



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2016 00483**

(22) Data de depozit: **04/07/2016**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30/12/2021** BOPI nr. **12/2021**

(41) Data publicării cererii:
30/01/2018 BOPI nr. **1/2018**

(73) Titular:
• **INSTITUTUL NAȚIONAL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU
FIZICA MATERIALELOR-INCDFM,
STR.ATOMIȘTIILOR NR.405 A, MĂGURELE,
IF, RO**

(72) Inventatori:
• **PREDOI DANIELA, CALEA PLEVNEI
NR.94, BL.10D2, SC.1, ET.4, AP.12,
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **CIOBANU STELUȚA CARMEN,
ALEEA CETĂȚUIA NR. 2, BL. M17, SC. A,
ET. 3, AP. 20, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B,
RO;**

• **POPA CRISTINA-LIANA, STR. BORSA
NR. 1-3, BL. 10E, SC. 2, ET.4, AP. 28,
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **ICONARU SIMONA-LILIANA, ȘOS. VIILOR
NR. 101, BL. 1, SC. 6, ET. 6, AP. 185,
SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO**

(56) Documente din stadiul tehnicii:
**KR 100842378; DA WAHL, J. T.
CZERNUSZKA,
"COLLAGEN-HYDROXYAPATITE
COMPOSITES FOR HARD TISSUE
REPAIR", EUROPEAN CELLS AND
MATERIALS, VOL. 11, PP. 43-56, 2006**

(54) **PROCEDEU DE OBȚINERE A HIDROXIAPATITEI DOPATE
CU ZINC ÎN MATRICE DE COLAGEN**



RO 132335 B1

1 Prezenta invenție se referă la obținerea printr-o metodă simplă și costuri reduse a
unui material pe bază de hidroxiapatită dopată cu zinc într-o matrice de colagen cu potențiale
3 aplicații biomedicale.

5 Necesitatea din ce în ce mai mare pentru noi biomateriale cu proprietăți superioare
a determinat cercetătorii din întreaga lume să încerce să redea caracteristicile țesutului uman
7 natural. Așadar, prin alăturarea mai multor compuși care se găsesc în mod natural în țesutul
dur natural, se încearcă crearea unui material care ar putea fi integrat în corpul uman fără
9 a provoca efecte adverse, conducând astfel la îmbunătățirea calității vieții oamenilor care au
fost supuși unor intervenții chirurgicale majore.

11 Potrivit unui raport al Asociației Americane a Chirurgilor Ortopezi din 2002, țesutul
osos este al doilea cel mai frecvent transplatat țesut, fiind depășit doar de transfuziile de
13 sânge. Așadar, grefele osoase sunt necesare pentru remedierea leziunilor osoase grave,
cauzate în principal de deformări congenitale, traume, de rezecții ale unor tumori sau de
15 diferite boli degenerative precum osteomielite, (**D.A. Wahl, J.T. Czernuszka, Eur Cell Mater**
11, 43 (2006); M. Geiger, R.H. Li, W Friess, Adv Drug Deliv Rev 55, 613, (2003)). Prin
17 urmare, medicina modernă s-a concentrat asupra găsirii unei soluții optime pentru a rezolva
problema grefelor osoase. În acest context, o alternativă la metodele de grefare clasice sunt
19 grefele sintetice. Astfel, cercetătorii din întreaga lume încearcă să găsească un material bio-
compatibil capabil să imite țesutul osos natural.

