



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2010 01112**

(22) Data de depozit: **15.11.2010**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **28.11.2014** BOPI nr. **11/2014**

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

(73) Titular:
• **INSTITUTUL NAȚIONAL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU
METALE NEFEROASE ȘI RARE - IMNR,
BD.BIRUIȚEI NR.102, 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.T D 45, AP.14,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **BURUIANĂ TINCA, BD.INDEPENDENȚEI
NR.11, BL.A 1-4, SC.C, ET.3, 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**

(56) Documente din stadiul tehnicii:
**US 6387414 (B1); US 2008206297 (A1);
EP 1437148 B1**

(54) **PULBERI HIBRIDE NANOSTRUCTURATE PENTRU
APLICAȚII MEDICALE**



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

3 Ingineria țesuturilor, disciplină emergentă care aplică principiile ingineriei pentru a realiza
dispozitive capabile să înlocuiască funcțiile pierdute sau compromise ale țesutului, se bazează
5 pe controlul interacțiunii dintre materiale, celule și factorii de creștere, astfel încât să se creeze
mediul propice regenerării funcțiilor țesutului și ale organelor [G. Chan, D. J. Mooney, **New
7 materials for tissue engineering: towards greater control over biological response, Trends in Biotechnology 26[7], (2008), 362-392**].

9 Primele materiale utilizate în ingineria țesuturilor au fost proiectate astfel încât să suporte
o sarcină mecanică minimă și să regleze difuzia nutrienților și a produșilor reziduali între noul
11 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
13 fi: dinți, șold, genunchi, valvele inimii și discuri intervertebrale. Aplicațiile biomaterialelor clasice
în domeniul ingineriei țesuturilor au fost însă limitate de capacitatea redusă a acestora de a
15 modula repararea și regenerarea țesutului gazdă. Astfel, s-au dezvoltat noi materiale sau au
fost modificate cele existente.

17 Specialiștii în ingineria țesuturilor au acordat atenție nu numai proprietăților chimice ale
materialelor, dar și aspectelor structurale care influențează profund funcția celulei, moartea și
19 formarea țesutului [G. Chan, D. J. Mooney, **New materials for tissue engineering: towards
greater control over biological response, Trends in Biotechnology 26[7], (2008), 362-392**].

21 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
23 topografia suprafeței sunt manipulate pentru a controla forma, alinierea și organizarea celulei
[G. Chan, D. J. Mooney, **New materials for tissue engineering: towards greater control
25 over biological response, Trends in Biotechnology 26[7], (2008), 362-392**]. Materialele care
îmbunătățesc regenerarea osului au o gamă largă de aplicații clinice, de la tratamentul
27 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
29 fracturilor, fără a fi nevoie de intervenție majoră. Totuși, defectele osoase mari, așa cum se
observă după rejecția tumorilor și a fracturilor severe, necesită intervenții chirurgicale. Sunt
31 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
33 se integrează cu osul gazdă și elimină complicațiile legate de imunitate și boală, care pot
apărea prin utilizarea osului alogenic (de la un cadavru uman) sau a osului xenogenic (osul de
35 la un animal) [M. M. Stevens, **Biomaterials for bone tissue engineering, Materials today, 11[5], (2008), 18-25**].
Procedeul „osului autolog transplantat” este limitat sever de sursele
37 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
39 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
41 proiectează materiale bioactive, care să interacționeze cu moleculele biologice sau celulele și
să permită regenerarea țesuturilor. În cazul osului, materialele trebuie să prezinte următoarele
43 caracteristici:

45 - să fie osteoinductive (capabile să promoveze diferențierea celulelor precursorare în linie
de osteoblaste);

47 - să fie osteoconductive (sprijină creșterea osului și proliferarea în țesutul osos înconjurător);

 - să fie capabile de oseointegrare (să se integreze în țesutul osos înconjurător).

RO 128603 B1

În ultimele două decenii, au fost studiate și evaluate o serie de materiale pentru substituirea osului autolog sau alogenic (ceramică bioactivă, sticle bioactive, polimeri sintetici sau naturali, compozite polimerice). 1
3

Combi-na-ția sinergică a biomaterialelor cu terapia celulară reprezintă un subiect de mare interes pentru comunitatea științifică [M. M. Stevens, **Biomaterials for bone tissue engineering, Materials today, 11[5], (2008), 18-25**]. 5

Materialele 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 polimerizare, în prezența fazei anorganice a precursorului copolimeric, o serie de compozite, cum ar fi: 7
9
11
13

