

(19) REPUBLIKA SRBIJA

(12) Patentni spis

(11) 51291 B



ZAVOD ZA
INTELEKTUALNU SVOJINU
BEOGRAD

(51) Int. Cl.
A 61 F 2/28 (2006.01)
A 61 L 27/00 (2006.01)
A 61 K 33/06 (2006.01)
A 61 K 31/765 (2006.01)

(21) Broj prijave: **P- 0109/2004**
(22) Datum podnošenja prijave: **04.02.2004.**
(43) Datum objavljivanja prijave: **17.08.2006.**
(45) Datum objavljivanja patenta: **31.12.2010.**
(30) Međunarodno pravo prvenstva:
YU 04.02.2004. P-109/04
(61) Dopunski patent uz osnovni
patent broj:
(62) Izdvojen patent iz prvobitne
prijave broj:

(73) Nosilac patenta:
INSTITUT TEHNIČKIH NAUKA SANU
Knez Mihailova 35/IV, 11000 Beograd, RS

(72) Pronalazači:
USKOKOVIĆ, Dragan;
IGNJATOVIĆ, Nenad

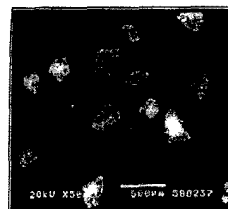
(74) Zastupnik:

(54) Naziv: **POSTUPAK DOBIJANJA**
GRANULA KOMPOZITNOG
BIOMATERIJALA KALCIJUM FOSFAT-
BIODEGRADABILNI POLIMER
(POLI(L-LAKTID) (LPLA) ILI POLI(DL-
LAKTID-KO-GLIKOLID) (DLPLG))

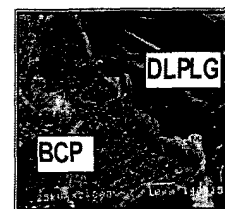
(51) Int. Cl.
A 61 F 2/28 (2006.01)
A 61 L 27/00 (2006.01)
A 61 K 33/06 (2006.01)
A 61 K 31/765 (2006.01)

(57) Apstrakt:

Postupak za dobijanje granula kompozitnog biomaterijala kalcijumfosfat/bioresorbilni polimer iz kalcijumfosfata i iz bioresorbilnog polimera. Kalcijum fosfat može biti kristalni kalcijumhidroksiapatit (HAp), bifazni kalcijumfosfat (BCP), trikalcijumfosfat (TCP), nekalcinisani kalcijumhidroksiapatit (amorfni kalcijumfosfat, ACP) kao i svi nestehiometrijski kalcijumhidroksiapatiti (sa deficitarnim sadržajem kalcijuma), a biodegradabilni polimer poli(L-laktid) ili poli(DL-laktide-ko-glikolid). Najpre se potpuno rastvori dobro osušeni polimer. U rastvoreni polimer dodaje se kalcijumfosfat u formi čestica različitih veličina. Rastvoru se zatim dodaje metanol (etanol, propanol, hidrogen ili destilovana voda) i smeša homogenizuje mešanjem.



a)



b)

RS 51291 B

OBLAST TEHNIKE NA KOJU SE ODNOSI PRONALAZAK

Ovaj pronalazak spada u oblast tehnologije specijalnih materijala, preciznije kompozitnih materijala za primenu u medicini i stomatologiji. Pronalazkom je obuhvaćena metoda dobijanja kompozitnog biomaterijala kalcijum fosfat/bioresorbilni polimer iz čestica kalcijumfosfata i iz bioresorbilnog polimera i prema Međunarodnoj klasifikaciji патената носи 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 kompozitnog biomaterijala kalcijumfosfat/bioresorbilni polimer u formi granula pogodnih za primenu u medicini i stomatologiji. Kalcijumfosfati koji su pogodni za korišćenje: kristalni kalcijumhidroksiapatit (HAp), bifazni kalcijumfosfat (BCP), trikalcijumfosfat (TCP), nekalcinisan kalcijumhidroksiapatit (amorfni kalcijumfosfat, ACP) kao i svi nestehiometrijski kalcijumhidroksiapatiti (sa deficitarnim sadržajem kalcijuma). Polimer koji je pogodan za korišćenje je poli(L-laktid) (LPLA) ili poli(DL-laktid-ko-glikolid) (DLPLG).

