțiri, cu o lățime de 5...10 nm și lungime de maximum 50 nm.

Revendicări: 4
Figuri: 4



Pulberi hibride nanostructurate pentru aplicații medicale

Descrierea invenției

Invenția se referă la pulberi hibride nanostructurate destinate unor aplicații în terapia și diagnoza sistemului osos.

Ingineria țesuturilor, disciplină emergentă care aplică principiile ingineriei pentru a realiza dispozitive capabile să înlocuiască funcțiile pierdute sau compromise ale țesutului, se bazează pe controlul interacțiunii dintre materiale, celule și factorii de creștere astfel încât să se creeze mediul propice regenerării funcțiilor țesutului și organelor [1].

Primele materiale utilizate în ingineria țesuturilor au fost proiectate astfel încât să suporte o sarcină mecanică minimă și să regleze difuzia nutrienților și produșilor reziduali între noul țesut și țesutul gazdă înconjurător. Biomaterialele clasice (metale, ceramice și compozite polimerice) au fost utilizate cu succes pentru a înlocui funcția mecanică a țesuturilor cum ar fi: dinți, șold, genunchi, valvele inimii și discuri intervertebrale. Aplicațiile biomaterialelor clasice în domeniul ingineriei țesuturilor au fost însă limitate de capacitatea lor redusă de a modula repararea și regenerarea țesutului gazdă. Astfel, s-au dezvoltat noi materiale sau au fost modificate cele existente.

Specialiștii în ingineria țesuturilor au acordat atenție nu numai proprietăților chimice ale materialelor dar și aspectelor structurale care influențează profund funcția celulei, moartea și formarea țesutului [1]. În consecință, s-au dezvoltat noi procese de fabricare care să permită elaborarea structurilor 3D, micro și nanostructurilor în care structura porilor, raportul volum-suprafață, textura și topografia suprafeței sunt manipulate pentru a controla forma, alinierea și organizarea celulei [1].

Materialele care îmbunătățesc regenerarea osului au o gamă largă de aplicații clinice de la tratamentul fracturilor nesudate până la fracturi sau dislocări ale coloanei. Capacitatea regenerativă ridicată a osului, în particular pentru persoanele tinere, presupune în general vindecarea rapidă a fracturilor fără a fi nevoie de intervenție majoră. Totuși, defectele osoase mari, așa cum se observă după rejecția tumorilor și fracturilor severe, necesită intervenții chirurgicale. Sunt cunoscute și aplicate o serie de procedee cum ar fi: transplantul osului autolog (de exemplu osul de la un pacient) care din punct de vedere clinic are cele mai bune rezultate deoarece se integrează cu osul gazdă și elimină complicațiile legate de imunitate și boală care pot apare prin

utilizarea osului alogenit (de la un cadavru uman) sau osului xenogenit (osul de la un animal) [2]. Procedul „osului autolog transplantat” este limitat sever de sursele disponibile de os. De aceea s-a impus în ultimii ani definirea unor noi strategii pentru regenerarea noului os. Pe baza necesităților clinice nu este deloc surprinzătoare creșterea cu viteză mare a pieței pentru tratamentele pe bază de biomateriale aplicate în ortopedie și nu numai. Dacă în trecut materialele utilizate în implantologie trebuiau să fie bioinerte, astăzi se proiectează materiale bioactive care să interacționeze cu moleculele biologice sau celulele și să permită regenerarea țesuturilor. În cazul osului, materialele trebuie să prezinte următoarele caracteristici:

- Să fie osteoinductive (capabile să promoveze diferențierea celulelor precursorare în linie de osteoblaste)
- Să fie osteoconductive (sprijină creșterea osului și proliferarea în țesutul osos înconjurător)
- Să fie capabile de oseointegrare (să se integreze în țesutul osos înconjurător)

În ultimele două decenii au fost studiate și evaluate o serie de materiale pentru substituirea osului autolog sau alogenit (ceramică bioactivă, sticle bioactive, polimeri sintetici sau naturali, compozite polimerice).

Combinăția sinergică a biomaterialelor cu terapia celulară reprezintă un subiect de mare interes pentru comunitatea științifică [2].

