

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202190142** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.04.14

(22) Дата подачи заявки
2019.06.27

(51) Int. Cl. *A61K 6/00* (2006.01)
A61K 6/033 (2006.01)
A61K 6/06 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)
A61K 8/00 (2006.01)

(54) СТАБИЛИЗИРОВАННЫЙ АМОРФНЫЙ ФОСФАТ КАЛЬЦИЯ, ДОПИРОВАННЫЙ ФТОРИД-ИОНАМИ, И СПОСОБ ЕГО ПОЛУЧЕНИЯ

(31) 102018000006753

(32) 2018.06.28

(33) IT

(86) PCT/EP2019/067188

(87) WO 2020/002517 2020.01.02

(71) Заявитель:

КУРАСЕПТ А.Д.С. С.Р.Л. (IT)

(72) Изобретатель:

Яфиско Микеле, Тампьеро Анна (IT)

(74) Представитель:

Фелицына С.Б. (RU)

(57) Изобретение относится к способу получения покрытых цитратом наночастиц аморфного фосфата кальция, который включает следующие стадии: 1) обеспечение первого раствора соли кальция и цитратной соли, где молярное отношение цитрат-иона к иону кальция находится в диапазоне от 1 до 2, таким образом, получая прозрачный первый раствор; 2) обеспечение второго раствора соли, способной давать фосфат-анион и карбонатную соль; 3) смешивание вместе первого и второго растворов при pH в диапазоне от 8 до 11; 4) осаждение наночастиц и 5) сушку наночастиц, полученных на стадии 4). Предпочтительным и выгодным образом изобретение предусматривает добавление фторидного соединения на стадии 2) с получением допированных фтором покрытых цитратом наночастиц фосфата кальция или агломерата наночастиц. Наночастицы/агломерат наночастиц по изобретению имеет специфическую удельную поверхность и диаметр, которые позволяют использовать их в качестве биоматериала для применения в стоматологии.

A1

202190142

202190142

A1

СТАБИЛИЗИРОВАННЫЙ АМОРФНЫЙ ФОСФАТ КАЛЬЦИЯ, ДОПИРОВАННЫЙ ФТОРИД-ИОНАМИ, И СПОСОБ ЕГО ПОЛУЧЕНИЯ

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение касается биоматериалов, используемых в медицине, предпочтительно в стоматологии. В частности, изобретение относится к частицам покрытого цитратом аморфного фосфата кальция, предпочтительно допированного фторид-ионами, и способу их получения. Изобретение также относится к применению частицы по изобретению в качестве биоматериала в медицине, предпочтительно в стоматологии в качестве биоматериала для реминерализации зубов и десенсибилизатора дентина.

Уровень техники

Аморфный фосфат кальция (АСР) является одной из наиболее важных фаз фосфата кальция (СаР) в науке о биоминерализации, а также в области биомедицинских материалов. АСР обнаруживается во многих биологических системах, особенно у примитивных организмов, в основном в качестве резервуара ионов Ca^{2+} и PO_4^{3-} . АСР представляет первую фазу, осаждаемую из перенасыщенного водного раствора, содержащего ионы Ca^{2+} и PO_4^{3-} , из-за его более низкой поверхностной энергии, чем поверхностная энергия гидроксиапатита (НА) и октакальцийфосфата (ОСР). АСР представляет собой минеральную фазу с ближним порядком, а не дальним порядком кристаллического вещества. Основной структурной единицей АСР, согласно предположению Беттса и Познера, является почти сферический кластер ионов, имеющий средний диаметр 9,5 нм, соответствующий химическому составу $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6$. Известно, что АСР является нестабильным материалом, который превращается в более термодинамически стабильные фазы СаР (например, НА и ОСР) в растворе, а также в сухом состоянии, вступая во взаимодействие с водой в атмосфере, тем самым очевидным образом обостряя проблему, связанную со стабильностью АСР при применении в качестве готового биоматериала.

В настоящее время АСР исследуют в отношении изготовления нескольких биоматериалов благодаря его превосходной биологической активности, высокой клеточной адгезии, адаптируемой биоразлагаемости и хорошей остеокондуктивности. АСР применяют, например, в изготовлении покрытий на металлических протезах, самоустанавливающихся цементах для инъекций и гибридных композитах с полимерами. АСР является особенно привлекательным материалом в стоматологии в качестве агентов, реминерализующих эмаль, благодаря его способности выделять значительное количество

ионов Ca^{2+} и PO_4^{3-} по сравнению с другой кристаллической фазой СаР. Эти агенты могут быть добавлены к реставрационным материалам или непосредственно нанесены на зубную поверхность для проникновения в подповерхностные поражения эмали. Было высказано предположение о том, что АСР является важной фазой-предшественником во время формирования минерализованной ткани. Таким образом, применение АСР может обеспечить стратегию биомиметической реминерализации путем имитации процессов биоминерализации, которые образуют новую минеральную фазу.

Деминерализация твердых тканей зуба (эмали и дентина) является основной причиной кариеса и гиперчувствительности дентина. Это вызвано низким уровнем pH среды, который, в свою очередь, имеет три основные причины: прием кислой пищи или напитков, наличие гастроэзофагеальной рефлюксной болезни или ацидогенная активность патогенной биопленки полости рта. Когда значение pH слюны падает ниже 5,5, начинает растворяться гидроксиапатит (НА), который является основным минеральным компонентом тканей зубов, составляющим 95 масс.% и 75 масс.% в эмали и дентине, соответственно.

Деминерализация является обратимым процессом, если поврежденная ткань подвергается воздействию среды полости рта, которая способствует реминерализации. Например, полости эмали, вызванные процессами деминерализации, естественным образом реминерализуются путем эпитаксиального роста остаточных кристаллов, действующих в качестве центров зародышеобразования, при этом слюна обеспечивает среду, перенасыщенную ионами Ca^{2+} и PO_4^{3-} относительно НА. Однако реминерализация эмали слюной редко достигается полностью, особенно когда имеется нарушение баланса фаз деминерализации/реминерализации по продолжительности и масштабу. Для того, чтобы эффективно повернуть вспять процесс деминерализации и усилить процесс реминерализации, может быть полезным использование внешнего источника, поставляющего ионы Ca^{2+} и PO_4^{3-} возможно в кристаллические повреждения и пустоты, для увеличения перенасыщения НА и получения чистого минерального прироста. Таким образом, несколько составов, содержащих различные формы СаР (т.е. НА, фторгидроксиапатит (ФНА), тетракальцийфосфат (ТТСР), бета-трикальцийфосфат (β -ТСР), АСР и т.д.), описаны в качестве заживляющих агентов для деминерализации эмали. Однако основной проблемой, связанной с нанесением кристаллической фазы СаР в полости рта для содействия реминерализации, является ее плохая растворимость, в частности, в присутствии фторид-ионов, таким образом, что ионы Ca^{2+} и PO_4^{3-} являются недоступными.

