



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2016 00320

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

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

(71) Solicitant:
• 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

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

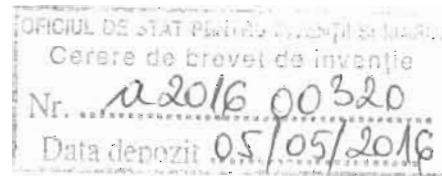
(57) Rezumat:

Invenția se referă la o metodă de depunere a proteinei biomimetice pe suprafața unui aliaj, utilizată pentru obținerea unor implanturi cu capacitate crescută de integrare în osul uman. Metoda conform invenției constă în acoperirea unui aliaj de implant de tip Ti-15Ta-5Zr cu 2 g/l proteină BSA - albumină serică

bovină - dizolvată în soluția fiziologică Ringer cu pH 7,4 ca mediu de depunere, la temperatura de 37°C, timp de 144 h, rezultând o acoperire densă, uniformă, cu rugozitate mare, care conține ca elemente bioactive Ca și P.

Revendicări: 1





DESCRIERE

Metoda de depunere proteina biomimetica pentru biofunctionalizarea oseointegrativa a suprafatei noului aliaj Ti-15Ta-5Zr

Domeniul tehnic la care se referă invenția

Inventia apartine domeniului tehnic al implanturilor metalice si anume se refera la cresterea capacitatii acestora de integrare in osul uman. Pe suprafata noului aliaj de implant Ti-15Ta-5Zr s-a depus o proteina „bovine serum albumin – BSA” care stimuleaza si imbunatateste procesul de osteointegrare, de fixare a implantului in os.

Prezentarea stadiului cunoscut al tehnicii din domeniu

Este cunoscut faptul ca suprafetele metalice sunt in general inerte biochimic stimuland foarte putin dezvoltarea de os; si suprafetele metalice acoperite cu hidroxiapatita (HA) bioactiva au capacitate osteoinductiva limitata [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 suprafata implanturilor metalice. La inceput 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 complicata si nu a dat rezultate foarte bune. In prezent se folosesc proteinele ca fibrinogen, fibronectina, vitramicina care se adsorb repede si constituie o matrice buna pentru adeziunea si dezvoltarea celulelor stem mezenchimale; aceste celule migreaza in zonele bolnave ale osului, se diferentiaza si alcatuiesc o matrice care ulterior este mineralizata si remodelata de celulele osteoblaste, formand 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 et al. au preparat peptide sintetice prin adsorbție pe suprafete de sticla care au actionat sinergetic in dezvoltarea si 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 et al. au aplicat peptida mimetica de collagen pe suprafata unor discuri de HA prin intermediul matricei de policaprolactona; discurile astfel obtinute au actionat timp de 2 luni pe osul tibie de iepure stimuland 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 et al. au functionalizat suprafata titanului cu dopamina, carboximetilchitosan si polizaharide si au obtinut imbunatatirea cresterii celulelor osteoblaste si in acelasi timp reducerea activitatii bacteriilor [X. Hu, K.G. Neoh, Z. Shi, E.T. Kang, C. Poh, W. Wang, An *in vitro* assessment of titanium fuctionalized with polysaccharides conjugated with vascular endothelial groeth factor for enhanced osseintegration and inhibition of bacterial adhesion, *Biomaterials* 31 (2010) 8854].

C.J. Huang et al. au obtinut o constructie biomimetica bistratificata folosind proteine multicomponente (colagen si/sau fibronectina) conjugate cu lipide (N-hidroxisulfecinimide) care au stimulat adeziunea si imprastierea 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 et al. au depus albumina serica umana (HSA) pe suprafata unui electrod de titan oxidat care contine oxid TiO_2 forma anatas nanocristalina. Studiile electrochimice au aratat ca proteina a redus viteza de corozie a suportului metalic prin blocarea ariilor active electrochimic de pe suprfata 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 rezulta ca studiile incipiente existente in prezent au aplicatii dedicate unor materiale si functionalizari de suprafete foarte specifice, singulare, aplicabile pe suprafete de titan. Inovatia de fata se refera la functionalizarea suprafetei aliajului ternar inovativ Ti-15Ta-5Zr folosind o metoda adaptata compozitiei aliajului si filmului pasiv existent pe suprafata sa si anume aplicarea de albumina serica bovina (BSA) din solutie fiziologica Ringer de pH neutru.