Materialelor tradiționale utilizate în ingineria țesutului demonstrează capacitatea acestora de a regla formarea țesutului, dar în general sunt formate dintr-un amestec de structuri chimice cu un indice de polidispersitate ridicat și un răspuns limitat la semnalele mediului înconjurător. Toate aceste limitări au motivat exploatarea diferitelor clase de polimeri și dezvoltarea „materialelor proiectate” cu proprietăți fizice, chimice și biologice bine definite. Câteva exemple în acest sens sunt prezentate în continuare. Au fost sintetizate prin procedee sol-gel sau prin polimerizarea în prezența fazei anorganice a precursorului copolimeric, o serie de compozite cum ar fi:

- compozite polimerice pentru aplicații medicale pe bază de poliuretan și zeoliți conținând ioni de argint [3],
- compozite pe bază de particule osoase și poliuretani [4]
- compozite pe bază de fosfat de calciu și un polimer termoplastice [5]
- compozite pe bază de rășini epoxi și diferite materiale de ranforsare (nanoparticule de TiO₂, ZnO, SiC, Y₂O₃, C, nanotuburi de C) [6]

- compozite pe bază de hidroxil-apatită și collagen [7]
- nanocompozite pe bază de poliuretan și ZnO [8].

Spre deosebire de materialele tradiționale (care se află în stadiul încercărilor clinice sau produselor comerciale), aceste noi materiale sunt în stadiul testării in vitro sau testelor preliminare in vivo pe animale [1].

Brevetul se referă la un nou material cu proprietăți chimice și fizice bine definite, un compozit nanostructurat pe bază de hidroxiapatită și poliuretan cu grupări tiol finale pentru aplicații în terapia și diagnoza sistemului osos.

Selectarea componentelor acestui nou material hibrid nanostructurat a avut în vedere tendințele actuale din domeniul biomaterialelor care vizează ingineria țesuturilor, sisteme celulare sofisticate, aplicații în biotehnologie și care presupun interacții specifice și directe între biomaterial și componentele țesutului [9].

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția se referă la furnizarea unor materiale hibride nanostructurate pe bază de hidroxiapatită și poliuretani duri funcționalizați care prezintă structură chimică omogenă, indice de polidispersitate scăzut și stabilitate ridicată față de mediul biologic într-un interval de timp clinic favorabil formării noului țesut.

Conform invenției pulberile hibride nanostructurate prezintă dimensiuni de particule anorganice de hidroxiapatită (HAP) sub formă de fibre subțiri (whiskers) de maxim 50 nm lungime și 5-10 nm lățime (figura 1a și b). Pentru comparație în figura 2 se prezintă imaginea prin microscopie electronică de transmisie pentru poliuretanul funcționalizat cu grupe finale tiol (polimer PU-SH) după tratamentul hidrotermal în aceleași condiții cu pulberea hibridă nanostructurată.

Conform invenției noul material hibrid nanostructurat prezintă stabilitate termică ridicată comparativ cu poliuretanul funcționalizat cu grupe finale tiol (polimer PU-SH), aspect evidențiat prin analiză calorimetrică diferențială de baleiaj (DSC) (figura 3a și figura 3b).

Conform invenției pulberea hibridă nanostructurată prezintă interacțiuni intermoleculare puternice între cele două componente aspect evidențiat prin analiză structurală în infra-roșu cu transformată Fourier (figura 4). Figura 4 evidențiază următoarele aspecte:

- vibrația de întindere de la 1750 cm^{-1} caracteristică grupării C=O libere din poliuretanul funcționalizat cu grupări finale tiol nu mai apare probabil datorită

împiedicării sterice prin formarea unor interacțiuni intermoleculare puternice între componenta organică și anorganică.

- vibrația de întindere de la 2600 cm^{-1} caracteristică grupării S-H libere din poliuretanul funcționalizat cu grupări finale tiol, o bandă de intensitate slabă, nu mai apare probabil datorită participării la formarea unor legături de hidrogen între lanțurile polimerice ca urmare a tratamentului hidrotermal ceea ce ar justifica contracția polimerului sub influența presiunii;
- în regiunea $962\text{-}1098\text{ cm}^{-1}$ se observă cele trei vibrații de întindere caracteristice grupării PO_4^{3-} din hidroxiapatită.

Conform invenției filmele subțiri obținute prin depunerea pe suport de sticlă a pulberii hibride nanostructurate pe bază de poliuretan funcționalizat cu grupe finale tiol și hidroxiapatită au demonstrat stabilitate susținută de valori ale viabilității de 100% similar cu controlul. Celulele au aderat uniform pe suprafața probei. Filamentele de actină sunt bine evidențiate comparabil cu cele din celulele control. Corpul celular este bine evidențiat și colorația pentru actină este pozitivă în extremitățile celulare, ceea ce justifică utilizarea acestor materiale pentru aplicații medicale.

