

(19) REPUBLIKA SRBIJA

(12) Patentni spis

(11) 49697 B



(51) Int. Cl.⁷ A 61 F 2/28
A 61 L 27/00

ZAVOD ZA
INTELEKTUALNU SVOJINU
BEOGRAD

(21) Broj prijave: **P-491/98**
(22) Datum podnošenja prijave: **03.11.1998.**
(43) Datum objavljivanja prijave: **18.03.2002.**
(45) Datum objavljivanja patenta: **31.12.2007.**
(30) Međunarodno pravo prvenstva:
(61) Dopunski patent uz osnovni
patent broj:
(62) Izdvojen patent iz prvobitne
prijave broj:

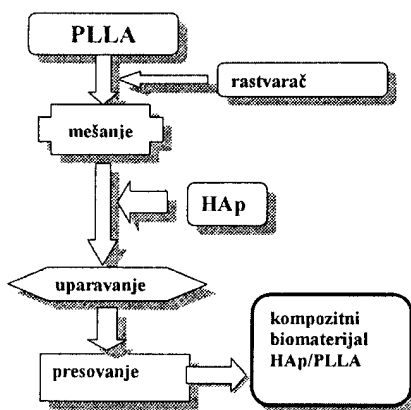
(73) Nosioci patenta:
USKOKOVIĆ DRAGAN
Milana Rakića 28;
PLAVŠIĆ MILENKO
Račkog 6;
IGNJATOVIĆ NENAD
Sarajevska 5/15, 11000 Beograd, RS
(72) Pronalazači:
Uskoković D.;
Plavšić M.;
Ignjatović N.
(74) Zastupnik:

(54) Naziv: **NOV POSTUPAK DOBIJANJA BLOKOVA**
KOMPOZITNOG BIOMATERIJALA
HIDROKSIAPATIT/POLI-L-LAKTID ZA
REPARACIJU KOŠTANOG TKIVA

(51) Int. Cl.⁷ A 61 F 2/28
A 61 L 27/00

(57) Apstrakt:

Prikazan je postupak dobijanja kompozitnog biomaterijala hidroksiapatiti/poli-L-laktid iz hidroksiapatita (HAp) veličina čestica od 0,001 do 1,5 mm i poli-l-laktida (PLLA) molekulskih masa od 47 000 – 450 000 g/mol, koji se može koristiti za rekonstrukciju svih vrsta koštanih defekata. Nakon potpunog rastvaranja PLLA i mešanja sa HAp materijal se podvrgava vakuum uparavanju. Konačan proizvod se dobija toplim i hladnim presovanjem na različitim temperaturama, pritiscima i vremenima.



RS 49697 B

Ovaj pronalazak spada u oblast tehnologije specijalnih materijala, preciznije kompozitnih materijala za primenu u medicini i stomatologiji. Pronalazkom je obuhvaćena metoda dobijanja kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA iz hidroksiapatita (HAp) i poli-l-laktida (PLLA), pogodnog za reparaciju koštanog tkiva i prema Međunarodnoj klasifikaciji патената nosi sledeće oznake: A 61 F, 2/28 i A 61 L, 27/00.

TEHNIČKI PROBLEM

Tehnički problem u ovom predmetu predstavlja obezbeđivanje tehnološkog procesa za dobijanje poroznih i neporoznih blokova kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA iz HAp i PLLA, pogodnog za reparaciju koštanog tkiva. Tehnološki postupak omogućava dobijanje blokova sa definisanom kompresionom čvrstoćom i poroznošću. Ovakav materijal može se široko upotrebiti kao supstituent koštanom tkivu zbog svojih osteoinduktivnih, biokompatibilnih i netoksičnih osobina. Materijal dobijen ovim tehnološkim postupkom nema ograničenja u obliku i dimenzijama.