STANJE TEHNIKE

Hemisjski sintetisan, kalcijum fosfat po sastavu je vrlo sličan neorganskom sastavu prirodnog 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, 457-476). Najčešće ispitivani kalcijumhidroksiapatit (HAp) i ostali kalcijum fosfati se koriste, kao implanti u hirurgiji na mestima koja ne podležu velikim opterećenjima. Njegova niska mehanička svojstva poboljšavaju se ojačavanjem granula ili praha različitim polimerima. Mogu se koristiti bioneresorbilni ili bioresorbilni polimeri kao matriks ili kontinualna faza (PCT WO 89/04646, 1989, Bone repair material and delayed drug delivery, Hench L., Bioceramics: From concept to clinic, *J. Am. Ceram. Soc.*, 1991, 74, 1487-1510). Sintezom višekomponentnih materijala na bazi polimera i kalcijumhidroksiapatita dobijaju se kompoziti koji su pogodni za rekonstrukciju koštanog tkiva (C. Laurencin, J. Devin, M. Attawia, "Polymeric-hydroxyapatite bone composite", U.S. Patent, 5,766,618, 1998).

Polimeri na bazi laktida i glikola resorbuju se na netoksične produkte, koji se direktno metaboliziraju i kao krajnje produkte daju H₂O i CO₂. Ova vrsta bioresorbilnih polimera se zbog ovih svojstava široko koristi u medicini i stomatologiji, pogotovo u rekonstrukcijama koštanog tkiva (International Patent, WO 89/04646, Bone repair materijal and delayed drug delivery; Middleton J., Tipton A., Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices, *Biomaterials*, 2000, 21, 2335-2346). Polilaktid u visoko poroznoj formi korišćen je za rekonstrukciju tvrdog koštanog tkiva (International Patent, WO 95/03011, Bone regeneration templates; International Patent WO 92/10218, Implantable bioresorbable article).

Hidrolizom i toplim presovanjem na temperaturi od oko 70°C dobijen je kompozit sa hidroksiapatitom sa deficitarnim sadržajem kalcijuma (CDHAp) i polimerom poli(DL-laktid-ko-glikolid)-om (DLPLG). Različita mehanička svojstva ovog kompozita dobijena su varijacijom vremena

i temperature hidrolize (C. Durucan, P. Brown, "Calcium-deficient hydroxyapatite-DLPLG composites: Mechanical and microstructural investigation", J. Biomed. Mater. Res., 51 (2000) 726-734). Sličan tip kompozita, stim što je umesto sintetičkog korišćen prirodni hidroksiapatit dobijen je ekstruzijom. Kravlji hidroksiapatit (ossein) u smeši sa DLPLG-om ekstrudovan je a dobijeni kompozit pokazao je veći potencijal u sintezi osteoblastskih proteina naspram čistog DLPLG -a (L. Calandrelli, B. Immirzi, M. Malinconico, M. Volpe, A. Oliva, F. Ragione, "Preparation and characterization of composites based on biodegradable polymers for in vivo application", Polymer, 41 (2000) 8027-8033)

Posebno pogodna forma korišćenja biomaterijala za rekonstrukciju koštanog tkiva je u obliku granula ili punioca, što umnogome može da olakša i proširi njegovu primenu. Kao punioc u rekonstrukcijama koštanog tkiva u medicini i stomatologiji najviše se koriste kalcijumfosfati, ponajviše HAp. Jednostavnim postupkom mešanja kalcijumhidroksiapatite i organske komponente, karboksimetila dobijen je koštani punilac (A. Matsushima, M. Nakasu, T. Fukuhara, Prosthetic filler for a living body and method of manufacturing the prosthetic filler, US Patent Application, 20020169506, 2002). Kompozitni biomaterijali tipa bioaktivno staklo/bioresorbilni polimer sintetisani su novim čvrsto-uljno-vodenim procesiranjem. Ovim postupkom dobijen je kompozit bioaktivno staklo/polilaktid (ili poli(laktid-ko-glikolid)). Sinteza ove grupe kompozita pomoću trokomponentnog rastvarača čvrsto/ulje/voda (s/o/w) indukuje stvaranje kalcijumhidroksiapatita prilikom njegove aplikacije (P. Ducheyne, P. Ayaswamy, Q. Qui, Bioactive degradable composite for tissue engineering, US Patent: 6,328,990, 1999). Polialdehidi su korišćeni kao punioci pri rekonstrukciji tkiva u hirurgiji (Y. Umit, W. Stiven, B. Kirby, In situ bioprosthetic filler and methods, particularly for the in situ formation of vertebral disc bioprosthetics, US Patent Application, A1 20020049498, 2002). Posebnim postupkom sintetisan je kompozitni biomaterijal sastavljen od granula bifaznog kalcijumfosfata i poli(ϵ -kapralakton)-a. Korišćenjem kombinacije uparavanja rastvarača i postupka ekstrakcije rastvarača dobijene su granule bifaznog kalcijumfosfata veličina od oko 170 μm kao i granule poli(ϵ -