Pentru realizarea pulberilor conform invenției se pot utiliza poliuretani funcționalizați cu grupe finale tiol cu diferite concentrații molare de grupe SH. Procesul de sinteză a pulberilor hibride nanostructurate are loc în condiții hidrotermale la temperaturi cuprinse între $25 - 100^\circ\text{C}$ (de preferință $80 - 100^\circ\text{C}$) și presiuni în intervalul $20\text{-}100\text{ atm}$ (de preferință $80\text{-}100\text{ atm}$). Sub influența presiunii între componenta anorganică și organică se realizează interacțiuni intermoleculare puternice ceea ce asigură o stabilitate ridicată a acestui nou material hibrid la contactul cu fluidul biologic într-un interval de timp clinic favorabil formării noului țesut osos.

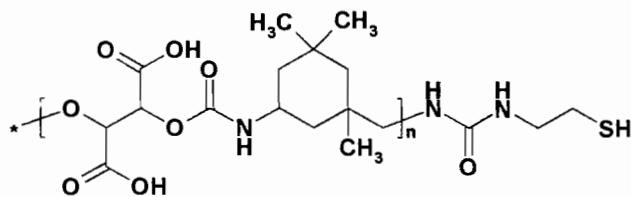
Procedeu hidrotermal prezintă o serie de avantaje: reactanții care în condiții normale sunt dificil de dizolvați, în condiții hidrotermale trec în soluție sub influența mineralizatorilor sau solvenților (reacții de transport chimic). În condiții hidrotermale solvenții prezintă putere de solvatare ridicată, compresibilitate înaltă, capacitate crescută de transport de masă ceea ce permite sinteza unor noi faze sau stabilizarea unor noi complecși. După cum se știe, apa, din punct de vedere al impactului asupra mediului, este cel mai sigur material și cel mai ieftin dintre toți solvenții. Poate acționa ca un mineralizator sau ca un catalizator în condiții de temperatură și presiune înaltă. Proprietățile termodinamice și de transport ale apei în

condiții supercritice sunt net diferite de cele ale apei în condiții normale de temperatură și presiune. Datorită scăderii vîscozității solventului, mobilitatea moleculară crește, iar ca urmare a scăderii constantei dielectrice și densității solventului se modifică hidratarea ionică. Ca urmare, din punct de vedere energetic procedeul hidrotermal se desfășoară cu minimum de consum energetic [10].

Se prezintă în continuare două exemple de realizare a invenției fără ca acestea să limiteze utilizarea acestui procedeu în domeniul tehnic propus.

Exemplul 1

Structura poliuretanului funcționalizat cu grupări finale tiol (PU-SH):



Structura poliuretanului cu grupări finale tiol PU-SH

În tabelul 1 sunt prezentate caracteristicile poliuretanului funcționalizat cu grupări finale tiol.

Tabelul 1.

Cod	Compoziție	Morfologie de suprafață a PU-SH
PU-SH	S 1.94 % SH 20 mol%	Suprafața omogenă cu rugozitate de 0.3 μm, formată din sferulite granulare de dimensiuni nanometrice înălțimea maximă a formațiunilor nedepășind 3 nm

Pentru a obține 5 g de material hibrid nanostructurat în care raportul greutate HAP:PU-SH =4:1 s-au cântărit cu exactitate 9,38 g de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ și 2,74 g de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ care s-au dizolvat în 100 ml apă deionizată. S-a adăugat un volum bine determinat de amoniac soluție 25% astfel încât pH-ul soluției să ajungă la 10 și să aibă loc precipitarea HAP amorf. Precipitatul amorf pe bază de HAP s-a filtrat și s-a spălat într-o singură treaptă cu apă deionizată pentru îndepărtarea urmelor de ioni amoniu. După spălare precipitatul amorf se repulpează în apă deionizată. Polimerul (1g) s-a dizolvat în 35 ml DMAA (dimetilacetamidă) și s-a adăugat peste precipitatul repulpat în apă deionizată. Suspensia astfel obținută s-a introdus în autoclavă pentru tratament în condiții hidrotermale (presiunea=80-100 atm; temperatura 80-100°C, timp=2 ore). După tratamentul hidrotermal soluția a fost liofilizată pentru

îndepărtarea solventului (apă și DMAA). S-a obținut o pulbere fină, de culoare albă cu compoziție, microstructură și morfologie specifică.