STANJE TEHNIKE

Pregledom literaturnih podataka može se videti da je bioaktivna keramika kalcijum-hidroksiapatit (HAp) našla široku primenu u obliku praha i granula u medicini i stomatologiji za

reparaciju koštanih defekata (Kurashina K., Kurita H., Takeuchi H., Hirano M., Klein C.P.A.T. and de Groot K., Osteogenesis in muscle with composite graft of hydroxyapatite and autogenous calvarial periosteum: a preliminary report, *Biomaterials* (1995), **16**, 119-123). Po svom hemijskom sastavu HAp je vrlo sličan neorganskom sastavu koštanog tkiva sisara (Katz, J. L. and Harper, R. A., Calcium phosphates and apatites. In *Encyclopedia of Materials Science and Engineering*, Editor-in-Chief M. B. Bever, Pergamon Press, Oxford, 1986, 475-476). HAp se takođe uspešno koristi u maksilofacijalnoj i traumatološkoj hirurgiji na mestima koja ne podležu velikim opterećenjima kao implantat. Njegova loša mehanička svojstva poboljšavaju se ojačavanjem granula HAp različitim polimerima. Moguće je koristiti bioresorbilne i bioneresorbilne polimere kao matricu (Hench, L., *Bioceramics: From Concept to Clinic. J. Am. Ceram. Soc.*, 1991, **74**, 1487-510, Lu, L. and Mikos, A., The importance of new processing techniques in tissue engineering. *MRS Bulletin*, 1996, **21**, 28-32). Korišćenje biokompatibilnih polimera u obliku vlakana sa definisanom orijentacijom iskorišćeno je za izradu veštačkih kukova (European patent, 0 277 727 A1, Orthopedic device of biocompatible polymer with oriented fiber reinforcement). Polimer poli-l-laktid (PLLA) kao krajnje produkte degradacionog procesa daje CO₂ i H₂O koji su netoksični i vrlo lako ulaze u metabolizam organizma bez štetnih efekata (Hench, L., *Bioceramics: From Concept to Clinic. J. Am. Ceram. Soc.*, 1991, **74**, 1487-510). Zbog ovakvih osobina PLLA je našao široku primenu u medicini i stomatologiji kao materijal za reparaciju koštanog tkiva (Internacional patent, WO 89/04646, Bone repair material and delayed drug delivery). Moguće je napraviti biodegradabilne 3 – dimenzione matrikse od PLLA koji se koriste u procesima regeneracije koštanog tkiva (Internacional patent, WO 95/03011, Bone regeneration templates; Internacional patent, WO 92/10218, Implantable bioabsorbable article). Kompozitni biomaterijali sa polimernim matriksom dobijenim iz l-laktida i neorganskom fazom od prirodnog kalcijumkarbonata (morski koral) takođe se mogu koristiti za reparaciju koštanih defekata. U literaturi je poznat postupak dobijanja ovog kompozita sa različitim masenim udelima polimera i kalcijum karbonata (European patent, 0 564 369 A1,

Materiau pour prothese osseuse contenant des particules de carbonate de calcium dispersee dans une matrice polymere bioresorbable). U dosadašnjim postupcima dobijanja kompozitnog materijala HAp/PLLA korišćen je postupak mešanja monomera l-laktida sa HAp pre polimerizacije (Verheyen, C. C. P. M., Klein, C. P. A. T., de Blieck-Hogervorst, J. M. A., Wolke, J. G. C., van Blitterswijk, C. A. and de Groot, K., Evaluation of hydroxyapatite/poly(L-lactide) composites: physico-chemical properties. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, 1993, **4**, 58-65). Isti postupak je primenjen i kod dobijanja drugih kompozitnih biomaterijala sa PLLA (Rodrigues-Lorenzo, L., Salinas, A., Vallet-Regi, M. and San-Roman, J., Composite biomaterials based on ceramic polymers. I. Reinforced system based on Al_2O_3 /PMMA/PLLA. *Journal of Biomedical Materials Research*, 1996, **30**, 515-522). Nije međutim, poznato kako se ovakvim načinom sinteze mogu ostvariti željene fizičke, hemijske i biološke osobine kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA.

IZLAGANJE SUŠTINE PRONALAZKA

Ovaj pronalazak se odnosi na jednostavan postupak za dobijanje kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA iz HAp i PLLA. Postupak omogućava dizajniranje materijala u cilju dobijanja željene poroznosti i kompresione čvrstoće.

