



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2014 00808

(22) Data de depozit: 29/10/2014

(41) Data publicării cererii:
29/04/2016 BOPI nr. 4/2016

(71) Solicitant:
• INSTITUTUL DE CHIMIE
MACROMOLECULARĂ " PETRU PONI "
IAȘI, ALEEA GRIGORE GHICA VODA
NR.41 A, IAȘI, IS, RO

(72) Inventatori:
• CHIRIAC AURICA,
STR.ALEXANDRU VLAHUȚĂ NR.7B, AP.16,
IAȘI, IS, RO;

• NIȚĂ LOREDANA ELENA, BD.COPOU
NR.42, BL.A 3, SC.B, PARTER, AP.3, IAȘI,
IS, RO;
• NEAMTU IORDANA,
STR.THEODOR PALLADY NR.8, SC.B,
AP.9, IAȘI, IS, RO;
• TUDORACHI NIȚĂ, STR. DECEBAL
NR. 14, SC. A, AP. 19, IAȘI, IS, RO;
• DIACONU ALINA, STR. VIILOR NR. 17,
TÂRGU BUJOR, GL, RO;
• BĂLAN VERA, STR. HLINCEA NR. 23,
BL. 1054, SC. C, ET. 3, AP. 16, IAȘI, IS, RO

(54) PROCEDEU DE SINTEZĂ A UNUI COMPOZIT MAGNETIC

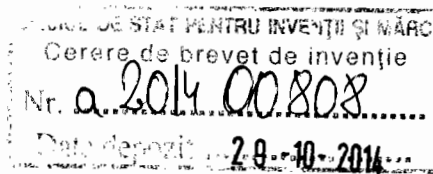
(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unui compozit magnetic utilizat ca purtător magnetic de substanțe active și instrument terapeutic pentru transportul la țintă și eliberarea controlată a medicamentelor. Procedeu conform invenției constă în sinteza unei matrice polimerice din 3,9-divinil-2, 4, 8,10-tetraoxispiro[5.5]undecan și anhidridă maleică, în raport molar 1:2, în soluție 22,5% în dioxan, în prezență de

inițiator radical, funcționalizarea acesteia prin desfacerea ciclului maleic din anhidrida maleică, prin reacție cu eritritol, și realizarea compozitului magnetic cu adaos de magnetită, sub formă de dispersie sau pulbere, *in situ*.

Revendicări: 1





33

PROCEDEU DE SINTEZĂ A UNUI COMPOZIT MAGNETIC

Invenția se referă la un procedeu de sinteză a unui compozit magnetic sub formă de microparticule pe baza de copolimer poli(3,9-divinil-2,4,8,10-tetraoxaspiro[5.5] undecan – co-anhidridă maleică) și cu magnetită încapsulată în matricea polimerică *in situ*, în timpul procesului de sinteză, aplicabil ca purtător magnetic de substanțe bioactive și instrument terapeutic pentru transportul la țintă și eliberarea controlată a medicamentelor, sau ca structură responsivă pentru sisteme tip senzor.

Substanțele bioactive aplicate în diverse terapii prezintă o serie de proprietăți care induc aspecte negative, în cazul aplicării în stare pură, cum ar fi : hidrofobia care promovează precipitarea lor în apă, selectivitate scăzută pentru țesutul țintă, biodistribuire în volum mare sau extravazare cu efecte secundare severe asupra țesuturilor sănătoase, clearance-ul rapid, degradarea *in vivo* ce necesită doze mari la administrare, susceptibilitatea de a crea rezistență.

Din aceste motive, este preferabilă încapsularea medicamentului într-un sistem de eliberare corespunzător constituit dintr-un polimer sau copolimer care să prezinte printre caracteristici : stabilitate fizică, dimensiuni corespunzătoare tipului de aplicație, abilitatea de a încapsula cantități adecvate de medicament fără a încălca organismul excesiv, protejare la degradare, fără pierderi de medicament, viteze de eliberare controlabile din purtător la țesutul țintit, suprafețe biocompatibile cu antigenicitate minimă, biodegradabilitate cu eliminare sau toxicitate minimă a produselor de descompunere.