Exemplul 2

Pentru a obține 5 g de material hibrid nanostructurat în care raportul greutate HAP:PU-SH =1:4 s-au cântărit cu exactitate 2,35 g de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ și 0,686 g de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ care s-au dizolvat în 50 ml apă deionizată. S-a adăugat un volum bine determinat de amoniac soluție 25% astfel încât pH-ul soluției să ajungă la 10 și să aibă loc precipitarea HAP amorf. Precipitatul amorf pe bază de HAP s-a filtrat și s-a spălat într-o singură treaptă cu apă deionizată pentru îndepărtarea urmelor de ioni amoniu. După spălare precipitatul amorf se repulpează în apă deionizată. Polimerul (4g) s-a dizolvat în 35 ml DMAA (dimetilacetamidă) și s-a adăugat peste precipitatul repulpat în apă deionizată. Suspensia astfel obținută s-a introdus în autoclavă pentru tratament în condiții hidrotermale (presiunea=80-100 atm; temperatura 80-100°C. timp=2 ore). După tratamentul hidrotermal soluția a fost liofilizată pentru îndepărtarea solventului (apă și DMAA). S-a obținut o pulbere fină, de culoare albă care a fost caracterizată din punct de vedere compozițional, microstructural și morfologic.

Revendicări

1. Pulberi hibride nanostructurate caracterizate prin aceea că sunt constituite din hidroxiapatită și poliuretan funcționalizat cu grupări finale tiol în raport de greutate 4:1, în care faza anorganică - hidroxiapatită (HAP) prezintă morfologie sub formă de fibre subțiri (whiskers) cu o lățime de 5-10 nm și lungime de maxim 50 nm.
2. Pulberi hibride nanostructurate caracterizate prin aceea că sunt constituite din hidroxiapatită și poliuretan funcționalizat cu grupări finale tiol în raport de greutate 1:4, în care faza anorganică - hidroxiapatită (HAP) prezintă morfologie sub formă de fibre subțiri (whiskers) cu o lățime de 5-10 nm și lungime de maxim 50 nm.
3. Pulberi hibride nanostructurate în conformitate cu revendicarea 1 caracterizate prin aceea că tranziția fazei sticloase (T_g) a poliuretanului funcționalizat cu grupe finale tiol (polimerPU-SH) crește în prezența componentei anorganice.
4. Pulberi hibride nanostructurate în conformitate cu revendicarea 2 și 3 caracterizate prin aceea că faza anorganică este formată din fibre subțiri (whiskers) cu cel puțin o dimensiune ≤ 50 nm

Figuri

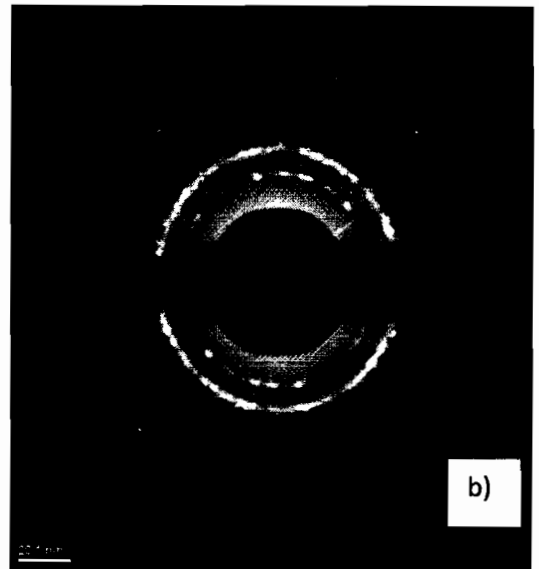


Figura 1. a) Imagine de microscopie electronică prin transmisie (TEM) a pulberii hibride obținute hidrotermal (raport greutate HAP:PU-SH=4:1).

b) Difractie de electroni-imagine de microscopie electronica prin transmisie ce pune in evidenta caracteristica dimensionala nanocristalina a baghetelor de hidroxiapatita obținute



Figura 2. Imagine de microscopie electronică prin transmisie (TEM) a polimerului PU-SH tratat hidrotermal.