21 Osul uman este compus dintr-o parte anorganică, a cărei componentă majoritară este
hidroxiapatita (HAp, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), și o parte organică care este compusă majoritar din
23 fibre de colagen (89%) (**M. Geiger, R.H. Li, W Friess, Adv Drug Deliv Rev 55, 613 (2003);**
K. Matsunaga, H. Murata, T. Mizoguch, A. Nakahira, Acta Biomater 6(6), 2289 (2010);
A.A. Al-Munajjed, N.A. Plunkett, et al., J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater
25 **90B(2), 584 (2009); R.B. Martin, D.B. Burr, N.A. Sharkey, Skeletal Tissue Mechanics**
Springer-Verlag, New York. (1998)). Numeroase studii au arătat că hidroxiapatita are
27 proprietăți biologice remarcabile, cum sunt biocompatibilitatea și osteoconductivitatea (**D.A.**
Wahl, J.T. Czernuszka, Eur Cell Mater 11, 43 (2006)). Pentru a îmbunătăți proprietățile
29 HAp, s-a încercat substituția ionilor de calciu din structura sa cu diferiți ioni (**F. Ren, R. Xin,**
X. Ge, Y. Leng, Acta Biomater 5(8), 3141 (2009); J.C. Elliott, Structure and chemistry
31 **of the apatites and other calcium orthophosphates. Studies in inorganic chemistry,**
vol. 18. Elsevier, Amsterdam. (1994); R.Z. LeGeros, Monographs in oral science, vol.
33 **15. Karger, Basel. (1991); S. Koutsopoulos, J. Biomed Mater Res A 62, 600 (2002); C.S.**
Ciobanu, S.L. Iconaru, P. Le Coustumer, L.V. Constantin, D. Predoi, Nanoscale. Res.
35 **Lett. 7, 324(2012); C.S. Ciobanu, C.L. Popa, D. Predoi, J. Nanomater. 2014, 1 (2014);**
C.S. Ciobanu, E. Andronescu, D. Predoi, Dig. J. Nanomater. Bios. 6, 1239 (2011)).
37 Recent, o atenție deosebită a fost acordată zincului (Zn), deoarece acesta este un metal de
tranzitie, frecvent întâlnit în partea minerală osoasă, având rolul de a stimula formarea
39 țesutului osos *in vivo* și *in vitro*, inhibând în același timp resorbția osoasă osteoclastica *in*
vivo (**F. Ren, R. Xin, X. Ge, Y. Leng, Acta Biomater 5(8), 3141 (2009); J.C. Elliott,**
41 **Structure and chemistry of the apatites and other calcium orthophosphates. Studies**
in inorganic chemistry, vol. 18. Elsevier, Amsterdam. (1994); R.Z. LeGeros,
43 **Monographs in oral science, vol. 15. Karger, Basel. (1991); S. Koutsopoulos, J. Biomed**
Mater Res A 62, 600 (2002); C.S. Ciobanu, S.L. Iconaru, P. Le Coustumer, L.V.
45 **Constantin, D. Predoi, Nanoscale. Res. Lett. 7, 324(2012); C.S. Ciobanu, C.L. Popa, D.**
Predoi, J. Nanomater. 2014, 1 (2014); C.S. Ciobanu, E. Andronescu, D. Predoi, Dig. J.
47 **Nanomater. Bios. 6, 1239 (2011); A. Ito, M. Otsuka, H. Kawamura, M. Ikeuchi, H.**