Dimenzije i oblik blokova diktirane su dimenzijama i oblikom kalupa u kome se obavlja presovanje i one su bez ograničenja. Postupak omogućava da se variranjem parametara presovanja dobijaju blokovi različitih svojstava (poroznosti i kompresione čvrstoće). Takođe je ovim postupkom omogućeno korišćenje PLLA bez ograničenja molskih masa i stepena kristaliničnosti. Izborom PLLA sa unapred definisanom molskom masom i stepenom kristaliničnosti može se programirati njegova biološka aktivnost, neovaskularizacija kao i stvaranje novog koštanog tkiva. Postupak omogućava da se sa masenim udelom rastvarača u HAp/PLLA tokom presovanja može ostvariti željena poroznost kao i raspored pora u biomaterijalu.

KRATAK OPIS SLIKA I NACRTA

Slika 1 prikazuje opštu šemu dobijanja kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA.

Slika 2 prikazuje skenirajuću elektronsku mikroskopiju mikrostrukture kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA koji je dobijen u primeru 1.

Kvalitativan sastav se ispituje X-ray (XRD) i FT-IR spektroskopijom. U oba slučaja može se primeniti metoda analize praha. Sastav HAp/PLLA ispitan je metodom praha.

Slika 3 prikazuje X-ray kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA.

Položaji difrakcionih maksimuma mereni su na vrhu svakog pika. Snop X zraka je CuK-Ni filtriran na talasnu dužinu 0,1542 nm, a brzina snimanja iznosila je 0,2 °/min. Analiza je vršena za uglove od 4-90°. Prilikom X-ray analize koriste se JCPDS 34-0010 i JCPDS 9-0432 tablice na osnovu kojih se tumači dobijeni difraktogram a dobijeni pikovi označe se kojim fazama pripadaju. Kao što je ranije naznačeno kompozit je sačinjen od HAp-a i polimera PLLA. Nakon mešanja HAp-a i polimera za očekivati je da spektri budu sačinjeni od zbira spektara HAp-a i polimera. Kao što se i uočava sa slike spektar kompozitnog biomaterijala sačinjen je od zbira spektara HAp-a i PLLA. Najintenzivniji pikovi HAp-a i PLLA su označeni na slici.

Slika 4 prikazuje FT-IR spektar kompozitnog biomaterijala.

Kao što je i očekivano na ovoj slici se uočavaju spektri grupa HAp-a i PLLA. Na istoj slici se ne uočavaju grupe bilo kojih drugih jedinjenja. Apsorpcione trake na 3572 cm⁻¹ i 631 cm⁻¹ pripadaju OH grupi HAp. Apsorpcione trake na 1090, 1050, 602 and 572 cm⁻¹ pripadaju fosfornoj grupi iz HAp. Karakteristične apsorpcione trake na 1760 cm⁻¹ i 2920 cm⁻¹ pripadaju strečing vibracijama C=O i C-H grupa PLLA.

Slika 5 prikazuje EDXRF spektar kompozitnog biomaterijala.

Sadržaj teških metala u kompozitnom biomaterijalu na osnovu EDXRF analize je neznatan i ispod 50 ppm-a. Prema zahtevima FDA i Evropskim standardima ISO, sadržaj teških

metala u biomaterijalima ne sme prelaziti 50 ppm-a. Na prikazanoj slici 5 su pikovi teških metala beznačajni (nema ih).

DETALJAN OPIS PRONALAZKA

Kompozitni biomaterijal se dobija dvostepenim tehnološkim postupkom.

U prvom stepenu se dobija visoko porozni kompozitni biomaterijal HAp/PLLA koji se zatim u drugom stepenu dizajnira presovanjem. Polazne komponente za dobijanje kompozitnog biomaterijala su HAp i PLLA. Može se koristiti HAp različitih veličina od nano čestica veličine 0,001 do 1,5 mm. Takođe se kao polazna komponenta može koristiti polimer PLLA različitih molekulskih masa od 47000 do 450000 g/mol-u.

U prvom stepenu se najpre potpuno rastvori dobro osušeni PLLA. Naročito su pogodni rastvarači benzen, metilen hlorid i hloroform. Rastvaranje PLLA odvija se na temperaturi od 20°C pri mešanju propelerskom mešalicom od 50-100 obr/minu u toku 1 do 5 časova. U rastvoreni PLLA dodaju se granule HAp u različitim masenim odnosima od 10-90 %, što zavisi od željenog mesta primene. Materijal se zatim podvrgava vakuum uparavanju na temperaturi od 20 - 60°C i pritisku od 1 - 10 Pa u toku 1 – 5 časova. Ovim postupkom je završen prvi stepen.