În literatura de specialitate se prezintă un domeniu larg de polimeri naturali și sintetici disponibili pentru formarea de nanoparticule. Cerințele principale pentru aplicare în domeniul biomedical sunt biocompatibilitatea, biodegradabilitatea, 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.

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

Combinarea nanoparticulelor de magnetită cu polimeri pentru a obține sisteme compozite stabile prezintă avantaje cum ar fi: matricea polimerică poate fi funcționalizată prin crearea de grupe funcționale active catalitic sau biologic; poate acționa ca și compatibilizator interacționând cu mediul cu care vine în contact; reduce toxicitatea prin prevenirea contactului direct al materialului magnetic anorganic cu țesutul biologic; materialul magnetic permite manipularea nanoparticulelor de către un câmp magnetic exterior.

Magnetita este o variantă de material magnetic deseori folosită în formulările biomedicale deoarece are stabilitate chimică, toxicitate redusă și nu este cancerigenă. Folosind matrici polimerice biodegradabile sau nebiodegradabile, naturale sau sintetice, magnetita sub formă de nanoparticule se înglobează prin tehnici diferite, cum ar fi : polimerizare în dispersie sau în polimeri preformați.

Din clasa spiroortocarbonaților, 3,9-divinil-2,4,8,10-tetraoxaspiro [5.5] undecan este un comonomer hidrolizabil ce conține o legătură biciclică scindabilă hidrolitic. Manifestă citotoxicitate și genotoxicitate acceptabile. Introducerea grupelor spiroacetalice în structura polimerilor îmbunătățește solubilitatea, proprietățile de adeziune, stabilitatea termică și oxidativă, capacitatea de formare de filme, rigiditate și sensibilitate la pH acid. Este stabil la pH alcalin și are capacitatea de a reacționa la oxigenul eteric pentru a forma legături de hidrogen sau coordinative cu alte grupe funcționale. Aceste proprietăți fac din 3,9-divinil-2,4,8,10-tetraoxaspiro[5.5]undecan un component promițător în compozitul magnetic cu aplicații biomedicale.

Dintre tipurile de polimeri, copolimerii pe bază de anhidridă maleică au multe aplicații în domeniul biomedical și farmaceutic, prin activitatea sa proprie biologică, favorizate de biocompatibilitate, solubilitate în apă, structură bine definită, posibilitatea de a modifica balanța hidrofil/hidrofobă prin alegerea corectă a comonomerului sau prin reacții ulterioare pe copolimer. Ciclul maleic este labil, permițând reacții blânde cu medicamente, proteine și enzime. În mediu apos ciclul maleic hidrolizează și se deschide cu formare de două grupe carboxilice care permit acces la funcționalizare, ex grefare covalentă la acizi aminici pentru conjugare cu biomolecule. În prezența unui alcool, se generează un semiester.

Interesul în sinteza de polimeri sintetici biodegradabili pentru eliberarea controlată a agenților terapeutici este subliniat de numeroase brevete care descriu polimeri poli(ortoesteri) biodegradabili sau bioerodabili, hidrofobi, care intră ca matrice în compoziția unor dispozitive pentru administrarea cu viteză controlată a medicamentului.

Astfel de compuși sunt prezentați în brevetele U.S. Pat. 4.093.709 (1978), 4.131.648 (1978), 4.138.344 (1979) și 4.180.646 (1979). Brevetul US Pat 6.258.895 (2001) prezintă sinteza de polimeri cu grupări repetabile spiro ortoesterice, cu aplicabilitate la compozitele dentare de umplură.

În US Pat Application 0033140 (2008) polimerii poli(ortoesterici) ca și compuși biodegradabili și compozițiile ce includ acești polimeri sunt utili pentru aplicații ca dispozitive medicale și compoziții farmaceutice, cu viteză de hidroliză apreciabilă (utilă în aplicațiile care necesită biodegradare și/sau bioerodare), fără a fi necesară doparea cu substanțe bazice sau acide (ex. lactide și/sau glicolide) pentru a stimula hidroliza.