Ohgushi, Y. Sogo, N. Ichinose, Curr Appl Phys 5, 402 (2005)). De asemenea, studii recente au demonstrat că prezența Zn în structura implanturilor crește viteza procesului de formare a țesutului osos în jurul implantului (**Y. Tang, H.F. Chappell, M.T. Dove, R.J. Reeder, Y.J. Lee, Biomaterials 30(15), 2864. (2009)**); **A. Ito, H. Kawamura, M. Otsuka, M. Ikeuchi, H. Ohgushi, K. Ishikawa et al Mater Sci Eng 22(1), 21 (2002)**); **A. Ito, K. Ojima, H. Naito, N. Ichinose, T. Tateishi, J. Biomed Mater Res 50, 178 (2000)**). Pe de altă parte, colagenul este folosit în ingineria tisulară și reparatorie datorită biocompatibilității și capacității de a fi resorbit cu ușurință de către corp (**D.A. Wahl, J.T. Czernuszka, Eur Cell Mater 11, 43 (2006)**), **D. Predoi, R.A. Vatasescu-Balcan, J. Optoelectron. Adv. Mater. 10, 152 (2008)**); **G. Voicu, și Jinga, R. Trusca, F. Iordache, Dig J. Nanomater Bios 9, 99 (2014)**); **L.C. Rusu, D.A. Kaya, M.V. Ghica, M.G. Albu, L. Popa, A. Butu, C.E. Dinu-Pirvu, Dig J. Nanomater Bios 9, 317 (2014)**); **G. David, B.C. Simionescu, S. Maier, C. Balhui, Dig J. Nanomater Bios 6, 1575, (2011)**). Studii recente au demonstrat că dispozitivele pe bază de colagen și hidroxiapatită inhibă dezvoltarea agenților patogeni bacterieni, reducând astfel riscul apariției infecțiilor post-chirurgicale care pot apărea în urma implantării protezelor (**D.A. Wahl, J.T. Czernuszka, Eur Cell Mater 11, 43 (2006)**); **M. Geiger, R.H. Li, W Friess, Adv Drug Deliv Rev 55, 613 (2003)**); **K. Matsunaga, H. Murata, T. Mizoguch, A. Nakahira, Acta Biomater 6(6), 2289 (2010)**); **A.A. Al-Munajjed, N.A. Plunkett, et al., J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater 90B(2), 584 (2009)**); **R.B. Martin, D.B. Burr, N.A. Sharkey, Skeletal Tissue Mechanics Springer-Verlag, New York. (1998)**); **F. Ren, R. Xin, X. Ge, Y. Leng, Acta Biomater 5(8), 3141 (2009)**); **J.C. Elliott, Structure and chemistry of the apatites and other calcium orthophosphates. Studies in inorganic chemistry, vol. 18. Elsevier, Amsterdam. (1994)**); **R.Z. LeGeros, Monographs in oral science, vol. 15. Karger, Basel. (1991)**); **S. Koutsopoulos, J. Biomed Mater Res A 62, 600 (2002)**); **C.S. Ciobanu, S.L. Iconaru, P. Le Coustumer, L.V. Constantin, D. Predoi, Nanoscale. Res. Lett. 7, 324(2012)**); **C.S. Ciobanu, C.L. Popa, D. Predoi, J. Nanomater. 2014, 1 (2014)**); **C.S. Ciobanu, E. Andronescu, D. Predoi, Dig. J. Nanomater. Bios. 6, 1239 (2011)**); **A. Ito, M. Otsuka, H. Kawamura, M. Ikeuchi, H. Ohgushi, Y. Sogo, N. Ichinose, Curr Appl Phys 5, 402 (2005)**); **Y. Tang, H.F. Chappell, M.T. Dove, R.J. Reeder, Y.J. Lee, Biomaterials 30(15), 2864. (2009)**); **A. Ito, H. Kawamura, M. Otsuka, M. Ikeuchi, H. Ohgushi, K. Ishikawa et al, Mater Sci Eng 22(1), 21 (2002)**); **A. Ito, K. Ojima, H. Naito, N. Ichinose, T. Tateishi, J. Biomed Mater Res 50, 178 (2000)**); **D. Predoi, R.A. Vatasescu-Balcan, J. Optoelectron. Adv. Mater. 10, 152 (2008)**); **G. Voicu, și Jinga, R. Trusca, F. Iordache, Dig J. Nanomater Bios 9, 99 (2014)**); **L.C. Rusu, D.A. Kaya, M.V. Ghica, M.G. Albu, L. Popa, A. Butu, C.E. Dinu-Pîrvu, Dig J. Nanomater Bios 9, 317 (2014)**); **G. David, B.C. Simionescu, S. Maier, C. Balhui, Dig J. Nanomater Bios 6, 1575, (2011)**); **G.A. Carlson, J.L. Dragoo, B. Samimi, D.A. Bruckner, G.W. Bernard, M. Hedrick, P. Benhaim, Biochem Biophys Res Commun 321(2), 472 (2004)**).

Problema pe care o rezolvă invenția este de a prezenta un procedeu de obținere a hidroxiapatitei dopate cu zinc în matrice de colagen prin coprecipitare la temperaturi joase.