- compozite polimerice, pentru aplicații medicale pe bază de poliuretan și zeoliți conținând ioni de argint [WO 2010/036214]; 15

- compozite pe bază de particule osoase și poliuretani [US 2010/0112032]; 17

- compozite pe bază de fosfat de calciu și un polimer termoplastic [US 2008/0206297];

- compozite pe bază de rășini epoxi și diferite materiale de ranforsare (nanoparticule de TiO₂, ZnO, SiC, Y₂O₃, C, nanotuburi de C) [US 2007/0142548]; 19

- compozite pe bază de hidroxil-apatită și colagen [EP 1437148]; 21

- nanocompozite pe bază de poliuretan și ZnO [US 2005/0239939].

Spre deosebire de materialele tradiționale, care se află în stadiul încercărilor clinice sau spre deosebire de produsele comerciale, aceste noi materiale sunt în stadiul testării *in vitro* sau în stadiul testelor preliminare *in vivo* pe animale [G. Chan, D. J. Mooney, **New materials for tissue engineering: towards greater control over biological response, Trends in Biotechnology 26[7], (2008), 362-392**]. 23
25
27

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. 29
31

Prezenta invenție 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. 33

Selectarea componentelor acestui nou material hibrid, nanostructurat, a avut în vedere tendințele actuale din domeniul biomaterialelor, care vizează ingineria țesuturilor, sistemele celulare sofisticate, aplicațiile în biotehnologie și care presupun interacții specifice și directe între biomaterial și componentele țesutului [D. F. Williams, **On the mechanism of biocompatibility, Biomaterials 29 (2008), 2941-2953**]. 35
37
39

Prin aplicarea invenției, se înlătură dezavantajele materialelor cunoscute din stadiul tehnicii, prin aceea că materialele propuse sunt constituite din hidroxiapatită și poliuretan funcționalizat cu grupări finale tiol într-un raport în greutate de 4:1, în care hidroxiapatita este sub formă de fibre subțiri, cu o lățime de 5...10 nm și o lungime de maximum 50 nm. 41
43

Figurile atașate reprezintă:

- fig. 1a, imagine de microscopie electronică prin transmisie (TEM) a pulberii hibride, obținută hidrotermal (raport greutate HAP:PU-SH = 4:1); 45

- fig 1b, difracție de electroni-imagine de microscopie electronică prin transmisie ce pune în evidență caracteristica dimensională nanostructurală a baghetelor de hidroxiapatită obținute; 47

RO 128603 B1

1 - fig. 2, imagine de microscopie electronică prin transmisie (TEM) a polimerului PU-SH tratat hidrotermal;

3 - fig. 3a, analiza calorimetrică diferențială de baleiaj (DSC), care pune în evidență transformările structurale ale poliuretanului funcționalizat cu grupări finale tiol inițial (polimer PU-SH inițial);

5 - fig. 3b, analiza calorimetrică diferențială de baleiaj (DSC), care pune în evidență transformările structurale ale pulberii hibride, nanostructurate (raport greutate HAP:PU-SH = 4:1);

7 - fig. 4, spectru în infraroșu cu transformată Fourier, pentru pulberea hibridă, nanostructurată, care evidențiază formarea unor legături intramoleculare puternice între cele două componente, cu participarea grupării carboxil liberă din poliuretanul funcționalizat cu grupări finale tiol (polimer PU-SH).

9 Conform invenției, pulberile hibride nanostructurate prezintă dimensiuni ale particulelor anorganice de hidroxiapatită (HAP) sub formă de fibre subțiri (whiskers) de maximum 50 nm lungime și 5...10 nm lățime (fig. 1a și 1b). Pentru comparație, în fig. 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.

13 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) (fig. 3a și 3b).

15 Conform invenției, pulberea hibridă nanostructurată prezintă interacțiuni intermoleculare puternice între cele două componente, aspect evidențiat prin analiză structurală în infraroșu cu transformată Fourier (fig. 4).

17 Fig. 4 evidențiază următoarele aspecte:

19 - 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 componenta anorganică;

21 - 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;

23 - în regiunea $962\text{...}1098\text{ cm}^{-1}$, se observă cele trei vibrații de întindere, caracteristice grupării PO_4^{3-} din hidroxiapatită.

25 Conform invenției, filmele subțiri, obținute prin depunerea pe suport din 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.