Astfel de materiale sunt descrise și în exemplul din brevetul US Pat. 4.304.767 (1981), care prezintă matrici în compoziția cărora intră și poli(ortoesteri), pentru medicamente sau alți agenți bioactivi folosiți în diferite terapii, care în contact cu mediul se degradează și eliberează principiile active.

Brevetul U.S. Pat. 5.461.140 (1995) se referă la polimeri bioerodabili pe bază de polimeri ortoesterici care clivează în condițiile fiziologice, folosiți la eliberarea controlată a agenților terapeutici.

În brevetul US Pat 4.549.010 (1984) se descriu copolimeri bloc sau alternanți pe bază de poli(ortoesteri) care încorporează tipuri specifice de dioli în catena principală, bioerodabili în mod predictibil, hidrofilii, cu aplicații biomedicale (dispozitive de eliberare controlată a substanțelor bioactive, suturi, acoperiri bioerodabile). În US Pat 5.030.457 (1991) se prezintă sinteza de polimeri dintr-un monomer ortoesteric și un triol, cu structură flexibilă, bioerodabili, destinați dispozitivelor moi de dozare a medicamentului.

În brevetul WO/2007/124016 care se referă la transportul magnetic și chelatizarea formulărilor terapeutice, un material magnetic de tipul magnetitelor este încorporat într-un material polimeric insolubil în apă, biocompatibil, cum ar fi un poli(ortoester). În exemplul prezentat, materialul magnetic se dispersează într-un solvent, în care polimerul și/sau agentul terapeutic este dizolvat. Faza organică se emulsionează în apă în prezența unui stabilizator și în final se elimină solventul pentru a se obține particule solide. Procedeele se realizează la temperatura de 25 - 37°C. Alternativ, agentul terapeutic poate fi atașat la suprafața particulelor preformate prin adsorbție, complexare sau legare covalentă. Procedeele prezintă dezavantajul că necesită un număr mare de faze tehnologice și presupune utilizarea de solvenți organici.

De asemenea în US Pat Application 0216320 (2009) se descrie un sistem de tip stent și/sau alte dispozitive implantabile pentru eliberarea locală a unui agent terapeutic. Formularea include nanoparticule de material magnetic sau magnetizabil, biocompatibil,

ce poartă agentul terapeutic sau celulele responsive magnetic. Aceste particule sunt încapsulate într-un material polimeric insolubil în apă, bio/nebiodegradabil ce poate fi un poli(ortoester).

În US Pat 4.957.998 (1990) se descriu polimeri biodegradabili sintetizați pentru dispozitive medicale cu eliberare controlată a principiilor bioactive și care conțin legături de tipul acetal, carboxi-acetal, ortoester și/sau carboxi ortoester.

US Pat 8.574.311 (2013) prezintă un polimer biodegradabil reticulat și metoda de sinteză a acestuia. Compoziția polimerică include un monomer multifuncțional, un diol (ex poli(etilen glicol)) și un diacid nesaturat (ex acid maleic, anhidrida maleică) parțial polimerizat pentru a forma o rețea care se fotoreticulează într-o dublă rețea.

US Pat 7.005.136 (2006) este direcționat pe dispozitive medicale de înlocuire a osului, pe bază de compoziții ce conțin un polimer lichid sintetic, bioabsorbabil și biocompatibil ca produs de reacție a unui poliacid sau a unui derivat al acestuia cum ar fi anhidrida maleică, un acid gras și un polioli.

În US Pat 7.138.464 (2006) se prezintă polimeri absorbabili pentru aplicații biomedicale sau farmaceutice, purtători de grupe acide sau bazice capabili să producă conjugare ionică cu agenți bioactivi bazici sau acizi, produși prin reacții de adiție a monomerilor funcționali nesaturați pe un polimer lichid absorbabil și generare ulterioară de funcționalități reactive, sau prin copolimerizare directă a unui inițiator carboxilic cu monomeri ciclici pentru a produce un copoliesteri lichizi purtători de grupe carboxilice sau poliester carbonați. Copoliesterul segmentat ce conține cel puțin o grupă laterală ce conține anhidridă succinică sau maleică.