kapralakton)-a iste veličine. Ovim postupkom dobijena je smeša navedenih granula ponaosob (P. Iooss, A. Ray, G. Grimandi, G. Daculsi, C. Merle, "A new injectable bone substitute combining poly(ϵ -caprolactone) microparticles with biphasic calcium phosphate granules", *Biomaterials*, 22 (2002) 2785-2794)

Dobijanje kompozitnog biomaterijala kalcijumfosfat/bioresorbilni polimer ostvareno je postupkom potpunog rastvaranja polimera i naknadnog dodavanja čestica kalcijumfosfata u rastvor. Nakon mešanja, vakuumuparavanjem uklanja se rastvarač. U zavisnosti od korišćene molske mase polimera, kao krajnji produkt dobijena je visoko porozna masa kompozita u formi bloka. (N. Ignjatović, S. Tomić, M. Dakić, M. Miljković, M. Plavšić and D. Uskoković, "Synthesis and properties of hydroxyapatite/poly-L-lactide composite biomaterials", *Biomaterials*, 20 (1999) 809-816; N. Ignjatović, M. Plavšić, M. Miljković, Lj. Živković and D. Uskoković, "Microstructural characteristic of Ca-hydroxyapatite/poly-L-lactide based composites", *Journals of Microscopy*, 196 (1999) 243-248; N. Ignjatović, K. Delijić, M. Vukčević, D. Uskoković, "The designing of properties of calcium-hydroxyapatite/poly-lactide composite biomaterials by hot pressing", *Z. Metallkunde* 92, 2 (2001) 145-149). Visoko porozni kompozitni biomaterijal u formi bloka iskorišćen je kao osnova za naknadno oblaganje sa proteinskim komponentama, kao što je kolagen, koje se kao takve mogu koristiti u rekonstrukcijama koštanog tkiva (N. Ignjatović, M. Plavšić and D. Uskoković, "Composite biomaterial hydroxyapatite/poly-L-lactide (collagen) with poly-L-lactid differente molecular weigth", *Advanced Enginering Materials*, 2 (2000) 511-514).

IZLAGANJE SUŠTINE PRONALAZKA

Ovaj pronalazak se odnosi na postupak za dobijanje granula kompozitnog biomaterijala kalcijumfosfat/bioresorbilni polimer iz kalcijumfosfata i iz bioresorbilnog polimera. Kalcijum fosfat može biti kristalni kalcijumhidroksiapatit (HAp), bifazni kalcijumfosfat (BCP), trikalcijumfosfat

(TCP), nekalcinirani kalcijumhidroksiapatit (amorfni kalcijumfosfat, ACP) kao i svi nestehiometrijski kalcijumhidroksiapatiti (sa deficitarnim sadržajem kalcijuma), a biodegradabilni polimer poli(L-laktid) (LPLA) ili poli(DL-laktide-ko-glikolid) (DLPLG). Veličinom čestica kalcijumfosfata može se uticati na krajnju veličinu kompozitnih granula, a masenim udelom polimera na debljinu polimernog sloja oko čestica kalcijumfosfata.

KRATAK OPIS SLIKA I NACRTA

Na slici 1 prikazana je skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM) čestica bifaznog kalcijum fosfata obloženih polimerom. Na slici 1a uočavaju se granule loptastog oblika. Čestice BCP-a obložene su polimerom. Ovakva forma kompozitnog biomaterijala omogućava njegovu aplikaciju u vidu punioca (filler-a), što može u nekim slučajevima biti optimalno. Detalj površine loptaste granule prikazan je na slici 1b gde se uočava deo čestice BCP-a obložen polimerom DLPLG kao i to da u međusloju BCP-DLPLG postoji slaba adhezija faza, kao posledica nepostojanja jačih veza u međusloju.