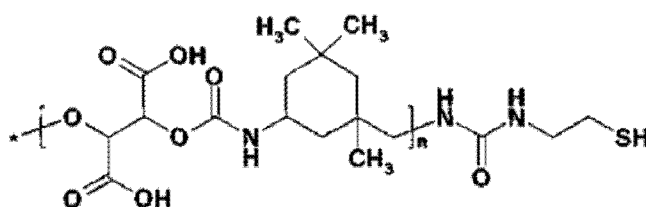
27 Pentru realizarea pulberilor conform invenției, se pot utiliza poliuretani funcționaliizați cu grupe finale tiol cu diferite concentrații molare de grupe SH. Procesul de sinteză a pulberilor hibride nanostructurate are loc în condiții hidrotermale, la temperaturi cuprinse între 25 și 100°C (de preferință, 80...100°C) și presiuni în intervalul 20...100 atm (de preferință, 80...100 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.

RO 128603 B1

Procedeul hidrotermal prezintă o serie de avantaje: reactanții, care în condiții normale sunt dificil de dizolvat, 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. Aceasta poate acționa ca un mineralizator sau ca un catalizator, în condiții de temperatură și presiune înalte. Proprietățile termodinamice și de transport ale apei, în condiții supercritice, sunt net diferite de cele ale apei, în condiții normale de temperatură și de presiune. Datorită scăderii viscozității solventului, mobilitatea moleculară crește, iar ca urmare a scăderii constantei dielectrice și a densității solventului, se modifică hidratarea ionică. Ca urmare, din punct de vedere energetic, procedeul hidrotermal se desfășoară cu minimum de consum energetic [K. Byrappa, M. Yoshimura, *Handbook of Hydrothermal Technology*, Ed. Noyes Publications, USA].

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)



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

Tabel

Cod	Compoziție	Morfologia 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, se cântăresc, 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 se dizolvă în 100 ml apă deionizată. Se adaugă 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 se filtrează și se spală, într-o singură treaptă, cu apă deionizată, pentru îndepărtarea urmelor de ioni de amoniu. După spălare, precipitatul amorf se repulpează în apă deionizată. Polimerul (1 g) se dizolvă în 35 ml DMAA (dimetilacetamidă) și se adaugă peste precipitatul repulpat în apă deionizată. Suspensia astfel obținută se introduce în autoclavă, pentru tratament în condiții hidrotermale (presiunea=80...100 atm; temperatura 80...100°C, timp=2 h). După tratamentul hidrotermal, soluția se liofilizează, pentru îndepărtarea solventului (apă și DMAA). Se obține o pulbere fină, de culoare albă, cu compoziție, microstructură și morfologie specifice.

RO 128603 B1

1 **Exemplul 2.** Pentru a obține 5 g de material hibrid, nanostructurat, în care raportul
2 greutate HAP:PU-SH =1:4, se cântăresc, cu exactitate, 2,35 g de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ și 0,686 g de
3 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, care se dizolvă în 50 ml apă deionizată. Se adaugă un volum bine determinat de
4 amoniac soluție 25%, astfel încât pH-ul soluției să ajungă la 10 și să aibă loc precipitarea HAP
5 amorfe. Precipitatul amorf pe bază de HAP se filtrează și se spală, într-o singură treaptă, cu apă
6 deionizată, pentru îndepărtarea urmelor de ioni amoniu. După spălare, precipitatul amorf se
7 repulpează în apă deionizată. Polimerul (4 g) se dizolvă în 35 ml DMAA (dimetilacetamidă) și
8 se adaugă peste precipitatul repulpat în apă deionizată. Suspensia astfel obținută se introduce
9 în autoclavă, pentru tratament în condiții hidrotermale (presiunea=80...100 atm; temperatura
10 80...100°C, timp=2 h). După tratamentul hidrotermal, soluția se liofilizează, pentru îndepărtarea
11 solventului (apă și DMAA). Se obține o pulbere fină, de culoare albă, care a fost caracterizată
din punct de vedere compozițional, microstructural și morfologic.

RO 128603 B1

Revendicări

- | | |
|--|--------|
| | 1 |
| 1. Pulberi hibride, nanostructurate, pe bază de hidroxiapatită și poliuretan, caracterizate prin aceea că sunt constituite din hidroxiapatită și poliuretan funcționalizat cu grupări finale tiol într-un raport în greutate de 4:1, în care hidroxiapatita este sub formă de fibre subțiri cu o lățime de 5...10 nm și o lungime de maximum 50 nm. | 3
5 |
| 2. Pulberi hibride, nanostructurate, conform revendicării 1, caracterizate prin aceea că raportul în greutate dintre hidroxiapatită și poliuretanul funcționalizat cu grupări finale tiol este de 1:4. | 7
9 |
| 3. Pulberi hibride, nanostructurate, conform revendicării 1, caracterizate prin aceea că temperatura de tranziție sticloasă a poliuretanului funcționalizat cu grupări finale de tiol crește, în prezența apatitei, tranziția fazei sticloase. | 11 |

(51) Int.Cl.