Согласно недавним сообщениям, цитрат играет ключевую двойную роль в

кристаллизации НА: управление путем роста через аморфный прекурсор и контроль размера наночастиц с помощью неклассического роста кристаллов по механизму ориентированной агрегации. Более того, фторид является наиболее широко используемым профилактическим агентом для уменьшения и предотвращения деминерализации эмали, оставаясь пока самым эффективным агентом для предотвращения кариеса. Считается, что фторид действует по двум различным механизмам: i) замена гидроксильных групп вновь образовавшегося НА, в результате чего образуется фторапатит $[FHA, Ca_5(PO_4)_3F]$, который менее растворим и, следовательно, более устойчив к воздействию кислоты, чем НА; ii) ингибирование метаболических и физиологических путей микроорганизмов в кариесогенной биопленке, которые продуцируют органические кислоты для деминерализации тканей зубов. Таким образом, первой целью настоящего изобретения является доставка Ca^{2+} , PO_4^{3-} и F^- в пораженные участки эмали, что приводит к улучшенному эффекту реминерализации и одновременно закупорке дентинных канальцев.

В WO2016/012452A1 описан способ получения допированных фторидом покрытых цитратом наночастиц аморфного фосфата кальция, которые можно применять в медицине и в продуктах для стоматологии, таких как жидкости для полоскания рта, зубные пасты, жевательные резинки, в качестве реминерализующего агента для эмали и дентина.

В частности, способ, описанный в настоящем документе, включает следующие стадии:

- получение раствора $CaCl_2$ при концентрации от 0,08 М до 0,12 М и цитрата натрия при концентрации от 0,35 М до 0,50 М;
- приготовление второго раствора, образованного Na_2HPO_4 при концентрации от 0,10 М до 0,15 М с 0,2 М Na_2CO_3 и фторидным соединением;
- смешивание при перемешивании двух растворов, полученных на предыдущих стадиях, в соотношении 1:1 об./об. при pH 8,3-8,7 (отрегулированное, например, с помощью HCl) и при комнатной температуре в течение периода времени, составляющего менее 2 минут;
- три последовательных цикла седиментации путем центрифугирования, удаления супернатанта и промывки осадка сверхчистой водой; и
- лиофилизацию влажного осадка.

Этот способ позволяет получить наночастицы, которые вызывают биологический ответ в клетках остеобластах, в частности, пролиферация клеток наблюдалась при различных концентрациях наночастиц, которые при этом являлись полностью биосовместимыми при контакте с клетками остеобластами.

Даже если наночастицы, описанные в WO2016/012452 оказались хорошим

биоматериалом, адаптированным для реминерализации эмали, все еще существует потребность в биоматериалах, которые являются эффективными и способны действовать в качестве реминерализующего агента за короткий период времени.

Сущность изобретения

Авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили способ получения покрытых цитратом наночастиц аморфного фосфата кальция, который включает следующие стадии:

1) обеспечение первого раствора соли кальция и цитратной соли, в котором молярное отношение цитрат-иона к иону кальция находится в диапазоне от 1 до 2, таким образом, получая прозрачный первый раствор;

2) обеспечение второго раствора соли, способной давать фосфат-анион и карбонатную соль;

3) смешивание вместе прозрачного первого раствора и второго раствора при pH в диапазоне от 8 до 11;

4) осаждение наночастиц; и

5) сушку наночастиц, полученных на стадии 4).

В способе по изобретению первый раствор является прозрачным до проведения стадии смешивания. Выражение «прозрачный первый раствор» означает, что первый раствор практически не содержит твердых частиц.

Предпочтительно стадия 5) представляет собой стадию лиофилизации.

В другом аспекте изобретение относится к покрытой цитратом наночастице аморфного фосфата кальция, которую можно получить с помощью способа в соответствии с изобретением, где стадия сушки 5) представляет собой стадию лиофилизации, при этом указанная наночастица характеризуется удельной поверхностью от $250 \text{ м}^2/\text{г}$ до $360 \text{ м}^2/\text{г}$, как измерено методом Брунауэра-Эммета-Теллера (BET) на основе адсорбции газа, и имеет морфологию округлой формы с диаметром в диапазоне от 30 до 80 нм, как измерено при помощи изображений, полученных методом просвечивающей электронной микроскопии (ТЕМ).

Таким образом, в первом варианте осуществления удельная поверхность наночастицы находится в диапазоне от $250 \text{ м}^2/\text{г}$ до $360 \text{ м}^2/\text{г}$, как измерено методом Брунауэра-Эммета-Теллера (BET) на основе адсорбции газа, с использованием порошкообразных образцов и Sorpty 1750 (Carlo Erba, Milan Italy), и указанная наночастица предпочтительно имеет морфологию округлой формы с диаметром в диапазоне от 30 нм до 80 нм. Все приборы, используемые для определения диаметра, являются приборами, способными обеспечить изображения просвечивающей электронной

микроскопии (ТЕМ).

Преимущественно стадия 5) представляет собой стадию сушки распылением.

В другом аспекте изобретение относится к покрытому цитратом агломерату наночастиц аморфного фосфата кальция, который может быть получен способом в соответствии с изобретением, в котором стадия сушки 5) представляет собой стадию сушки распылением, при этом указанный агломерат наночастиц характеризуется удельной поверхностью от $3 \text{ м}^2/\text{г}$ до $10 \text{ м}^2/\text{г}$, как измерено методом Брунауэра-Эммета-Теллера (BET) на основе адсорбции газа, и имеет сферическую форму с диаметром в диапазоне от 2 до 25 мкм, как измерено методом сканирующей электронной микроскопии (SEM).

Как будет очевидно также из приведенной ниже экспериментальной части, когда стадия 5) состоит из стадии сушки распылением, конечный продукт представляет собой агломерат наночастиц, соответствующий микрочастице, имеющей диаметр в диапазоне от 2 до 25 мкм. Таким образом, во втором варианте осуществления удельная поверхность агломерата наночастиц находится в диапазоне от $3 \text{ м}^2/\text{г}$ до $10 \text{ м}^2/\text{г}$, как измерено методом Брунауэра-Эммета-Теллера (BET) на основе адсорбции газа, с использованием порошкообразных образцов и Sorpty 1750 (Carlo Erba, Milan Italy), и указанный агломерат наночастиц имеет предпочтительно сферическую форму и диаметр в диапазоне от 2 до 25 мкм. Все приборы, используемые для определения диаметра, являются приборами для сканирующей электронной микроскопии (SEM).

В дополнительном и предпочтительном аспекте изобретение позволяет получить допированные фтором покрытые цитратом наночастицы аморфного фосфата кальция путем обеспечения добавления фторидного соединения во второй раствор на стадии 2).