Expunerea inventiei

Prezentarea problemei tehnice pe care o rezolvă inventia

Aceasta inventie rezolva problema functionalizarii biomimetice a suprafetei noului aliaj de implant Ti-15Ta-5Zr prin acoperire cu proteina BSA, cu o rugozitate mare si care contine elemente bioactive Ca si P, din solutia de depunere chimica.

Prezentarea soluției tehnice

Ca proteina s-a folosit albumina din serul de bovine (bovine serum albumin), BSA care este foarte asemanatoare cu proteinele din corpul uman; s-a dizolvat aceasta proteina in solutia fiziologica Ringer de pH = 7,4, care simuleaza conditiile normale de functionare ale unui implant metalic in corpul uman. Prin metoda depunerii chimice s-a acoperit suprafata noului aliaj cu BSA cu consum extrem de mic de energie electrica si mana de lucru.

Noutatea inventiei consta in aceea ca acoperirea cu BSA s-a aplicat pentru prima data pe suprafata noului aliaj de implant Ti-15Ta-5Zr si s-a folosit solutia Ringer de pH = 7,4 ca mediu de depunere.

Prezentarea avantajelor invenției în raport cu stadiul tehnicii

Inventia prezinta urmatoarele avantaje:

- depunerea de proteina biomimetica BSA pentru osteointegrarea implantului prin stimularea aderenței celulelor osoase;
- aceasta depunere creste rezistenta la corozione a suprafetei aliajului;
- se lucreaza in solutii fiziologice, netoxice, nepoluante, sigure;
- depunerea se realizeaza la temperatura de 37⁰C cu consum foarte scazut de energie electrica;
- pretul de cost al acoperirii cu BSA este foarte scazut.

Prezentarea in detaliu a unui mod de realizare a invenției revendicate

Pregatirea substratului metalic:

- slefuire progresiva cu hartie abraziva de diferite granulatii, pana la granulatia 600;
- degresare in baie ultrasonica in acetona "histological grade" timp de 30 min.;
- degresare in baie ultrasonica in apa ultrapura Milipore timp de 30 min.;
- uscare in aer timp de 5 min.;
- imersare in solutia de depunere in recipient de sticla, foarte bine spalata si uscata la etuva, la 250⁰C; s-au asigurat 10 ml de solutie pentru fiecare cm² de suprafata metalica.

Pregatirea solutiei de depunere:

- solutia fiziologica Ringer cu pH = 7,4 s-a obtinut prin dizolvarea urmatoarelor substante "histological grade" intr-un litru de apa ultrapura Milipore: NaCl – 6.8; KCl – 0.4; CaCl₂ – 0.2; MgSO₄.7H₂O – 0.2048; NaH₂PO₄.H₂O – 0.1438; NaHCO₃ -1.1; glucose – 1;
- adaos de proteina BSA 2 g/L;

Depunerea proteinei biomimetice:

- temperatura 37⁰C mentinuta de o etuva controlata digital;

- timp de imersie 6 zile, 144 ore;
- scoatere si spalare cu apa ultrapura Milipore;
- uscare in aer timp de 30 min.

Caracterizarea depunerii de proteina biomimetica pentru biofunctionalizarea suprafatei noului aliaj Ti-15Ta-5Zr

Imaginile AFM arata formarea unor agregate cvasisferice, cu dimensiuni de 200-300 nm (Fig. 1) foarte favorabile adeziunii celulare. Rugozitatea medie patratica, RMS (root mean square roughness) de 76,8 nm si cea medie a suprafetei, Rav (average surface roughness) de 60,8 nm reprezinta o suprafata rugoasa potrivita pentru aderenta celulelor osoase.

Micrografiile SEM confirma rezultatele AFM si anume se evidentiaza o depunere consistenta, densa, uniforma (Fig. 2). Spectrul EDS contine elementele specifice proteinei, C si N; de asemenea apar elementele constituinte ale aliajului Ti, Ta, Zr, O; apar si elementele Ca si P elemente componente ale osului uman care stimuleaza aderarea si multiplicarea celulelor osteoblaste, deci formarea de os.