Procedeu de obținere a hidroxiapatitei dopate cu zinc în matrice de colagen prin coprecipitare la temperaturi joase, conform invenției, înlătură dezavantajele de mai sus prin aceea că, la temperatura de 40°C, soluția de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ se adaugă la un amestec format din $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ și $\text{Zn}(\text{NO}_3)_6 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, pulberile obținute au fost adăugate într-un gel de colagen, obținându-se astfel compușii Zn:HAp-CBc cu următoarele rapoarte: 0:1, referința de colagen, 4:1 Zn:HAp-CBc_4, 1:1 Zn:HAp-CBc_1 și 1:0, referința de Zn:HAp, care au fost supuse procesului de reticulare, iar compozitele de gel obținute au fost liofilizate, rezultând în final compozite poroase 3D, utilizate ca materiale în regenerarea osoasă.

1 Prin aplicarea invenției se obține avantajul producerii unor biomateriale ieftine și
eficiente în regenerarea osoasă.

3 Scopul invenției este de a realiza pulberi de hidroxiapatită dopată cu Zn într-o matrice
de colagen (Zn:HAp-CBc_1 și Zn:HAp-CBc_4) cu potențiale aplicații biomedicale. Studiul
5 citotoxicității Zn:HAp-Cbc s-a realizat asupra liniei celulare cancerigene HeLa.

7 Prezenta invenție ne descrie posibilitatea utilizării unor biomateriale, pe bază de
hidroxiapatită dopată cu Zn, ieftine și eficiente în regenerarea osoasă. Noul compozit a fost
obținut prin înglobarea hidroxiapatitei dopate cu zinc într-o matrice de colagen. Precursorii
9 utilizați au fost: nitratul de calciu [$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, Aldrich, USA], amoniu hidrogen fosfat
((NH_4)₂HPO₄; Wako Pure Chemical Industries Ltd.) și nitratul de zinc hexahidrat ($\text{Zn}(\text{NO}_3)_6$
11 $\cdot 6\text{H}_2\text{O}$, Alpha Aesare, Germany, puritate 99,99%). Colagenul fibrilar de Tipul I sub forma de
gel (Coll) cu o concentrație de 2,11% (w/w) a fost extras din os de vițel prin intermediul
13 tratamentelor descrise anterior (**M.G. Albu, Collagen gels and matrices for biomedical
applications Lambert Academic Publishing, Saarbrücken. (2011).**

15 În continuare se prezintă un exemplu de realizare a invenției în legătură cu figurile
care reprezintă:

17 - fig. 1, prezintă imaginile MEB ale colagenului (fig. 1a), Zn:HAp (fig. 1b) și Zn:HAp-
CBc (fig. 1c-1d);

19 - fig. 2, prezintă spectrul EDAX împreună cu cartografiile compozitelor bioceramice
Zn:HAp-CBc_1;

21 - fig. 3, prezintă rezultatele evaluării morfologiei celulelor HeLa înainte (etalon) și
după expunerea la colagen, Zn:HAp-CBc_1, Zn:HAp-CBc_4 și Zn:HAp ($x_{\text{zn}} = 0,1$) (10 mg/ml)
23 timp de 72 h;

- fig. 4, prezintă rezultate privind proliferarea celulară și apoptoza.