Следовательно, в другом и предпочтительном аспекте изобретение относится к допированной фтором покрытой цитратом наночастице аморфного фосфата кальция, которую можно получить способом в соответствии с изобретением, который включает добавление фторидного соединения на стадии 2), где стадия сушки 5) представляет собой стадию лиофилизации, при этом указанная наночастица характеризуется удельной поверхностью от $250 \text{ м}^2/\text{г}$ до $370 \text{ м}^2/\text{г}$, как измерено методом Брунауэра-Эмметта-Теллера (BET) на основе адсорбции газа, и имеет морфологию округлой формы с диаметром в диапазоне от 30 до 80 нм, как измерено при помощи изображений, полученных методом просвечивающей электронной микроскопии (ТЕМ).

Таким образом, в первом варианте осуществления удельная поверхность допированной фтором покрытой цитратом наночастицы аморфного фосфата кальция находится в диапазоне от $250 \text{ м}^2/\text{г}$ до $370 \text{ м}^2/\text{г}$, как измерено методом Брунауэра-Эммета-Теллера (BET) на основе адсорбции газа, с использованием порошкообразных образцов и

Sorpty 1750 (Carlo Erba, Milan Italy), и указанная наночастица предпочтительно имеет округлую форму с диаметром в диапазоне от 30 до 80 нм. Все приборы, используемые для определения диаметра, являются приборами, способными обеспечить получение изображений просвечивающей электронной микроскопии (ТЕМ).

В другом и предпочтительном аспекте изобретение относится к допированному фтором покрытому цитратом агломерату наночастиц аморфного фосфата кальция, который может быть получен с помощью способа в соответствии с изобретением, включающего добавление фторидного соединения на стадии 2), где стадия сушки 5) представляет собой стадию сушки распылением, при этом указанный агломерат наночастиц характеризуется удельной поверхностью от 3 м²/г до 10 м²/г, как измерено методом Брунауэра-Эммета-Теллера (BET) на основе адсорбции газа, и имеет диаметр в диапазоне от 2 до 25 мкм, как измерено с помощью сканирующей электронной микроскопии (SEM).

Удельную поверхность измеряют методом Брунауэра-Эммета-Теллера (BET) на основе адсорбции газа с использованием порошкообразных образцов и Sorpty 1750 (Carlo Erba, Milan Italy).

В следующем аспекте изобретение касается применения наночастиц или агломерата наночастиц по изобретению в качестве биоматериала при лечении полости рта, обычно в стоматологии. Предпочтительно биоматериал применяют в качестве агента, способствующего реминерализации, предпочтительно для реминерализации твердых тканей зуба, или в качестве десенсибилизатора дентина, причем в последнем случае его действие предпочтительно заключается в заполнении и закупорке дентинных канальцев.

В частности, биоматериал представляет собой агент, способствующий реминерализации, предпочтительно в случае абфракции, эрозии, полости, истирания, белого пятна и гипоминерализации.

В еще одном аспекте изобретение касается использования частицы по изобретению в качестве биоматериала в ортопедических применениях.

Удивительно, что цитрат-стабилизированная наночастица и допированная фтором цитрат-стабилизированная наночастица по изобретению имеют высокую удельную поверхность, благодаря чему они способны очень быстро доставлять ионы Ca²⁺ и F¹⁻, определенно быстрее, чем наночастицы предшествующего уровня техники, такие как наночастицы, описанные в WO2016/012452. Без привязки к какой-либо конкретной теории и как будет более подробно объяснено в экспериментальной части, авторы изобретения считают, что удивительное свойство очень быстрой доставки ионов Ca²⁺ и F¹⁻ обусловлено способом, т.е. молярным отношением цитрат-иона к иону кальция, которое находится в

диапазоне от 1 до 2.

Описание фигур

На фиг. 1А показан микроснимок просвечивающей электронной микроскопии (TEM) наночастицы ACP^4 , полученной в примере 1; (вставка: соответствующая микродифракционная электронограмма (SAED));

на фиг. 1В показаны дифрактограммы ACP^4 , полученных в примере 1;

на фиг. 1С показаны спектры FT-IR ACP^4 , полученных в примере 1;

на фиг. 2А показан микроснимок TEM F- ACP^4 , полученной в примере 1; (вставка: соответствующая микродифракционная электронограмма SAED);

на фиг. 2В показана дифрактограмма F- ACP^4 , полученной в примере 1;

на фиг. 2С показаны спектры FT-IR F- ACP^4 , полученной в примере 1;

на фиг. 3А показан микроснимок TEM ACP^1 , полученной в примере 2; (вставка: соответствующая микродифракционная электронограмма (SAED));

на фиг. 3В показаны дифрактограммы ACP^2 , ACP^1 , F- ACP^1 , F- ACP^2 , полученных в примере 2;

на фиг. 3С показаны спектры FT-IR ACP^2 , ACP^1 , F- ACP^1 , F- ACP^2 , полученных в примере 2;

на фиг. 4А показано кумулятивное высвобождение Ca^{2+} из образцов ACP , полученных в примере 1 и примере 2; данные выражены в виде среднего значения $\pm$ стандартное отклонение ($n = 5$);

на фиг. 4В показано кумулятивное высвобождение Ca^{2+} из образцов F- ACP , полученных в примере 1 и примере 2; данные выражены в виде среднего значения $\pm$ стандартное отклонение ($n = 5$);

на фиг. 4С показано кумулятивное высвобождение F^- из образцов F- ACP , полученных в примере 1 и примере 2; данные выражены в виде среднего значения $\pm$ стандартное отклонение ($n = 5$);

на фиг. 5 показана дифрактограмма высушенного распылением F- ACP^1 из примера 8;

на фиг. 6 показаны микроснимки SEM при разном увеличении высушенных распылением F- ACP^1 из примера 8;

на фиг. 7 показаны дифрактограммы ACP^2 , ACP^1 , F- ACP^2 , F- ACP^1 , полученных в примере 2, через год после синтеза, хранящихся при комнатной температуре, из примера 9;

на фиг. 8 показаны дифрактограммы SrF- ACP^2 , MgF- ACP^2 , SrMgF- ACP^2 , SrF- ACP^1 , MgF- ACP^1 , SrMgF- ACP^1 , полученных в примере 2bis;

на фиг. 9 показаны спектры FT-IR SrF-ACP^2 , MgF-ACP^2 , SrMgF-ACP^2 , SrF-ACP^1 , MgF-ACP^1 , SrMgF-ACP^1 , полученных в примере 2bis;

на фиг. 10А показано кумулятивное высвобождение Ca^{2+} из образцов SrF-ACP^2 , MgF-ACP^2 , SrMgF-ACP^2 , SrF-ACP^1 , MgF-ACP^1 , SrMgF-ACP^1 , полученных в примере 2bis; данные выражены в виде среднего значения $\pm$ стандартное отклонение ($n = 5$); и

на фиг. 10В показано кумулятивное высвобождение F^- из образцов SrF-ACP^2 , MgF-ACP^2 , SrMgF-ACP^2 , SrF-ACP^1 , MgF-ACP^1 , SrMgF-ACP^1 , полученных в примере 2bis; данные выражены в виде среднего значения $\pm$ стандартное отклонение ($n = 5$).