Spectrele Raman (Fig. 3) evidentiaza aceleasi 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} si 850 cm^{-1} ; dubletul Fermi de la 1340 cm^{-1} si 1360 cm^{-1} ; banda vibrationala imida de la $1600\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$; banda de la 1655 cm^{-1} care indica o structura predominant α -helical.

acoperire de BSA depusa pe suprafata aliajului Ti-15Ta-5Zr.

Evaluarea metodei de depunere de proteina biomimetica pentru biofunctionalizarea suprafatei noului aliaj Ti-15Ta-5Zr

Caracteristicile acoperirii cu BSA au fost evaluate din rezistenta la coroziune in solutie fiziologica Ringer neutra si alcalina, care simuleaza conditii severe de functionare ale unui implant in organismul uman.

Rezistența la coroziune a depunerii de proteina biomimetica

Determinarea rezistentei la coroziune a substratului metalic acoperit in comparatie cu cel neacoperit (Tabel 1) s-a evaluat din valorile curentului, i_{cor} si vitezei V_{cor} de coroziune si de „Ion release” care indica cantitatea de ioni eliberati in tesuturile inconjuratoare si din valorile rezistentei de polarizare, R_p care arata rezistenta opusa de stratul de BSA la trecerea ionilor metalici prin el.

Tabel 1. Principali parametri de coroziune ai aliajului Ti-20Zr-5Ta-2Ag acoperit cu BSA si neacoperit in solutie 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 rezistenta	FS	FS	FS	FS

FS – Foarte Stabil

Din Tabelul 1 rezulta ca valorile i_{cor} , V_{cor} si "Ion release" pentru aliajul acoperit cu BSA sunt mai mici decat cele pentru aliajul neacoperit, si anume, procesul de coroziune al aliajului acoperit este mult mai mic decat a celui neacoperit; rezistenta de polarizare R_p a aliajului acoperit a crescut in comparatie cu cea a aliajului neacoperit, ceea ce indica faptul ca aliajul acoperit cu BSA opune o rezistenta mai mare la trecerea ionilor metalici din substrat in solutie. Cele mai bune valori ale parametrilor de coroziune au fost obtinute in solutia Ringer neutra care reprezinta conditia normala din corpul uman in care functionaza un implant. In solutie Ringer alcalina care simuleaza conditii de functionare in caz de infectii sau inflamatii, au fost inregistrati parametri de coroziune mai putin favorabili datorita agresivitatii usor mai ridicate a acestei solutii; totusi in toate cele trei solutii, atat aliajul acoperit cat si cel neacoperit se incadreaza in clasa de rezistenta „Foarte Stabil”. Prin urmare, acoperirea cu BSA protejeaza substratul de eliberare de ioni si minimalizeaza astfel reactiile adverse, crescand biocompatibilitatea noului aliaj.

REVENDICĂRI**Metoda de depunere proteina biomimetica pentru biofunctionalizarea oseointegrativa a suprafatei noului aliaj Ti-15Ta-5Zr**

Metoda de depunere proteina biomimetica **caracterizata prin aceea ca** albumina din serul de bovine (bovine serum albumin) BSA s-a depus pe suprafata noului aliaj Ti-15Ta-5Zr prin metoda chimica adaptata compozitiei aliajului si filmului pasiv existent pe suprafata sa, din solutie fiziologica Ringer de pH neutru.

DESENELE EXPLICATIVE

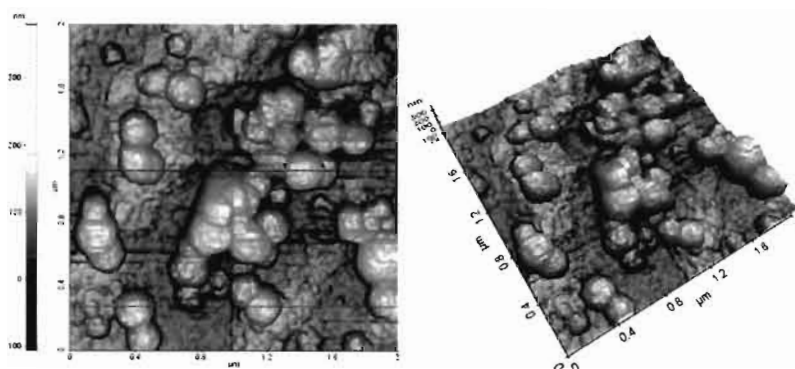


Fig. 1. Imagini AFM ale acoperirii cu BSA obtinute dupa 144 ore de imersie in solutia de depunere.