25 Exemplul 1

27 Cantități potrivite de amoniu hidrogen fosfat și nitrat de zinc au fost dizolvate în
etanol. După adăugarea apei bidistilate, soluția a fost agitată continuu timp de 24 h la o
temperatură de 40°C. Separat, o cantitate stoichiometrică de nitrat de calciu a fost dizolvată
29 în etanol și a fost agitată continuu timp de 24 h la o temperatură de 40°C. Soluția cu conținut
de calciu a fost apoi adăugată treptat în soluția cu conținut de fosfor și a fost ulterior lăsată
31 la temperatura ambientală timp de 72 h și încă 24 h la o temperatură de 40°C. Raportul
[Ca+Zn]/P a fost ajustat la 1,67 iar concentrația de zinc a fost $x_{\text{zn}} = 0,1$ (**C.S. Ciobanu, F.**
33 **Massuyeau, L.V. Constantin, D. Predoi, Nanoscale Res Lett 6(1),613. (2011); C.S.**
Ciobanu, S.L. Iconaru, F. Massuyeau, L.V. Constantin, A. Costescu, D. Predoi, J.
35 **Nanomater 2012, 1 (2012); C.S. Ciobanu, E. Andronescu, B.S. Vasile, C.M.**
Valsangiacom, R.V. Ghiță, D. Predoi, Optoelectron. Adv. Mater.-Rapid commun 4, 1515
37 **(2010)).** Nanopulberile de Zn:HAp obținute au fost tratate la o temperatură de 80°C timp de
6 h. Hidroxiapatita dopată cu zinc obținută anterior, a fost adăugată într-un gel de colagen,
39 obținându-se astfel compuși Zn:HAp-CBc cu următoarele rapoarte: 0:1 (referința de
colagen), 4:1 (Zn:HAp-CBc_4), 1:1 (Zn:HAp-CBc_1) și 1:0 (referința de Zn:HAp). Toți
41 compușii de gel au avut aceeași concentrație de colagen, 1,2% (raportat la substanța
uscată), pH-ul 7,4 și au fost reticulați cu 0,5% GA conform metodei descrise anterior în
43 literatură (**A. Lungu, M.G. Albu, N.M. Florea, I.C. Stancu, E. Vasile, H. Iovu, Dig J.**
Nanomater Bios 6(4), 1867(2011)). După procesul de reticulare, compozitele de gel au fost
45 liofilizate obținându-se în final compozite poroase 3D. Morfologia și porozitatea biocompo-
zitelor de hidroxiapatită dopată cu zinc acoperită cu colagen (Zn:HAp-CBc) a fost studiată
47 prin microscopie electronică de baleiaj (MEB). În fig. 1 sunt prezentate imaginile MEB ale

RO 132335 B1

colagenului (fig. 1a), Zn:HAp (fig. 1b) și Zn:HAp-CBc (fig. 1c-1d). Morfologia colagenului este prezentată în fig. 2a, în timp ce în fig. 1b sunt prezentate imaginile MEB ale Zn:HAp, acestea având dimensiuni nanometrice și o morfologie elipsoidală. În fig. 1c-1d se poate observa că porozitatea materialelor compozite a crescut o dată cu creșterea raportului Zn:HAp/colagen (Zn:HAp-CBc_1). Se poate observa că porozitatea materialelor compozite este direct proporțională cu cantitatea de colagen din probe (Zn:HAp-CBc_1 > Zn:HAp-Cbc_4). Înglobarea nanoparticulelor de Zn:HAp în matricea de colagen a fost pusă în evidență prin intermediul imaginilor MEB. De asemenea, se poate observa că probele sunt omogene. Spectrul EDAX împreună cu cartografiile compozitelor bioceramice Zn:HAp-CBc_1 sunt prezentate în fig. 2. Acestea, au arătat că principalele elemente chimice prezente în pulberea analizată sunt calciul, fosforul, zincul, oxigenul și carbonul. Pe de altă parte, se poate observa o distribuție uniformă a acestora.