Подробное описание изобретения

Таким образом, изобретение относится к способу получения покрытых цитратом наночастиц аморфного фосфата кальция, который включает следующие стадии:

1) обеспечение первого раствора соли кальция и цитратной соли, в котором молярное отношение цитрат-иона к иону кальция находится в диапазоне от 1 до 2, таким образом, получая прозрачный первый раствор;

2) обеспечение второго раствора соли, способной давать фосфатный анион и карбонатную соль;

3) смешивание вместе прозрачного первого раствора и второго раствора при pH в диапазоне от 8 до 11;

4) осаждение наночастиц; и

5) сушку наночастиц, полученных на стадии 4).

Стадия 1) способа заключается в получении первого раствора соли кальция и цитратной соли, в котором молярное отношение цитрат-иона к иону кальция находится в диапазоне от 1 до 2. Полученный таким образом первый раствор является прозрачным.

Соль кальция предпочтительно состоит из аниона, выбранного из группы, состоящей из хлорида, нитрата, гидроксида, ацетата, оксалата, лактата, более предпочтительно, анион представляет собой хлорид.

Цитратная соль предпочтительно состоит из катиона, выбранного из группы, состоящей из натрия и калия, более предпочтительно, катион представляет собой натрий.

Более предпочтительно молярное отношение цитрат-иона к иону кальция равно примерно 1. Еще более предпочтительно, молярное отношение цитрат-иона к иону кальция равно примерно 2. В предпочтительном варианте осуществления первый раствор стадии 1) способа в соответствии с изобретением содержит по меньшей мере одну дополнительную соль, выбранную из группы: соль стронция и соль магния.

Соль стронция предпочтительно состоит из аниона, выбранного из группы, состоящей из хлорида, нитрата, гидроксида, ацетата, оксалата, лактата, более

предпочтительно, анион представляет собой хлорид.

Соль магния предпочтительно состоит из аниона, выбранного из группы, состоящей из хлорида, нитрата, гидроксида, ацетата, оксалата, лактата, более предпочтительно, анион представляет собой хлорид.

Стадия 2) заключается в получении второго раствора соли, способной давать фосфатный анион и карбонатную соль.

Предпочтительно отношение между карбонатным анионом и фосфатом находится в диапазоне от 1 до 1,66.

Предпочтительно соль, способная давать фосфатный анион, представляет собой соль фосфат, гидрофосфат или гидрофосфат. Соль, способная давать фосфат-анион, предпочтительно состоит из катиона, выбранного из группы, состоящей из натрия, калия и аммония, более предпочтительно, катион представляет собой натрий.

Стадия 3) состоит в смешивании вместе первого и второго раствора при pH в диапазоне от 8 до 11, предпочтительно 8,5-10,7.

В предпочтительном аспекте отношение первого и второго раствора находится в диапазоне от 1:1 до 1:1,5.

В соответствии с изобретением стадию смешивания 3) осуществляют после того, как первый раствор становится прозрачным. Предпочтительно второй раствор добавляют к прозрачному первому раствору на стадии смешивания.

Стадия 4) состоит в осаждении наночастиц.

Стадия осаждения может быть успешно осуществлена путем обеспечения циклов седиментации путем центрифугирования, после чего удаление супернатанта может быть выполнено в соответствии с хорошо известными способами. Сразу же после сбора осадка он может быть промыт предпочтительно сверхчистой водой. Затем влажный осадок сушат в соответствии с методами сушки, известными в данной области.

Стадия 5) состоит из стадии сушки осажденных наночастиц по изобретению.

Стадия сушки может быть осуществлена любыми подходящими способами, известными в данной области. Предпочтительно стадия сушки может быть выбрана из лиофилизации, сушки распылением и сушки в вентилируемой печи. Последний способ предпочтительно проводят после промывки этанолом и при температуре около 40°C.

В предпочтительном аспекте стадия сушки 5) представляет собой стадию лиофилизации.

В другом аспекте изобретение касается покрытой цитратом наночастицы аморфного фосфата кальция, которую можно получить с помощью способа в соответствии с изобретением, при этом стадия сушки 5) представляет собой стадию

лиофилизации, при этом указанная наночастица характеризуется удельной поверхностью от $250 \text{ м}^2/\text{г}$ до $360 \text{ м}^2/\text{г}$, предпочтительно от $270 \text{ м}^2/\text{г}$ до $360 \text{ м}^2/\text{г}$, как измерено методом Брунауэра-Эммета-Теллера (BET) на основе адсорбции газа, и имеет морфологию округлой формы с диаметром в диапазоне от 30 до 80 нм, как измерено при помощи изображений, полученных методом просвечивающей электронной микроскопии (ТЕМ).

Таким образом, в первом варианте осуществления удельная поверхность наночастиц находится в диапазоне от $250 \text{ м}^2/\text{г}$ до $360 \text{ м}^2/\text{г}$, предпочтительно от $270 \text{ м}^2/\text{г}$ до $360 \text{ м}^2/\text{г}$, как измерено методом Брунауэра-Эммета-Теллера (BET) на основе газовой адсорбции с использованием порошковых образцов и Sorpty 1750 (Carlo Erba, Milan Italy), и указанная наночастица имеет предпочтительно сферическую форму с диаметром в диапазоне от 30 до 80 нм. Все приборы, используемые для определения диаметра, являются приборами, способными обеспечить изображения просвечивающей электронной микроскопии (ТЕМ).

В другом предпочтительном аспекте стадия сушки 5) представляет собой стадию сушки распылением.

В другом аспекте изобретение относится к покрытому цитратом агломерату наночастиц аморфного фосфата кальция, который может быть получен способом в соответствии с изобретением, где стадия сушки 5) представляет собой стадию сушки распылением, при этом указанный агломерат наночастиц характеризуется удельной поверхностью от $3 \text{ м}^2/\text{г}$ до $10 \text{ м}^2/\text{г}$, как измерено методом Брунауэра-Эммета-Теллера (BET) на основе газовой адсорбции, и имеет морфологию округлой формы с диаметром в диапазоне от 2 до 25 мкм, как измерено с помощью сканирующей электронной микроскопии (SEM).