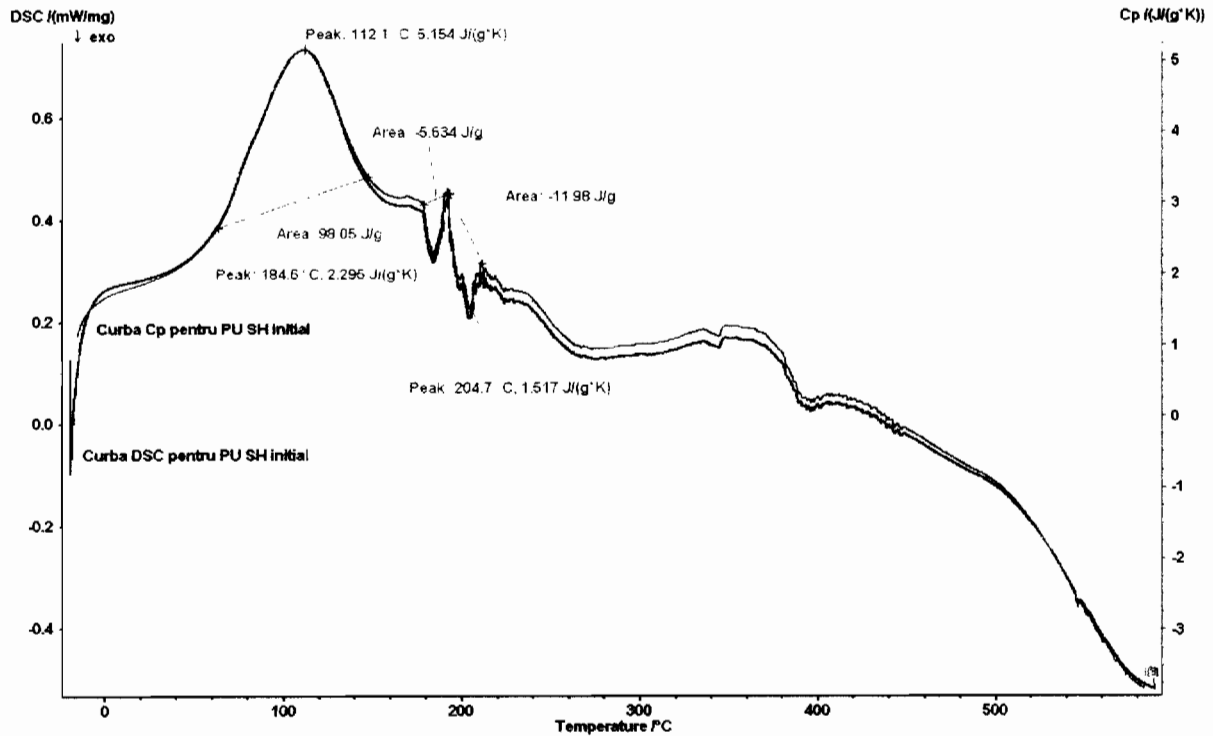


Figura 3a. Analiza calorimetrică diferențială de baleiaj (DSC) ce pune în evidență transformările structurale ale poliuretanului funcționalizat cu grupări finale tiol inițial (polimer PU-SH inițial)