A61K 33/08^(2006.01),

A61K 33/42^(2006.01)

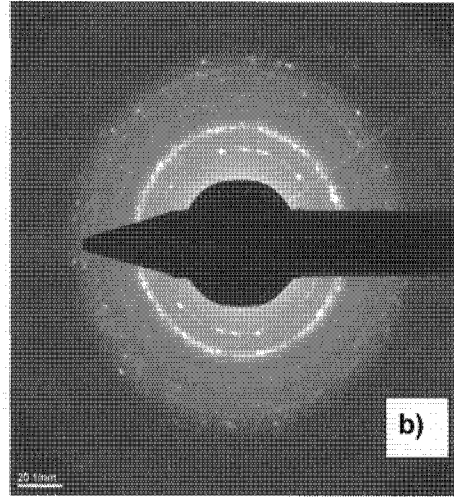
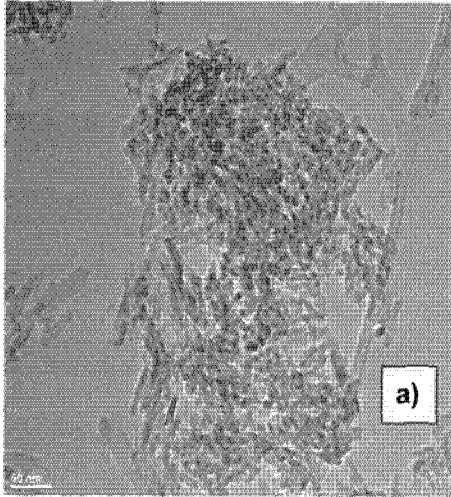


Fig. 1

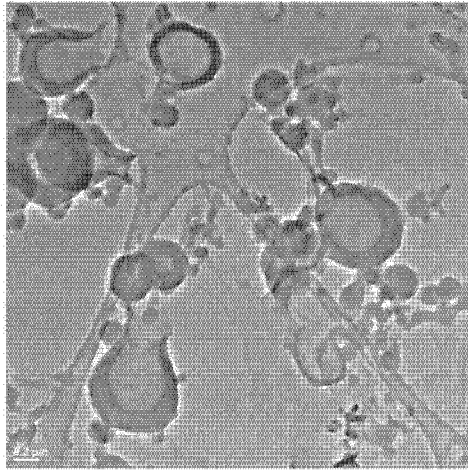


Fig. 2

(51) Int.Cl.

A61K 33/08^(2006.01),

A61K 33/42^(2006.01)