Таким образом, в первом варианте осуществления удельная поверхность агломерата наночастиц находится в диапазоне от $3 \text{ м}^2/\text{г}$ до $10 \text{ м}^2/\text{г}$, как измерено методом Брунауэра-Эммета-Теллера (BET) на основе газовой адсорбции с использованием порошкообразных образцов и Sorpty 1750 (Carlo Erba, Milan Italy), и указанный агломерат наночастиц предпочтительно имеет сферическую форму и диаметр в диапазоне от 2 до 25 мкм. Все приборы, используемые для определения диаметра, являются приборами для сканирующей электронной микроскопии (SEM).

В дополнительном и предпочтительном аспекте изобретение позволяет получить допированные фтором покрытые цитратом наночастицы аморфного фосфата кальция путем обеспечения добавления фторидного соединения во второй раствор на стадии 2).

Предпочтительно фторидное соединение представляет собой фторид катиона, выбранного из группы, состоящей из натрия и калия.

Следовательно, в еще одном и предпочтительном аспекте изобретение относится к допированной фтором покрытой цитратом наночастице аморфного фосфата кальция, которую можно получить способом в соответствии с изобретением, включающим добавление фторидного соединения на стадии 2), где стадия сушки 5) представляет собой стадию лиофилизации, при этом указанная наночастица характеризуется удельной поверхностью от $250 \text{ м}^2/\text{г}$ до $370 \text{ м}^2/\text{г}$, предпочтительно от $270 \text{ м}^2/\text{г}$ до $370 \text{ м}^2/\text{г}$, как измерено методом Брунауэра-Эммета-Теллера (BET) на основе газовой адсорбции, и имеет круглую форму с диаметром в диапазоне от 30 до 80 нм, как измерено при помощи изображений, полученных методом просвечивающей электронной микроскопии (TEM).

Таким образом, в первом варианте осуществления удельная поверхность допированной фтором покрытой цитратом наночастицы аморфного фосфата кальция находится в диапазоне от $250 \text{ м}^2/\text{г}$ до $370 \text{ м}^2/\text{г}$, предпочтительно от $270 \text{ м}^2/\text{г}$ до $370 \text{ м}^2/\text{г}$, как измерено методом Брунауэра-Эммета-Теллера (BET) на основе адсорбции газа с использованием порошкообразных образцов и Sorpty 1750 (Carlo Erba, Milan Italy), и указанная наночастица предпочтительно имеет сферическую форму с диаметром в диапазоне от 30 до 80 нм. Все приборы, используемые для определения диаметра, являются приборами, способными обеспечить изображения просвечивающей электронной микроскопии (TEM).

В другом и предпочтительном аспекте изобретение относится к допированному фтором покрытому цитратом агломерату наночастиц аморфного фосфата кальция, который может быть получен способом в соответствии с изобретением, включающим добавление фторидного соединения на стадии 2), где стадия сушки 5) представляет собой стадию сушки распылением, при этом указанный агломерат наночастиц характеризуется удельной поверхностью от $3 \text{ м}^2/\text{г}$ до $10 \text{ м}^2/\text{г}$, как измерено методом Брунауэра-Эммета-Теллера (BET) на основе адсорбции газа, и имеет округлую форму с диаметром в диапазоне от 2 до 25 мкм, как измерено с помощью сканирующей электронной микроскопии (SEM).

Удельную поверхность измеряют методом Брунауэра-Эммета-Теллера (BET) на основе адсорбции газа с использованием порошкообразных образцов и Sorpty 1750 (Carlo Erba, Milan Italy).

В дополнительном аспекте изобретение касается применения частицы по изобретению в качестве биоматериала для применения в стоматологии. Предпочтительно биоматериал применяют для реминерализации твердых тканей зуба или в качестве десенсибилизатора дентина, при этом в последнем случае его действие предпочтительно заключается в заполнении и закупорке дентинных канальцев.

В еще одном аспекте изобретение относится к применению частицы по изобретению в качестве биоматериала в ортопедических применениях.

Экспериментальная часть

Материалы

Дигидрат хлорида кальция ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, чистота $\geq 99,0\%$), трехосновный дигидрат цитрата натрия ($\text{Na}_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7) \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, чистота $\geq 99,0\%$ (далее в настоящем документе называется как $\text{Na}_3(\text{Cit})$), двухосновный дигидрат фосфата натрия ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, чистота $\geq 99,0\%$), гексагидрат хлорида стронция ($\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, чистота $\geq 99,0\%$), гексагидрат хлорида магния ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, чистота $\geq 99,0\%$), моногидрат карбоната натрия ($\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, чистота $\geq 99,0\%$), фторид натрия (NaF , чистота $\geq 99,0\%$), хлорид калия (KCl , чистота $\geq 99,5\%$), тиоцианат калия (KSCN , чистота $\geq 98,0\%$), одноосновный карбонат натрия (NaHCO_3 , чистота $\geq 99,7\%$) и молочная кислота ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3$, чистота $\geq 90,0\%$) получали от фирмы Sigma Aldrich (St. Luis, MO, USA). Все растворы готовили с использованием сверхчистой воды (0,22 мкСм, 25 $\square$, MilliQ $\text{\textcircled{C}}$, Millipore).

Инструменты и методы оценки

Дифрактограммы (XRD) образцов, представленных в таблице 1, получали с помощью дифрактометра D8 Advance (Bruker, Karlsruhe, Germany), оснащенного позиционно-чувствительным детектором Lynx-eye с использованием излучения $\text{Cu K}\alpha$ ($\lambda = 1,54178 \text{ \AA}$), генерируемого при 40 кВ и 40 мА. Спектры регистрировали в диапазоне 2θ от 10° до 60° с шагом (2θ) в 0,021 и временем экспозиции 0,5 с.

Анализ методом инфракрасной спектроскопии с преобразованием Фурье (FT-IR) проводили на спектрометре Nicolet 5700 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) с разрешением 2 см^{-1} с числом сканов 64 в диапазоне от 4000 до 400 см^{-1} с использованием таблеток KBr.

Оценку методом просвечивающей электронной микроскопии (TEM) и дифракции электронов в выбранной области (SAED) выполняли с помощью микроскопа Tecnai F20 (Fei Corp., Hillsboro, OR, USA), работающего с напряжением 120 кВ. Образцы порошка диспергировали с помощью ультразвука в ультрачистой воде и затем несколько капель суспензии наносили на медные решетки TEM 200 меш, покрытые тонкими пленками из аморфного углерода, и инкубировали в течение нескольких минут.

Количество Ca и P, Mg и Sr оценивали при помощи спектрометра методом атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно связанной плазмой (ICP-OES) (Agilent Technologies 5100 ICP-OES, Santa Clara, CA, USA), в то время как F оценивали с помощью фторид-селективного электрода (Intellical TM ISEF121, Hach Lange, Loveland, CO, USA). Образцы получали путем растворения аликвоты порошка в 1%-ном (по массе) растворе

HNO₃.