Dobijeni visoko porozni kompozitni biomaterijal HAp/PLLA dalje se dizajnira hladnim i toplim presovanjem što predstavlja drugi stepen. Parametri presovanja: temperatura, pritisak i vreme presovanja se mogu menjati i oni direktno utiču na svojstva krajnjeg proizvoda. U zavisnosti kakva svojstva biomaterijala želimo, primenićemo odgovarajuće uslove dobijanja koji su prikazani u sledećim primerima. Može se primeniti temperatura presovanja od 20 - 184°C, pritisak od 98,10 MPa i vreme presovanja od 1 – 60 minuta.

Postupak omogućava dobijanje materijala sa poroznošću i kompresionom čvrstoćom koja je bliska svojstvima prirodnog koštanog tkiva, što do sada nije drugim postupcima ostvareno. Postupkom toplog presovanja mogu se dobiti blokovi kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA koji poseduju poroznost od 42% do 0,4% i kompresionu čvrstoću od 19 do 90 MPa.

Primer 1

U dobro osušen PLLA molekulske mase 400 000-450 000 g/mol dokapava se hloroform na temperaturi od 20°C do masenog odnosa hloroform : PLLA, 1:10 respektivno. Nakon dodate celokupne količine hloroforma rastvor se meša propellerskom mešalicom 100 obr/min u toku 5 časova. Rastvoru PLLA dodaju se granule HAp veličine 1 mm u masenom odnosu HAp : PLLA, 80 : 20. Materijal se meša sa 50 obr/min u toku 1 časa a zatim podvrgava vakuum uparavanju na temperaturi od 50°C i pritisku od 5 Pa u toku 1 časa.

Dobijeni proizvod poseduje mikrostrukturu prikazanu na slici 2.

Kvalitativan sastav dobijenog materijala analiziran je rendgenskom difrakcijom i infracrvenom spektroskopijom koje su prikazane na slikama 3 i 4. Sadržaj teških metala analiziran je EDXRF tehnikom, a dobijeni rezultati prikazani su na slici 5.

Primer 2

Postupa se isto kao u primeru 1, s tim što se dobijeni materijal presuje u cilindričnom kalupu željenih dimenzija na pritisku 98,10 MPa , temperaturi 20°C u toku 20 minuta. Dobijeni materijal poseduje kompresionu čvrstoću od 19 MPa i poroznost od 38%.

Primer 3

Postupa se isto kao u primeru 1, s tim što se dobijeni materijal presuje u cilindričnom kalupu željenih dimenzija na pritisku 98,10 MPa , temperaturi 80°C u toku 15 minuta. Dobijeni materijal poseduje kompresionu čvrstoću od 36 MPa i poroznost od 22%.

Primer 4

Postupa se isto kao u primeru 1, s tim što se dobijeni materijal presuje u cilindričnom kalupu željenih dimenzija na pritisku 98,10 MPa , temperaturi 130°C u toku 15 minuta. Dobijeni

49697 B

materijal poseduje kompresionu čvrstoću od 45 MPa i poroznost od 15%.

Primer 5

Postupa se isto kao u primeru 1, s tim što se dobijeni materijal presuje u cilindričnom kalupu željenih dimenzija na pritisku 98,10 MPa , temperaturi 160°C u toku 15 minuta. Dobijeni materijal poseduje kompresionu čvrstoću od 46 MPa i poroznost od 10%.

Primer 6

Postupa se isto kao u primeru 1, s tim što se dobijeni materijal presuje u cilindričnom kalupu željenih dimenzija na pritisku 98,10 MPa , temperaturi 184°C u toku 15 minuta. Dobijeni materijal poseduje kompresionu čvrstoću od 70 MPa i poroznost od 4%.

Primer 7

Postupa se isto kao u primeru 1, s tim što se dobijeni materijal presuje u cilindričnom kalupu željenih dimenzija na pritisku 98,10 MPa , temperaturi 184°C u toku 30 minuta. Dobijeni materijal poseduje kompresionu čvrstoću od 90 MPa i poroznost od 0,4%.