Problema pe care o rezolvă invenția este realizarea unei reacții de sinteză a unui compozit magnetic sub formă de microparticule cu magnetita încapsulată *in situ* în timpul procesului de sinteză în matricea polimerică pe bază de 3,9-divinil-2,4,8,10-tetraoxaspiro[5.5] undecan și anhidridă maleică, care extinde gama de compozite magnetice cu matrici polimerice pentru biomateriale.

Procedeul de sinteză a compozitului magnetic conform invenției, extinde gama de compozite magnetice cu aplicații biomedicale, prin aceea că, în prima fază se sintetizează matricea polimerică din 3,9-divinil-2,4,8,10-tetraoxaspiro[5.5] undecan (U) 1 M și anhidrida maleică (AM) 2M în raport molar: U : AM = 1 : 2, în soluție 22,5 % în dioxan, în prezență de inițiator radicalic 2,2'-azobis(2-metilpropionitril) în proporție de $2,92 \times 10^{-4}$ M, la 75°C, în atmosferă de azot, sub agitare (250 rot/min) timp de 24 ore, precipitare și

spălare cu dietileter, filtrare și uscare în etuva de vid, după care, în faza a doua se tratează 0,2 g copolimer sintetizat în prima fază cu 0,6 g eritritol pentru un raport gravimetric copolimer : eritritol = 1 : 3, în 11 ml dioxan, la 80° C, 4 ore sub agitare (250 rot/min), apoi în faza a treia se prepară *in situ* compozitul magnetic prin adaos de 5% magnetită (pulbere D sau dispersie apoasă stabilizată A) față de cantitatea de copolimer, menținând amestecul de reacție la 80° C, sub agitare (250 rot/min), pentru încă 6 ore, urmat de colectarea compozitului preparat pe un magnet permanent, spălare și uscare.

Procedeul conform invenției prezintă următoarele avantaje :

- Este un procedeu ecologic, fără emanații toxice, simplu de aplicat pe instalații existente, cu un număr redus de faze tehnologice.
- Conținutul de oxid metalic poate fi modificat conform aplicației.
- Capacitate de cuplare prin legături de natură fizică a nanoparticulelor magnetice cu compuși anorganici sau bioactivi, lărgind gama de aplicații biomedicale.
- Stabilitate la stocare cât și operațională în decursul unei potențiale utilizări.

Se dă în continuare un exemplu de realizare a invenției.

EXEMPLU

Procesul de sinteză a compozitului magnetic hibrid implică trei faze: sinteza matricii polimerice (I), funcționalizarea suplimentară a matricii polimerice prin desfacerea ciclului maleic din anhidridă cu meso-eritritol (II) și prepararea compozitului magnetic (III).

În prima fază, monomerii 3,9-divinil-2,4,8,10-tetraoxaspiro[5.5] undecan (U) și anhidrida maleică (AM) în raport molar: U : AM = 1 : 2, în soluție de 22,5 % în dioxan se introduc într-un vas de reacție în sine cunoscut, cu fund rotund prevăzut cu agitator mecanic, termometru în circuitul de vapori, racord de alimentare cu azot și refrigerent răcit cu apă, plasat într-o baie de ulei termostată. Amestecul este sub agitare și se încălzește gradat până la 40 °C pentru dizolvarea completă a reactanților. Inițiatorul radicalic 2,2'-azobis(2-metilpropionitril) în proporție de $2,92 \times 10^{-4}$ M se adaugă treptat. Se încălzește în continuare amestecul de reacție până la 75°C, în atmosferă de azot, sub agitare (250 rot/min) și se menține timp de 24 ore. După răcire, amestecul copolimer - mediu de reacție este adăugat treptat în dietileter pentru precipitarea și purificarea copolimerului. Se spală de două ori cu dietileter, se izolează prin filtrare și se usucă în etuvă de vid la temperatura camerei și 600 mm Hg timp de 24 ore, rezultând copolimerul [P(MA-co-U)] sub formă de pudră albă.