Rezultatele obținute în urma studiilor MEB sugerează faptul că nanoparticulele de Zn:HAp au fost înglobate în matricea de colagen. Biocompatibilitatea nanocompozitelor de hidroxiapatită dopată cu zinc într-o matrice de colagen a fost studiată utilizând culturi celulare HeLa. Fig. 3, prezintă rezultatele evaluării morfologiei celulelor HeLa înainte (etalon) și după expunerea la colagen, Zn:HAp-CBc_1, Zn:HAp-CBc_4 și Zn:HAp ($x_{Zn} = 0,1$) (10 mg/ml) timp de 72 h. Imaginile microscopice ale culturilor celulare HeLa incubate cu nanocompozitele obținute arată că prezența materialelor compozite nu a modificat semnificativ morfologia celulelor, acestea prezentând o morfologie similară cu cea a etalonului. În imagini (fig. 3) se poate observa că celulele își păstrează forma poligonală caracteristică, și că sunt uniform distribuite pe suprafața investigată. Studii complementare privind biocompatibilitatea și citotoxicitatea nanocompozitelor de hidroxiapatită dopată cu zinc într-o matrice de colagen au fost realizate utilizând tehnica citometriei în flux cu dublă-colorare a celulelor cu Annexin V-FITC/iodura de propidiu. Rezultatele analizei de citometrie de flux privind influența materialelor compozite obținute asupra ciclurilor celulare ale celulelor HeLa a pus în evidență faptul că nu au existat schimbări semnificative ale parametrilor ciclului celular ai celulelor HeLa expuse la colagen, Zn:HAp-CBc_1, Zn:HAp-CBc_4 și Zn:HAp ($x_{Zn} = 0,1$) comparativ cu etalonul. Mai mult decât atât, rezultatele obținute privind proliferarea celulară și apoptoza, sugerează că nu a existat nicio diferență între compozitele obținute și materialele brute utilizate (fig. 4). Studiile privind efectul citotoxic al nanoparticulelor Zn:HAp-CBc asupra liniei celulare HeLa canceroase au pus în evidență caracterul netoxic al acestora, o distribuție omogenă și uniformă și o morfologie a celulelor HeLa similară cu cea a probei etalon (fig. 3). Pe de altă parte, analiza ciclului celular al celulelor HeLa cultivate cu 0,1% DMSO (etalon) și tratate cu colagen, Zn:HAp-CBc_1, Zn:HAp-CBc_4 și Zn:HAp ($x_{Zn} = 0,1$) a arătat că nu se remarcă nicio diferență între parametrii obținuți pentru ciclul celular al celulelor tratate cu compozitele obținute și al celulelor tratate cu materialele originale și parametrii obținuți pentru ciclul celular al culturii celulare etalon. De asemenea, rezultatele privind proliferarea celulară și apoptoza au arătat că nu există diferențe semnificative între materialele compozite și materiale originale testate (fig. 4).

RO 132335 B1

1

Revendicare

3

Procedeu de obținere a hidroxiapatitei dopate cu zinc în matrice de collagen prin coprecipitare la temperaturi joase, **caracterizat prin aceea că** la temperatura de 40°C, soluția de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ se adaugă la un amestec format din $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ și $\text{Zn}(\text{NO}_3)_6 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, pulberile obținute au fost adăugate într-un gel de collagen, obținându-se astfel compușii Zn:HAp-CBc cu următoarele rapoarte: 0:1, referința de collagen, 4:1 Zn:HAp-CBc_4, 1:1 Zn:HAp-CBc_1 și 1:0, referința de Zn:HAp, care au fost supuse procesului de reticulare, iar compozitele de gel obținute au fost liofilizate, rezultând în final compozite poroase 3D, utilizate ca materiale în regenerarea osoasă.

5

7

9

(51) Int.Cl.

A61F 2/28 (2006.01),

A61L 27/12 (2006.01)