Primer 8

Postupa se isto kao u primeru 1, s tim što se umesto PLLA molekulske mase 400 000 - 450 000 g/mol koristi PLLA molekulske mase 200 000 – 230 000 g/mol. Postupak rastvaranja PLLA i dodavanja HAp je isti kao u primeru 1. Materijal se zatim podvrgava vakuum uparavanju na temperaturi od 50°C i pritisku od 1 Pa u toku 30minuta.

Kompozitnom biomaterijalu dodaje se 30 mas% hloroforma. Nakon 1 časa neprekidnog mešanja materijal koji je u pastastom stanju se presuje na sobnoj temperaturi, pritisku od 49,05 MPa u toku 5 minuta. Ovako oblikovani materijal se suši u kondicioniranoj sušnici na 65 % relativne vlažnosti, temperaturi 50°C u toku 4 časa. Dobijeni materijal poseduje kompresionu

čvrstoću od 30 MPa i poroznost od 21 %.

Primer 9

Postupa se isto kao u primeru 8, s tim što se biomaterijalu dodaje 60 mas% hloroforma. Nakon 1,5 časa neprekidnog mešanja materijalu koji je u pastatstom stanju definiše se oblik utiskivanjem biomaterijala u kalup željenih dimenyija i oblika. Ovako dobijeni materijal se suši u kondicioniranoj sušnici na 65% relativne vlažnosti, temperaturi 60 °C u toku 8 časova. Dobijeni materijal poseduje kompresionu čvrstoću od 14 MPa i poroznost od 42 %.

Primer 10

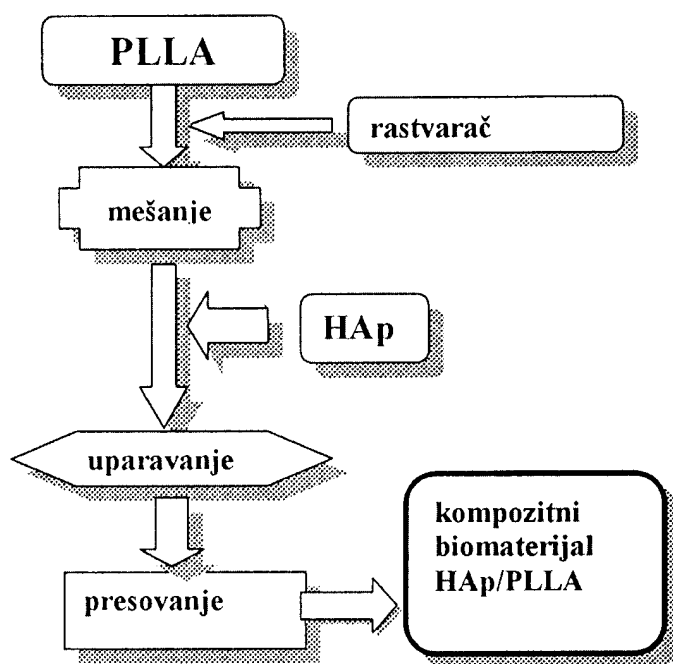
Smeša od 50 mas% PLLA molske mase 400 0000 – 450 000 g/mol i 50 mas% PLLA molske mase 47 000 – 52 000 g/mol potpuno se rastvori hloroformom na 20°C i meša propellerskom mešalicom 60 obr/min u toku 3 časa. Maseni odnos hloroform : PLLA je 1: 10, respektivno. Rastvoru PLLA dodaju se granule HAp veličine 1 mm u masenom odnosu HAp : PLLA, 80 : 20. Materijal se meša sa 50 obr/min u toku 1 časa a zatim podvrgava vakuum uparavanju na temperaturi od 30°C i pritisku od 1 Pa u toku 1 časa. Dobijeni kompozitni biomaterijal se presuje u cilindričnom kalupu željenih dimenzija na pritisku 98,10 MPa , temperaturi 184°C u toku 15 minuta. Dobijeni materijal poseduje kompresionu čvrstoću od 60 MPa i poroznost od 3%.