DETALJAN OPIS PRONALAZKA

Najpre se potpuno rastvori dobro osušeni polimer. Naročito su pogodni rastvarači metilenhlorid, tetrahidrofuran, etilacetat, hloroform, heksafluoroisopropanol i aceton. Rastvaranje polimera odvija se na temperaturi 15-65 °C pri mešanju sa mešalicom od 20-900 obr/min i koncentracijama od 0,05-30%. U rastvoreni polimer dodaje se kalcijumfosfat u masenim odnosima od 5-90%. Veličina čestica kalcijumfosfata može biti od 0,1 μ m-1,5 mm. U rastvor se zatim dodaje metanol (etanol, propanol, hidrogen ili destilovana voda) u masenom odnosu od 1-100%. Smeša se zatim meša na temperaturama

od 15-60 °C brzinama od 20-800 obr/min u toku 0,1-7 časova. Ovako dobijene granule kompozitnog biomaterijala se separišu odvajanjem.

Primer 1

U dobro osušeni poli(DL-laktid-ko-glikolid) (inherentne viskoznosti od 0,15-1,10 dl/g i sa odnosima laktida prema glikolu od 15:85 do 85:15) dodaje se metilenhlorid na temperaturi od 35 °C do masenog udela od 95% pri mešanju propelerskom mešalicom 200 obr/min u toku 1 sata. Rastvoru se dodaju čestice bifaznog kalcijumfosfata veličine od 160-300 µm. Odnos bifaznog kalcijumfosfata prema poli(DL-laktid-ko-glikolid)-u je 80:20 respektivno. U suspenziju se zatim doda 2% etanola na ukupnu količinu i suspenzija nastavi da meša još 1h. Formiraju se dva sloja, rastvorni i nerastvorni. Nakon dekantovanja rastvornog sloja, u donjem delu ostaje kompozitni biomaterijal bifazni kalcijumfosfat/poli(DL-laktid-ko-glikolid) u formi granula. Na slici 1 prikazana je skenirajuća elektronska mikroskopija a) granula i b) dela granule ovako dobijenog kompozitnog biomaterijala pogodnog za primenu kao fillera u rekonstrukcijama koštanog tkiva.

Primer 2

Postupa se isto kao u primeru 1, s tim što se kao kalcijum fosfat koristi kalcijumhidroksiapatit (HAp) a kao polimer poli(DL-laktid-ko-glikolid).

Primer 3

Postupa se isto kao u primeru 1, s tim što se kao kalcijum fosfat koristi nekalcinisan kalcijumhidroksiapatit (amorfn kalcijumfosfat, ACP) a kao polimer poli(DL-laktid-ko-glikolid).

Primer 4

Postupa se isto kao u primeru 1, s tim što se kao kalcijum fosfat koristi nestehiometrijski kalcijumhidroksiapatiti (sa deficitarnim sadržajem kalcijuma) a kao polimer poli(DL-laktid-ko-glikolid).

Primer 5

U dobro osušeni poli(DL-laktid-ko-glikolid) (inherentne viskoznosti od 0,15-1,10 dl/g i sa odnosima laktida prema glikolu od 15:85 do 85:15) dodaje se tetrahidrofurana na temperaturi od 20 °C do masenog udela od 90% pri mešanju propellerskom mešalicom 300 obr/min u toku 1 sata. Rastvoru se dodaju čestice bifaznog kalcijumfosfata veličine od 300-500 µm. Odnos bifaznog kalcijumfosfata prema polimeru je 70:30 respektivno. U suspenziju se zatim doda 10% metanola na ukupnu količinu i suspenzija nastavi da meša još 1h. Formiraju se dva sloja, rastvorni i nerastvorni. Nakon dekantovanja rastvornog sloja, u donjem delu ostaje kompozitni biomaterijal bifazni kalcijumfosfat/ poli(DL-laktid-ko-glikolid) u formi granula.

Primer 6

Postupa se isto kao u primeru 5, s tim što se kao kalcijum fosfat koristi nestehiometrijski kalcijumhidroksiapatiti (sa deficitarnim sadržajem kalcijuma) a kao polimer poli(DL-laktid-ko-glikolid) Umesto tetrahidrofurana koristi se etilacetat.