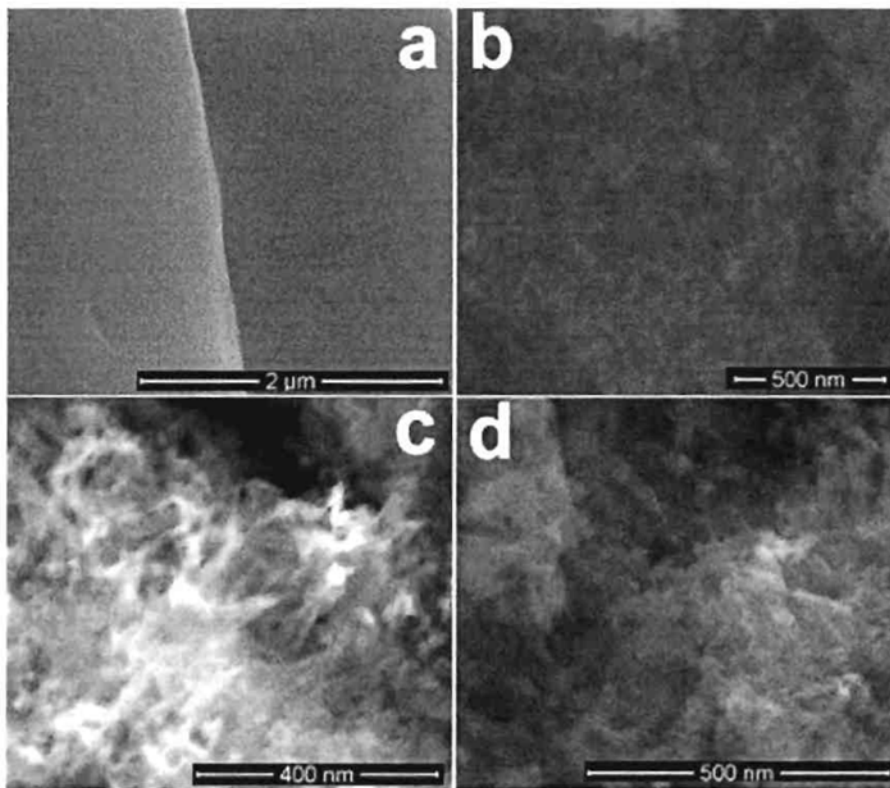


Fig. 1

(51) Int.Cl.

A61F 2/28 (2006.01);

A61L 27/12 (2006.01)

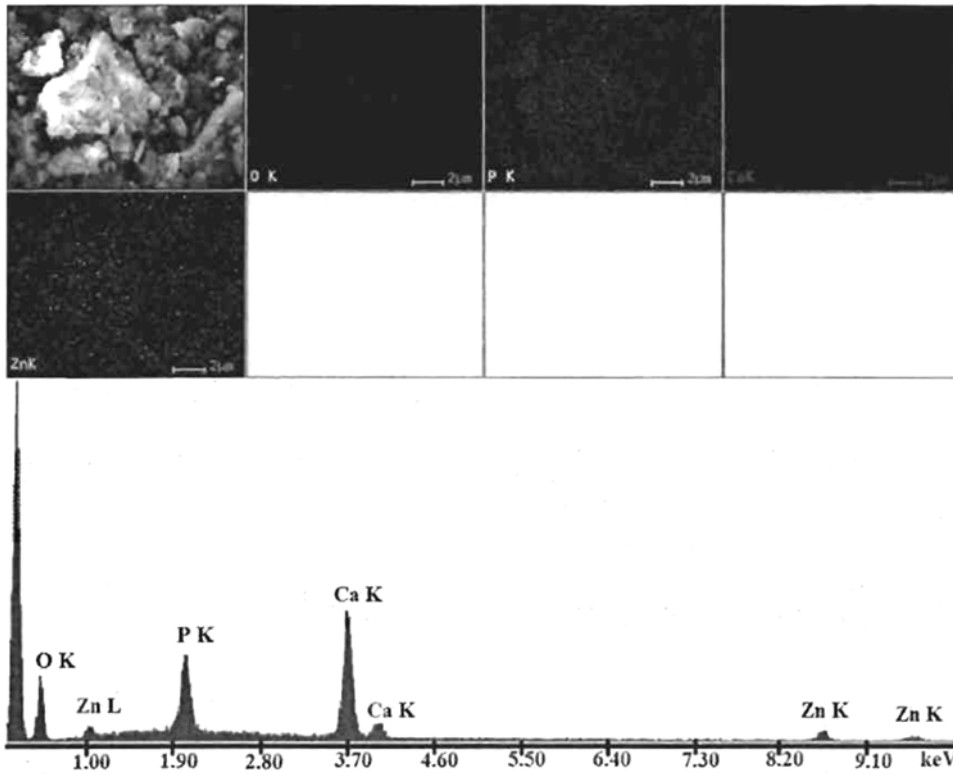


Fig. 2

(51) Int.Cl.