Primer 11

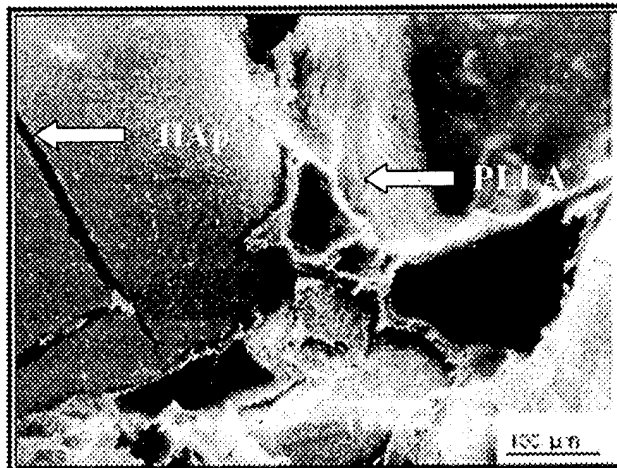
Čestice HAp veličine 0,001-0,1 mm mešaju se sa PLLA molske mase 50000-430000 g/mol, sa masenim udelom HAp od 25-95% u kompozitu, koji je predhodno potpuno rastvoren kao u primeru 1. Mešanje se vrši u toku 0,1-1 časa propellerskom mešalicom sa 50-100 obr/min na temperaturi 20 °C. Ovako pripremljeni kompozitni premaz može se nanositi u slojevima na razne metalne, keramičke i polimerne podloge. Sušenje nanetih slojeva se odvija na temperaturama od 20-60 °C u toku 4-24 časa, pri uslovima relativne vlažnosti od 30-80%.

PATENTNI ZAHTEV

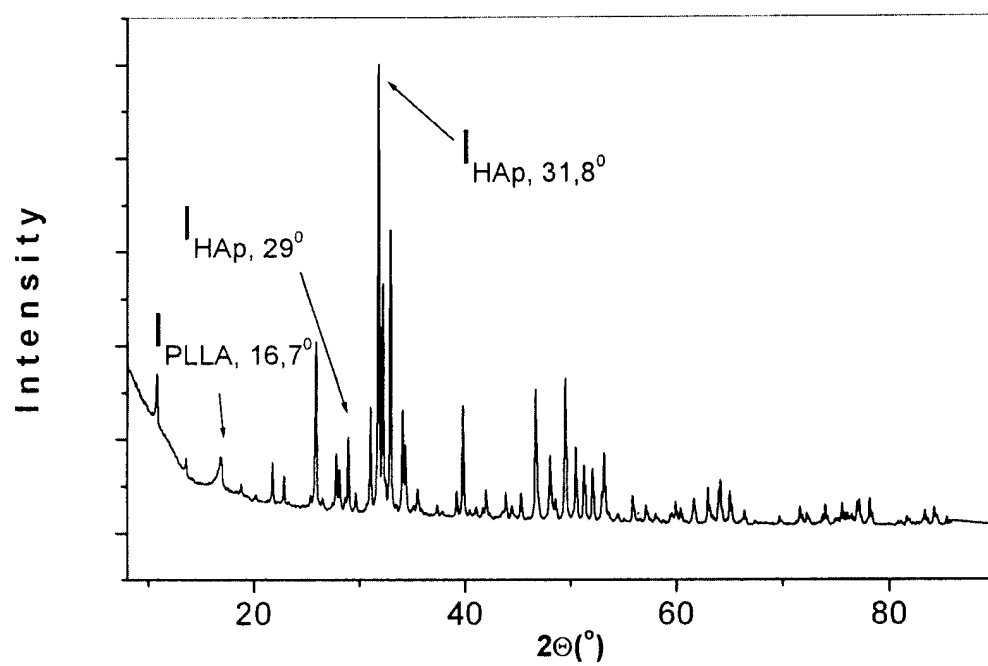
1. Postupak za dobijanje kompozitnog biomaterijala hidroksiapatit/poli-L-laktid iz hidroksiapatita i poli-L-laktida , **naznačen time**, što se u poli-L-laktid molekulskih masa od 47000 do 450000 g/mol rastvara rastvaračem koji može biti benzen, metilen hlorid ili hloroform u masenom odnosu 1 : 10 uz mešanje od 1- 6 časova pri brzini od 50 – 100 obr/min, nakon čega mu se uz mešanje dodaje hidroksiapatit veličine čestica od 0,001 – 1,5 mm u odnosu od 10 – 90 mas%, a zatim podvrgava vakuum uparavanju na pritisku 1 – 10 Pa i temperaturi od 20 – 60 °C u toku 1 – 5 časova i dizajnira presovanjem na temperaturi od 20 – 184 °C, pritisku od 98.10 MPa i vremenu presovanja od 1 – 60 minuta u kalupima željenih dimenzija i oblika.