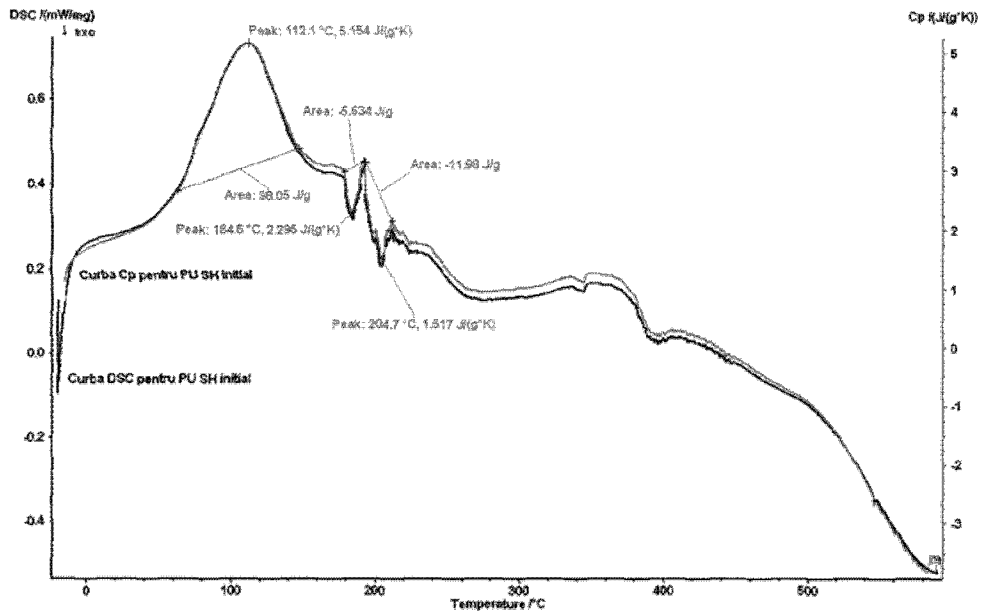


Fig. 3a

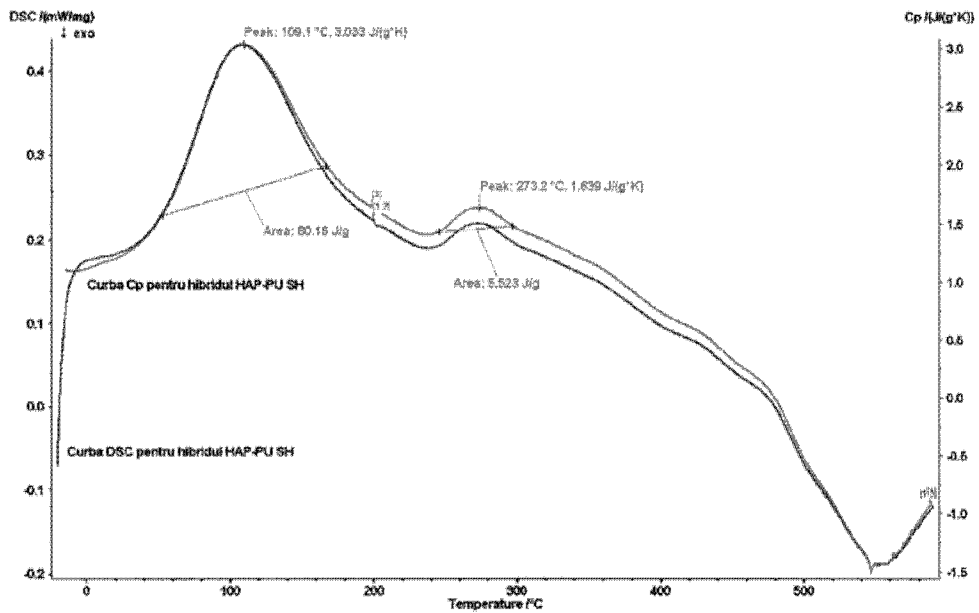


Fig. 3b

(51) Int.Cl.

A61K 33/08^(2006.01),

A61K 33/42^(2006.01)

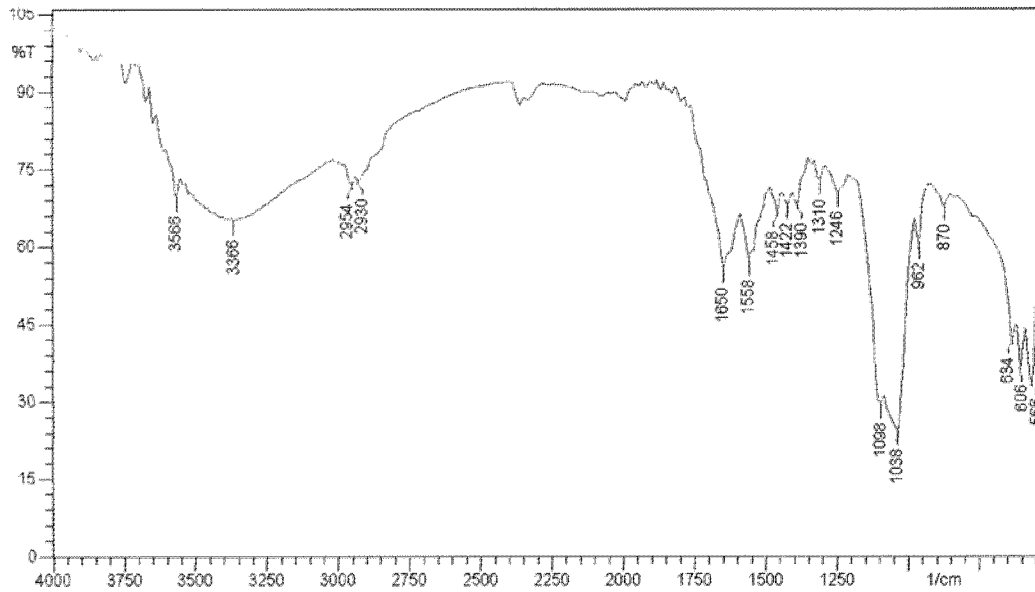


Fig. 4



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM
Tipărit la: Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci
sub comanda nr. 777/2014