Термогравиметрический анализ (TGA) выполняли на приборе STA 449 Jupiter (Netzsch GmbH, Selb, Germany). Около 10 мг образца взвешивали в платиновом тигле и нагревали от комнатной температуры до 1200 °C в потоке воздуха со скоростью нагрева 10 °C/мин.

Метод Брунауэра-Эммета-Теллера (BET) на основе адсорбции газа использовали для измерения удельной поверхности (SSA) порошкообразных образцов с использованием Sorptly 1750 (Carlo Erba, Milan Italy).

Оценку методом сканирующей электронной микроскопии (SEM) выполняли с использованием Sigma NTS GmbH (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany). Образцы порошка закрепляли на алюминиевых штырях с помощью углеродной ленты, и перед анализом распыляли золото в Sputter Coater E5100 (Polaron Equipment, Watford, Hertfordshire, UK) в атмосфере аргона при 10⁻³ мбар в течение 4 минут с током распыления 30 мА.

Пример 1. Получение наночастиц известного уровня техники WO2016/016012452

Сухой порошок АСР (аморфный фосфат кальция) синтезировали путем смешивания при комнатной температуре двух растворов (1:1 объем/объем, всего 200 мл), содержащих: (i) 100 мМ CaCl₂ + 400 мМ Na₃(Cit) и (ii) 120 мМ Na₂HPO₄ + 200 мМ Na₂CO₃. Значение pH доводили до 8,5 с помощью раствора HCl. При достижении смеси молочного вида, частицы трижды промывали с помощью ультрачистой воды путем центрифугирования при 5000 об/мин в течение 15 минут, термостатировали при 4 °C и затем лиофилизировали в течение ночи при -50 °C под вакуумом 3 мбар.

Образцы F-АСР получали аналогично АСР, при этом к раствору (ii) добавляли 50 мМ NaF₂.

Пример 2. Получение наночастиц по изобретению

Следуя такой же методике получения, как описано в примере 1, изготавливали также образцы АСР и F-АСР (допированные с использованием 50 мМ NaF₂), уменьшая исходное молярное отношение Cit/Ca до значения, равного 2 и 1 (далее в настоящем документе обозначены как АСР², F-АСР² и АСР¹, F-АСР¹, соответственно).

Пример 2bis. Изготовление наночастиц по изобретению с Mg и Sr

Следуя такой же методике изготовления, как описано в примере 2, образцы SrF-АСР, MgF-АСР и SrMgF-АСР изготавливали также аналогично F-АСР, при этом к раствору (i) добавляли 5 мМ SrCl₂ или 40 мМ MgCl₂, или оба. Использовали исходное молярное отношение Cit/Ca, равное 2 и 1 (далее в настоящем документе обозначены как SrF-АСР², MgF-АСР², SrMgF-АСР² и SrF-АСР¹, MgF-АСР¹, SrMgF-АСР¹, соответственно).

Коды образцов и концентрация химических реагентов, используемых для

получения в примерах 1 и 2, представлены в следующей таблице 1.

Таблица 1

Образец	Cit/Ca	NaF (мМ)	CaCl ₂ (мМ)	Na ₃ (Cit) (мМ)	Na ₂ HPO ₄ (мМ)	Na ₂ CO ₃ (мМ)	MgCl ₂ (мМ)	SrCl ₂ (мМ)
ACP ⁴	4	-	100	400	120	200	-	-
F-ACP ⁴	4	50	100	400	120	200	-	-
ACP ²	2	-	100	200	120	200	-	-
F-ACP ²	2	50	100	200	120	200	-	-
ACP ¹	1	-	100	100	120	200	-	-
F-ACP ¹	1	50	100	100	120	200	-	-
SrF-ACP ²	2	50	100	200	120	200	-	5
MgF-ACP ²	2	50	100	200	120	200	40	-
SrMgF-ACP ²	2	50	100	200	120	200	40	5
SrF-ACP ¹	1	50	100	100	120	200	-	5
MgF-ACP ¹	1	50	100	100	120	200	40	-
SrMgF-ACP ¹	1	50	100	100	120	200	40	5

Образцы предшествующего уровня техники имеют молярное отношение между цитратом и кальцием, равное 4, тогда как образцы по настоящему изобретению получали с молярным отношением в диапазоне от 1 до 2.

Пример 3. Оценка физических характеристик и композиций частиц ACP⁴, полученных в примере 1

Сухой порошок ACP⁴, полученный в примере 1, оценивали на физические свойства с помощью описанных выше приборов.

На фиг. 1А представлен микроснимок ТЕМ ACP⁴, на котором можно видеть наночастицы, имеющие скорее округлую, а не граненую и угловую форму, типичную для кристаллического СаР, с размерами в диапазоне от 20 до 50 нм. SAED-электронограмма, полученная для таких наночастиц (вставка на фиг. 1А в верхней части справа), подтверждает их аморфную природу из-за присутствия диффузных крыльев, а не пятен.

На дифрактограмме ACP⁴ (фиг. 1В) наблюдается широкая полоса при около 30° (2θ), типичная для фазы без длительной периодической регулярности, подтверждая некристаллическую структуру ACP⁴ и исключая присутствие НА и других кристаллических фаз СаР. Спектр FT-IR (фиг. 1С) демонстрирует широкие неразрешенные полосы, характерные для СаР, имеющего аморфную структуру. В частности, полосы адсорбции при около 560 и 1050 см⁻¹ ассоциированы с режимами изгиба и растяжения фосфатных групп, соответственно; полосы при около 870 см⁻¹ и в диапазоне 1400-1500 см⁻¹ относятся к карбонат-ионам, тогда как полоса при около 1605 см⁻¹ относится к адсорбированной воде, а также к растяжению COO⁻ цитрата. Таким образом, фиг. 1А, 1В, 1С подтвердили сферическую форму наночастиц, изготовленных из аморфного фосфата кальция.

Пример 4. Оценка физических характеристик и составов частиц F-ACP, полученных в примере 1

Что касается примера 1, на первой стадии концентрация реагентов, а также отношение Cit/Ca сохранялись постоянными в соответствии с протоколом, используемым для получения ACP⁴, при этом NaF добавляли для допирования ACP⁴ (далее называется в настоящем документе как F-ACP⁴)).

На ТЕМ-изображении F-ACP⁴ (фиг. 2A) можно видеть частицы округлой формы, имеющие размер и морфологию, сходные таковыми ACP⁴. SAED-электронограмма, полученная для таких наночастиц (вставка на фиг. 2A в верхней части справа), демонстрирует их аморфную природу из-за наличия диффузных крыльев, а не пятен. На дифрактограммах F-ACP⁴ (фиг. 2B) показан такой же широкий дифракционный пик при около 30° (2θ), как и для ACP⁴, что указывает на то, что присутствие ионов F⁻ не вызывает осаждения фторидной соли или других кристаллических фаз CaP. Спектры FT-IR F-ACP⁴ также демонстрируют широкие неразрешенные полосы, аналогичные тем, которые представлены на спектре FT-IR ACP⁴ (фиг. 2C).