Primer 7

Postupa se isto kao u primeru 5, s tim što se kao kalcijum fosfat koristi nekalcinirani kalcijumhidroksiapatit (amorfni kalcijumfosfat, ACP) veličina čestica od 1,0 μm a kao polimer poli(DL-laktid-ko-glikolid). Umesto tetrahidrofurana koristi se heksafluoroisopropanol.

Primer 8

Postupa se isto kao u primeru 5, s tim što se kao kalcijum fosfat koristi trikalcijumfosfat (TCP) veličina čestica od 0,500 μm .

Primer 9

Postupa se isto kao u primeru 5, s tim što se kao kalcijum fosfat koristi kalcijumhidroksiapatit (HAp) veličina čestica od 200-700 μm a kao polimer poli(L-laktid).

Primer 10

U dobro osušeni poli(L-laktid) (inherentne viskoznosti od 0,15-2,90 dl/g) dodaje se hloroform na temperaturi od 20 °C do masenog udela od 70% pri mešanju propelerskom mešalicom 100 obr/min u toku 2 sata. Rastvoru se dodaju čestice bifaznog kalcijumfosfata veličine od 300-800 μm . Odnos bifaznog kalcijumfosfata prema poly(L-lactid)-u je 75:25 respektivno. U suspenziju se zatim doda 2% etanola na ukupnu količinu i suspenzija nastavi da meša još 2h. Formiraju se dva sloja, rastvorni i

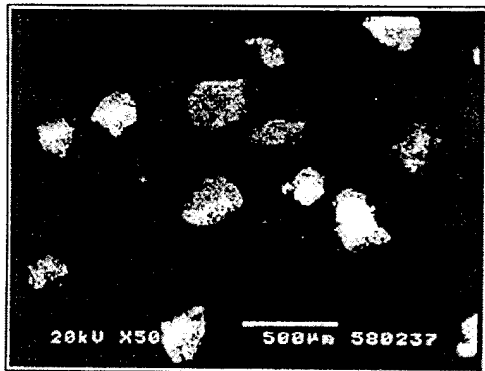
nerastvorni. Nakon dekantovanja rastvornog sloja, u donjem delu ostaje kompozitni biomaterijal bifazni kalcijumfosfat/poli(L-laktid) u formi granula.

Primer 11

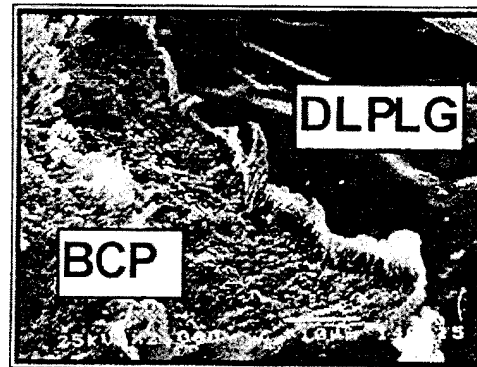
Postupa se isto kao u primeru 11, s tim što se kao kalcijum fosfat koristi kalcijumhidroksiapatit (HAp) veličina čestica od 300 μm a kao polimer poli(L-laktid).

PATENTNI ZAHTEV

1. Postupak dobijanja granula kompozitnog biomaterijala sastavljenog od čestica biodegradabilnim polimerom poli(L-laktid)-om ili poli(D,L-laktid-ko-glikolid)-om obloženog kalcijum fosfata, **naznačen time**, što se bioresorbilni polimer rastvara rastvaračem koji može biti metilenhlorid, tetrahidrofuran, etilacetat, hloroform, heksafluoroisopropanol ili aceton u koncentraciji od 0,05-30 % uz mešanje na temperaturama od 15-65 °C pri brzinama od 20-900 obr/min u toku 0,1-5h, nakon čega se dodaju čestice kalcijumfosfata u masenom odnosu od 5-90% veličina od 0,1 μ m-1,5 mm a u tako dobijenu smešu dodaje metanol, etanol, propanol, hidrogen ili destilovana voda u masenom odnosu od 1-100% temperaturama od 15-60 °C, brzinama od 20-800 obr/min u toku 0,1-7 časova.



a)



b)

Slika 1. SEM kompozitnog biomaterijala BCP/DLPLG a) granule b) dela površine granule