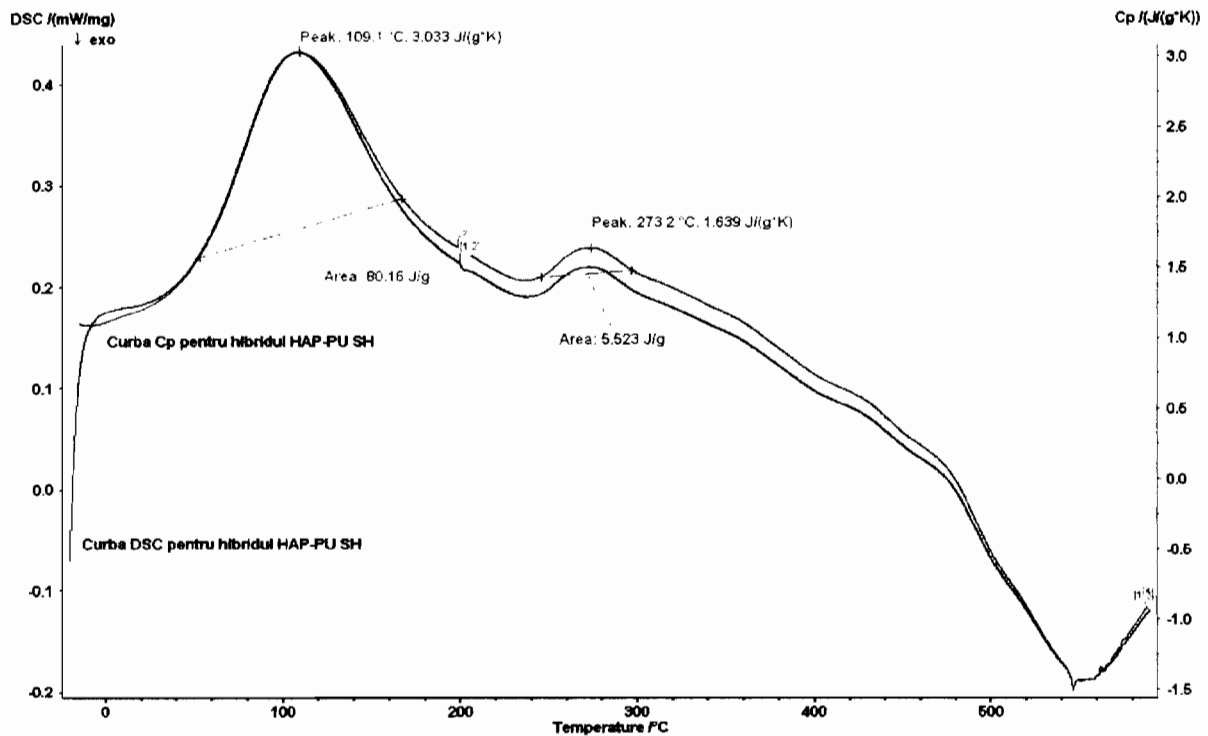


Figura 3 b. Analiza calorimetrică diferențială de baleiaj (DSC) ce pune în evidență transformările structurale ale pulberii hibride nanostructurate (raport greutate HAP:PU-SH=4:1).

a-2010-01112--
15-11-2010

24

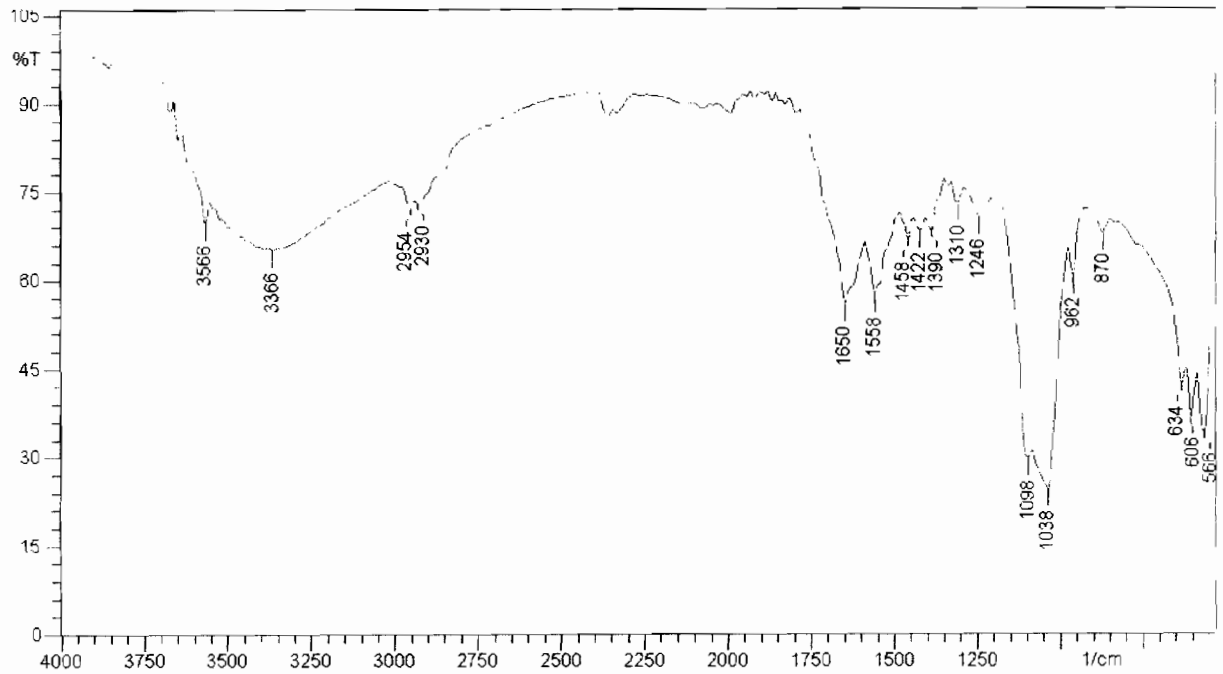


Figura 4. Spectrul în infra-roșu cu transformată Fourier pentru pulberea hibridă nanostructurată ce evidențiază formarea unor legături intermoleculare puternice între cele două componente cu participarea grupării carboxil libere din poliuretanul funcționalizat cu grupări finale tiol (polimer PU-SH)