Пример 5. Оценка физических характеристик и составов частиц ACP и F-ACP, полученных в примере 2

Как сообщалось выше, два образца ACP получали путем изменения номинального отношения Cit/Ca реагентов в соответствии с изобретением, которое было установлено равным 4 в соответствии с предшествующим уровнем техники, на 2 или 1 (далее в настоящем документе называются как ACP² и ACP¹, соответственно) в соответствии с изобретением, чтобы оценить эффект молярного отношения Cit/Ca на физико-химические характеристики этих аморфных материалов. Более того, такое же количество NaF, используемое для синтеза F-ACP⁴, использовали для допирования ACP² и ACP¹, и эти образцы были названы как F-ACP² и F-ACP¹, соответственно.

ТЕМ-изображения ACP² (не показаны) и ACP¹ (фиг. 3A) демонстрируют частицы округлой формы, имеющие размер и форму, сравнимые с ACP⁴. SAED-электронограмма, полученная для ACP¹ (вставка на фиг. 3A в верхней части справа), демонстрирует их аморфную природу из-за наличия диффузных крыльев, а не пятен. Также, в этом случае добавление F⁻ не вызвало изменений в размере и морфологии по сравнению с недопированными аналогами. Дифрактограммы ACP², ACP¹, F-ACP² и F-ACP¹ (фиг. 3B) показали такую же широкую полосу дифракции, характерную для чистой аморфной фазы. Спектры FT-IR ACP², ACP¹, F-ACP² и F-ACP¹ (фиг. 3C) также показали широкие неразрешенные полосы, подобные тем, которые представлены в других спектрах FT-IR.

Таким образом, частицы ACP или F-ACP в соответствии с изобретением имели

округлую форму и размеры, аналогичные размерам частиц предшествующего уровня техники.

Пример 5 бис

На дифрактограммах SrF-ACP^2 , MgF-ACP^2 , SrMgF-ACP^2 , SrF-ACP^1 , MgF-ACP^1 , SrMgF-ACP^1 (фиг. 8) показана такая же широкая дифракционная полоса, характерная для чистой аморфной фазы. Спектры FT-IR SrF-ACP^2 , MgF-ACP^2 , SrMgF-ACP^2 , SrF-ACP^1 , MgF-ACP^1 , SrMgF-ACP^1 (фиг. 9) также демонстрируют широкие неразрешенные полосы, подобные тем, которые представлены на других спектрах FT-IR.

Пример 6. Химический состав образцов, полученных в Примере 1, Примере 2 и Примере 2bis

Химический состав образцов, полученных в примере 2, представлен в таблице 2.

Образец	Ca ^a (мас.%)	Р ^a (мас.%)	Кальций+ Стронций+ Магний/ Фосфат ^a (мол.)	F ^b (мас.%)	Mg ^a (мас.%)	Sr ^a (мас.%)	Цитрат ^c (мас.%)	Карбонат ^c (мас.%)	SSA _{BET} ^d (м ² г ⁻¹)
ACP ²	29,1±1,0	13,2±0,3	1,70±0,02	-			2,2±0,2	3,8±0,4	287±29
F-ACP ²	32,1±0,5	13,1±0,2	1,89±0,01	2,2±0,1			2,0±0,2	3,4±0,3	328±33
ACP ¹	28,0±0,6	12,7±0,2	1,70±0,04	-			1,8±0,2	3,2±0,3	309±31
F-ACP ¹	31,9±0,8	13,1±0,3	1,88±0,01	1,8±0,1			2,4±0,2	3,1±0,3	293±29
SrF-ACP ²	29,4±0,1	12,9±0,1	1,86±0,02	2,5±0,1	-	3,8±0,1	2,3±0,2	3,4±0,3	287±29
MgF-ACP ²	27,3±0,4	14,2±0,2	1,82±0,01	3,4±0,1	3,7±0,1	-	2,1±0,2	3,2±0,3	289±29
SrMgF-ACP ²	25,3±0,3	13,2±0,2	1,86±0,03	4,1±0,1	3,1±0,1	3,6±0,1	2,4±0,2	3,5±0,3	273±27
SrF-ACP ¹	30,0±0,9	13,4±0,4	1,83±0,01	2,2±0,1	-	3,6±0,1	2,2±0,2	3,3±0,3	352±35
MgF-ACP ¹	26,7±0,1	14,2±0,1	1,80±0,01	3,7±0,1	3,8±0,1	-	2,3±0,2	3,6±0,3	304±30
SrMgF-ACP ¹	24,8±0,2	13,7±0,1	1,81±0,01	3,7±0,1	3,6±0,1	3,1±0,2	1,9±0,2	3,4±0,3	318±32

(a) Количественная оценка с помощью ICP-OES;

(b) Количественная оценка с помощью фторид-селективного электрода;

(c) Количественная оценка с помощью TGA;

(d) Рассчитано на основе адсорбции BET.

SSA_{BET} определяли также для образца предшествующего уровня техники, полученного в примере 1.

Получили следующие значения:

ACP⁴ - 200 ± 20 м²/г;

F-ACP⁴ - 213 ± 21 м²/г.

В результате, величина SSA_{BET} стала признаком, отличающим ACP от F-ACP, полученных с помощью способа предшествующего уровня техники и способа по изобретению.

Кривая TGA образцов в соответствии с изобретением в основном демонстрирует четыре потери массы, которые можно отнести к адсорбированной воде (от комнатной температуры до 150°), структурированной воде (от 150 до 350°), цитрату (от 350 до 700°) и карбонату (от 700 до 1000°). В соответствии с этими потерями оценивали содержание цитрата и карбоната, которое представлено в таблице 2.

Отношение кальций/фосфат в ACP² аналогично ACP¹, тогда как F-ACP² и F-ACP¹ показали более высокое содержание кальция и более высокие отношения Ca/P по сравнению с их недопированными аналогами. Отношение кальций/фосфат в F-ACP² аналогично F-ACP¹. Отношение кальций+стронций+магний/фосфат для SrF-ACP², MgF-ACP², SrMgF-ACP², SrF-ACP¹, MgF-ACP¹, SrMgF-ACP¹ аналогично значению, рассчитанному для образцов F-ACP² и F-ACP¹. Содержание цитрата и карбоната не изменилось в образцах, допированных Sr и Mg, и было аналогично значению, рассчитанному для образцов F-ACP² и F-ACP¹. Удивительным образом было обнаружено, что при включении в состав Mg, отдельно или в комбинации со Sr, количество фторида возрастало.