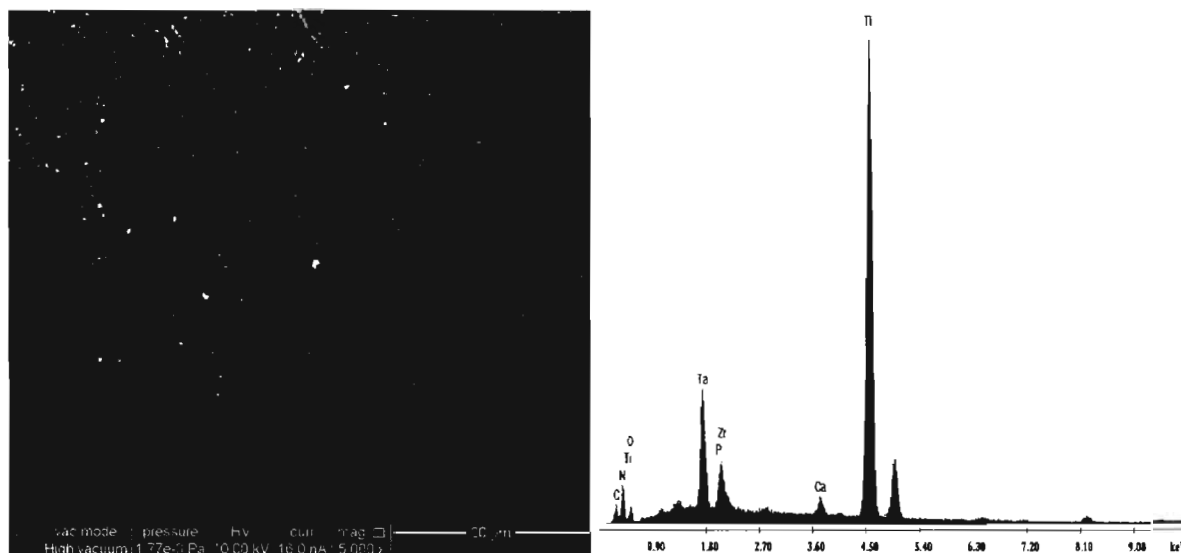


Fig. 2. Morfologia suprafetei si spectrul EDS pentru aliajul Ti-15Ta-5Zr acoperit cu BSA timp de 144 ore.

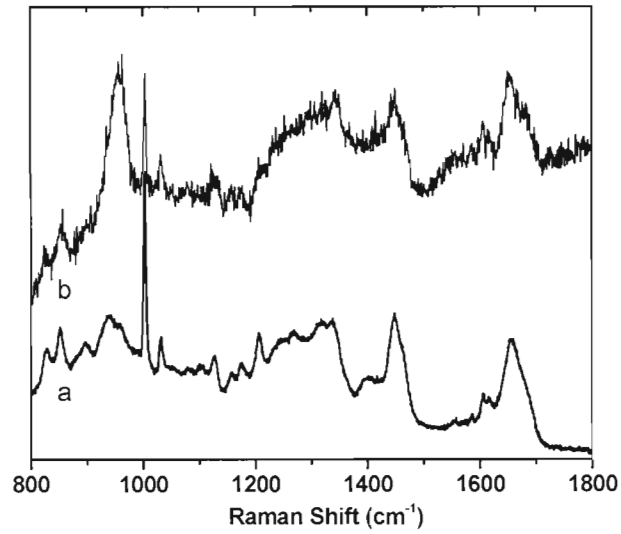


Fig. 3. Spectre Raman masurate pe: (a) pudra de BSA; (b) acoperire de BSA depusa pe suprafata aliajului Ti-15Ta-5Zr.