În faza a doua, într-o instalație similară cu prima fază, 0,2 g copolimer se reacționează cu 0,6 g eritritol (E) pentru un raport gravimetric [P(MA-co-U)] : E = 1 : 3, în 11 ml dioxan. Se încălzește amestecul de reacție la 80° C pentru 4 ore sub agitare, timp în care se realizează desfacerea ciclului maleic din anhidridă.

În faza a treia se prepară compozitul magnetic [P(MA-co-U)/E/Magnetită]. Se folosesc două variante de magnetită : sub formă de pulbere (D) sau în dispersie apoasă stabilizată de concentrația 3,9% (A). În același vas de reacție peste amestecul de reacție din faza a doua se adaugă 0,04 g magnetită pulbere D sau 1ml dispersie apoasă A stabilizată, pentru un conținut teoretic de magnetită în matricea polimerică de 5% în greutate. Se menține amestecul la 80° C, sub agitare (250 rot/min), pentru încă 6 ore.

Nanoparticulele de compozit magnetic rezultate sunt colectate pe un magnet permanent, spălate intens cu alcool etilic și apoi uscate pentru 24 ore la 25 ° C și 600 mm Hg în etuva de vid. Se păstrează în exicator de vid în vederea analizelor și a prelucrării ulterioare în scopul cuplării cu substanțe antioxidante sau alte substanțe bioactive.

În legătură cu capacitatea de aplicare ca purtător magnetic de substanțe bioactive și instrument terapeutic pentru transportul la țintă și eliberarea controlată a medicamentelor, sau ca structură responsabilă pentru sisteme tip senzor, compozitul magnetic este testat din punct de vedere al distribuției dimensiunilor prin difuzia luminii laser, potențialului zeta în dispersie apoasă, a magnetizării și a stabilității termice.

Tabelul 1 prezintă dimensiunile particulelor, potențialul zeta, conductivitatea electrică și magnetizația pentru compozitele magnetice sintetizate cu magnetita D și cu magnetita A.

Tabelul 1. Diametrul hidrodinamic, potențialul zeta ζ și conductivitatea electrică pentru probele de nanocompozit magnetic

Caractristica/ Proba	P(MA-co-U) / E / Magnetita D	P(MA-co-U) / E / Magnetita A
Diametru hidrodinamic mediu ^{x)} , nm	295	342
Potential zeta ζ ^{x)} , mV	-34,3	-35,0
Conductivitate electrică ^{x)} , mS/cm	0,0243	0,0297
Magnetizație la saturație ^{xx)} , emu/g	2,1593	3,0841

^{x)} – Se măsoară folosind tehnica de difracție dinamică a razei laser pe dispozitivul Malvern Nano ZS ZetaSizer device (Malvern Instruments, UK).

^{xx)} – Se utilizează un magnetometru Lakeshore VSM 7410 System pentru un câmp magnetic cuprins între -20.000 și 20.000 Oe la temperatura camerei (25°C).

Diferențele care apar sunt o măsură a interacțiunii stabilite între polimer și magnetită, respectiv încapsularea acesteia în matricea polimerică. Valorile potențialului zeta reflectă stabilitatea și dispersabilitatea în dispersie apoasă, cu floculare mică în procesul de stocare.

Din curbele de magnetizație rezultate se observă că nu prezintă histerezis magnetic și cu creșterea intensității câmpului magnetic se înregistrează mărirea magnetizației de saturație. Valorile magnetizației reflectă o comportare caracteristică particulelor slab magnetice.

Caracterul termosensitiv al compozitului magnetic sintetizat se evidențiază prin evaluarea comportării în regim de creștere a temperaturii. Prin urmărirea modificării diametrului hidrodinamic cu temperatura se stabilește acest caracter al particulelor compozite hibride preparate pentru potențial uz biomedical. În Tabelul 2 se prezintă variația diametrului hidrodinamic în intervalul 25 – 39 ° C, în domeniul temperaturii fiziologice.