A61F 2/28^(2006.01),

A61L 27/12^(2006.01)

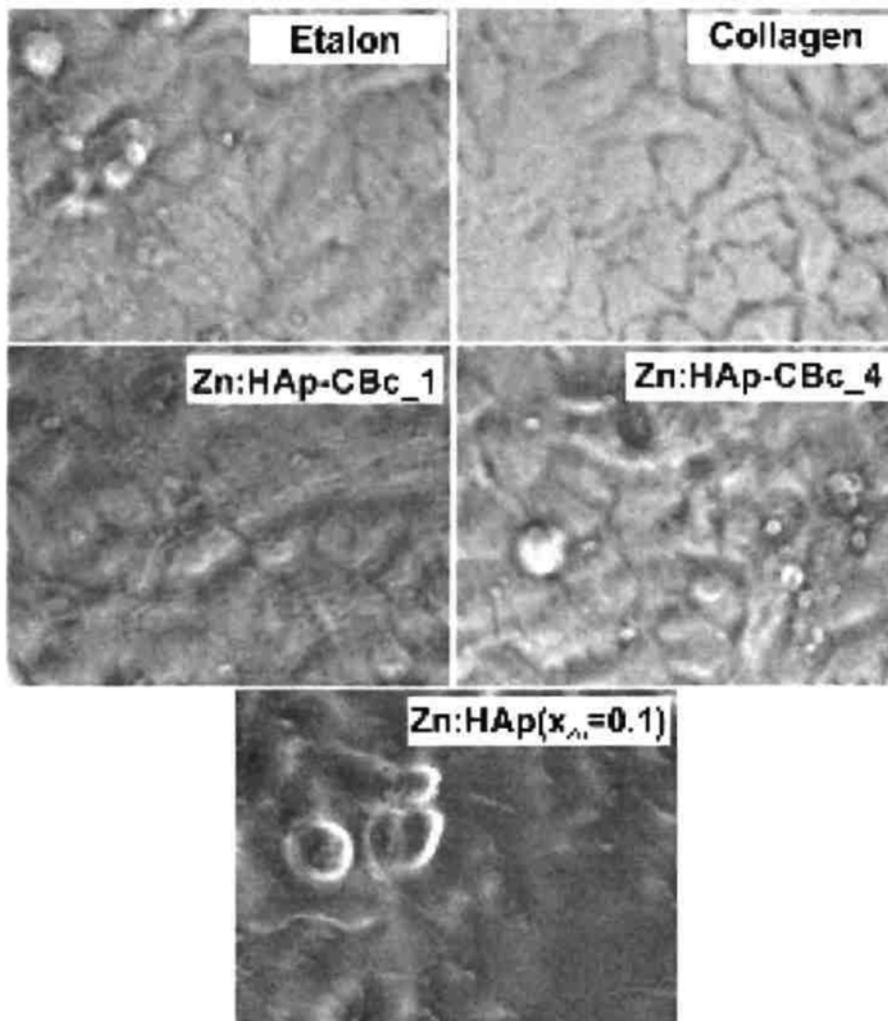


Fig. 3

(51) Int.Cl.

A61F 2/28 (2006.01);

A61L 27/12 (2006.01)

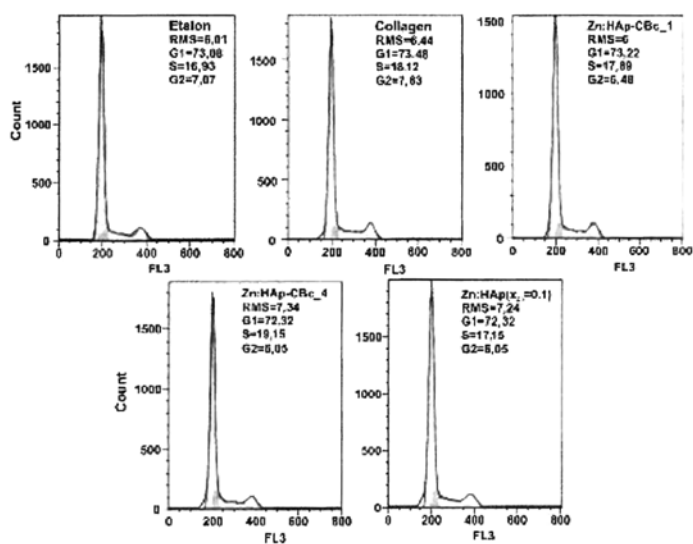


Fig. 4



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM
Tipărit la Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci
sub comanda nr. 549/2021