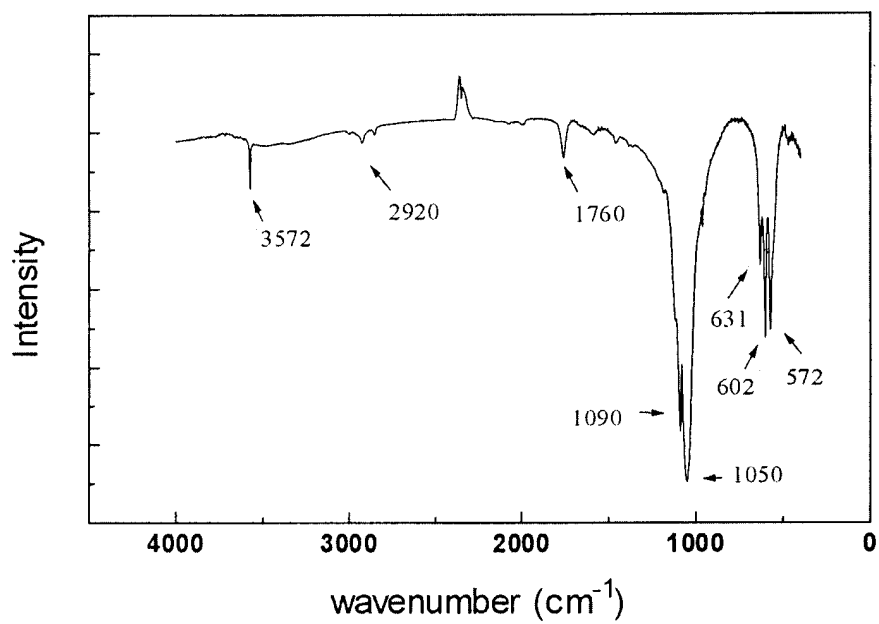
Slika 1. Šema dobijanja kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA



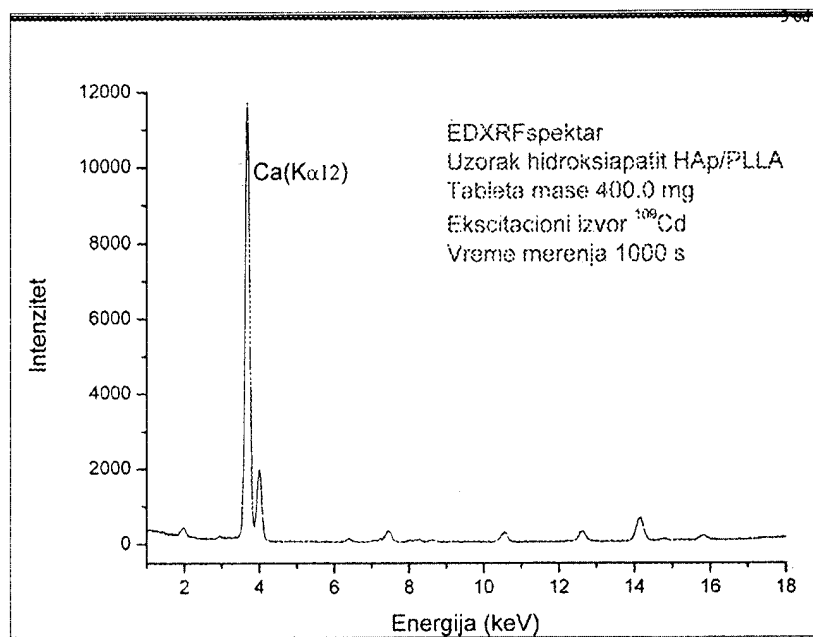
Slika 2. SEM prelomne površine kompozitnog biomaterijala iz primera 1



Slika 3. X-ray kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA



Slika 4. FT-IR kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA



Slika 5. EDXRF spektar kompozitnog biomaterijala HAp/PLLA