Tabelul 2. Variația diametrului hidrodinamic în intervalul de temperatură 25 – 39 ° C

Proba	Diametru hidrodinamic, nm							
	Temperatura, ° C							
	25	27	29	31	33	35	37	39
P(MA-co-U) / E / Magnetita D	300	285	265	243	224	250	300	250
P(MA-co-U) / E / Magnetita A	364	434	380	416	380	376	412	370

Diametrul hidrodinamic înregistrează deviații slabe pe domeniul de temperatură studiat, susținând afirmația asupra interacțiunii dintre matricea polimerică și magnetită care ar preveni expansiunea matricii polimerice, făcând-o mai compactă, cu afinitate mai mică față de apă și capabilă să realizeze legături mai puternice între molecule.

În Tabelul 3 sunt înregistrate principalele caracteristici deduse din analiza termogravimetrică realizată pe variantele de compozit magnetic cu magnetita D și magnetita A.

Tabelul 3. Analiza termogravimetrică ^{x)} a probelor de compozit magnetic cu cele două variante de magnetită

Proba	Stadiu de degradare	T _i °C	T _m °C	T _f °C	ΔW %	T ₁₀ °C	T ₅₀ °C
-------	---------------------	----------------------	----------------------	----------------------	---------	-----------------------	-----------------------

P(MA-co-U) / E/ Magnetita A	I	110	123	132	1,46	237	290
	II reziduu	250	292	313	85,42 13,12		
P(MA-co-U) / E/ Magnetita D	I	113	119	126	0,86	231	285
	II reziduu	204	292	307	92,80 6,34		

x) - Analiza termogravimetrică s-a realizat pe intervalul de temperatură 30 - 600 °C, în azot, cu o viteză de încălzire de 10 grade /minut. T_i , T_m , T_f - temperatura inițială, temperatura vitezei maxime de pierdere în greutate și temperatura finală a proceselor principale de descompunere termică; ΔW - pierderi în greutate pe intervalul $T_i - T_f$; T_{10} și T_{50} - temperatura corespunzătoare pierderilor în greutate de 10%, respectiv 50%.

Fiecare compozit magnetic prezintă un proces principal (II) de degradare termică între 200-320 °C, cu importante pierderi în greutate de 85,42 % pentru P(MA-co-U) / E/ Magnetita A și 92,80 % pentru P(MA-co-U) / E/ Magnetita D. Primul proces de degradare termică (I) plasat sub 130 °C este nesemnificativ cu pierderi în greutate sub 1,5 % și legat de eliberarea cantității de apă absorbită pe suprafața particulei de compozit magnetic. Analizând stabilitatea termică funcție de temperatură pentru 10 % pierderi în greutate (T_i) și 50 % pierderi în greutate (T_{50}) se observă o diferență nesemnificativă între cele două probe de compozit magnetic.

REVEDICARE

Procedeu de sinteză a unui compozit magnetic sub formă de microparticule ale unui copolimer pe bază de spiro ortoester cu anhidridă maleică și cu magnetită încapsulată în matricea polimerică în sinteză, **caracterizat prin aceea că** în prima fază se sintetizează matricea polimerică din monomerii 3,9-divinil-2,4,8,10-tetraoxaspiro[5.5] undecan U și anhidrida maleică AM în raport molar: U : AM = 1:2, în soluție de 22,5 % în dioxan, în prezență de inițiator radicalic 2,2' - azobis(2-metilpropionitril) în proporție de $2,92 \times 10^{-4}$ M, la 75°C, în atmosferă de azot, sub agitare de 250 rot/min timp de 24 ore, precipitare și spălare cu dietileter, filtrare și uscare în etuva de vid, după care, în faza a doua se reacționează 0,2 g copolimer sintetizat în prima fază cu 0,6 g eritritol pentru un raport gravimetric copolimer : eritritol = 1 : 3, în 11 ml dioxan, la 80° C, 4 ore sub agitare, apoi în faza a treia se prepară *in situ* compozitul magnetic prin adaosul de 5% magnetită față de cantitatea de copolimer, menținând amestecul de reacție la 80° C, sub agitare de 250 rot/min, pentru încă 6 ore urmat de răcire, colectarea compozitului preparat pe un magnet permanent, spălare intensă cu alcool etilic și la final uscare în etuva de vid la 25° C, 24 ore.