Не привязываясь к какой-либо теории, авторы изобретения полагают, что более высокие площади поверхности обусловлены способом по изобретению, который обеспечивает молярное отношение цитрат-иона к иону кальция в диапазоне от 1 до 2.

Приведенные выше данные демонстрируют, что покрытые цитратом частицы и допированным фтором покрытые цитратом частицы, полученные с помощью способа по изобретению, отличаются от допированных фтором покрытых цитратом частиц из WO2016/012452 и поэтому являются новыми.

Пример 7. Высвобождение ионов в искусственной слюне образцов, полученных в примере 1 и примере 2

Применение ACP в продуктах для лечения зубов основано на принципе высвобождения ионов кальция и фосфат-ионов для создания локального перенасыщения для инициирования реминерализации эмали. Таким образом, этот эффект тестировали *in vitro*. Тестировали высвобождение ионов *in vitro* в кислой искусственной слюне (раствор, имитирующий слюну человека после еды, без ее макромолекулярных компонентов).

200 мг порошков ACP или F-ACP, полученных в примерах 1 и 2, диспергировали в 10 мл искусственной слюны, изготовленной в виде модифицированного раствора Taniguchi, содержащего KCl 20 mM, KSCN 5,3 mM, Na₂HPO₄ 1,4 mM, NaHCO₃ 15 mM и молочную кислоту 10 mM. Суспензию поддерживали при 37° при встряхивании. В запланированные моменты времени удаляли 8 мл супернатанта (который хорошо отделялся от твердой фазы путем центрифугирования при 5000 об/мин в течение 15 мин)

для количественного определения Ca^{2+} и F^- с помощью ICP-OES и фторид-ионного электрода, соответственно. После этого образцы промывали 8 мл свежей искусственной слюны и суспензию поддерживали при 37°C при встряхивании, и обрабатывали, как описано ранее, в следующий момент времени.

Все образцы из примеров 1 и 2 показали замедленное высвобождение ионов Ca^{2+} и F^- в первые два часа (фиг. 4). Образцы с отношением Cit/Ca в соответствии с изобретением показали удивительно более высокие скорости высвобождения ионов, таким образом, проявляя себя как улучшенный и выгодный продукт по сравнению с предшествующим уровнем техники.

Без привязки к какой-либо теории авторы изобретения полагают, что этот неожиданный эффект вероятно обусловлен особенностями частиц по изобретению, которые имеют более высокие площади поверхности за счет специфического молярного отношения, используемого в способе получения наночастиц.

Пример 7bis

Высвобождение ионов *in vitro* в кислой искусственной слюне SrF-ACP^2 , MgF-ACP^2 , SrMgF-ACP^2 , SrF-ACP^1 , MgF-ACP^1 , SrMgF-ACP^1 , полученных в соответствии с примером 2bis, тестировали в тех же условиях, что и в примере 7.

Все образцы из примера 2bis, аналогичные образцам из примеров 1 и 2, показали замедленное высвобождение ионов Ca^{2+} и F^- в первые два часа (фиг. 10A и 10B). Образцы из примера 2bis в соответствии с изобретением показали скорости высвобождения ионов, сравнимые с образцами из примера 2, таким образом, проявляя себя как улучшенный и выгодный продукт по сравнению с предшествующим уровнем техники.

Пример 8. Получение наночастиц по изобретению, агломерированных в микрочастицы (агломерат наночастиц по изобретению)

Для оценки возможности сушки образцов из примера 2 с помощью распылительной сушилки без воздействия на их аморфные свойства, ACP^2 , ACP^1 , F-ACP^2 и F-ACP^1 после промывок и полученные в примере 2, ресуспендировали в воде при 3,5% масс./об. и сушили путем распыления (Mini Spray Dryer B-290, Büchi Labortechnik AG, Switzerland) в следующих условиях: диаметр форсунки 0,7 мм, скорость подачи 3 мл/мин, скорость потока аргона 450 л/ч, температура на входе 120°C и скорость aspirатора 70%. Дифрактограмма высушенного распылением порошка F-ACP^1 (фиг. 5) показала только широкую полосу при около 30° (2θ), подтверждая тот факт, что аморфная фаза сохраняется. Микроснимки SEM высушенного распылением порошка F-ACP^1 (фиг. 6) показали, что образец состоит из сферических частиц диаметром около 2-25 мкм, которые, в свою очередь, состоят из агломерированных наночастиц независимо от отношения

Cit/Ca и присутствия фторида. Величина $SSA_{\text{ВЕТ}}$ высушенного порошка находилась в диапазоне 3-10 м²/г независимо от отношения Cit/Ca и присутствия фторида.

Пример 9. Стабильность сухого порошка образцов, полученных в примере 2

АСР является нестабильным по сравнению с кристаллическими полиморфами СаР, поэтому он превращается в кристаллическую фазу даже в сухом состоянии, взаимодействуя с атмосферной водой. Вследствие этого, его применение и обращение с ним является затруднительным до тех пор, пока не будет разработан стабильный материал. Стабильность порошков АСР², АСР¹, F-АСР² и F-АСР¹, хранящихся при комнатной температуре, оценивали путем анализа их структуры путем сбора дифрактограммы вплоть до одного года (фиг. 7). Интересно, что дифрактограмма осталась без изменений, что свидетельствует о том, что аморфная природа всех образцов сохранялась в течение этого периода времени.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения покрытой цитратом наночастицы аморфного фосфата кальция, который включает следующие стадии:

1) обеспечение первого раствора соли кальция и цитратной соли, где молярное отношение цитрат-иона к иону кальция находится в диапазоне от 1 до 2, таким образом, получая прозрачный первый раствор;

2) обеспечение второго раствора соли, способной дать фосфат-анион и карбонатную соль;

3) смешивание вместе прозрачного первого раствора и второго раствора при pH в диапазоне от 8 до 11;

4) осаждение наночастиц; и

5) сушку наночастиц, полученных на стадии 4).

2. Способ по п. 1, где соль кальция состоит из аниона, выбранного из группы, состоящей из хлорида, нитрата, гидроксида, ацетата, оксалата, лактата, предпочтительно, анион представляет собой хлорид.

3. Способ по п. 1 или п. 2, где цитратная соль состоит из катиона, выбранного из группы, состоящей из натрия и калия, предпочтительно, катион представляет собой натрий.

4. Способ по любому из пп. 1-3, где молярное отношение цитрат-иона к иону кальция составляет около 2.

5. Способ по любому из пп. 1-4, где первый раствор стадии 1) содержит по меньшей мере одну дополнительную соль, выбранную из группы, состоящей из: соли стронция и соли магния.

6. Способ по любому из пп. 1-5, где соль, способная давать фосфат-анион, представляет собой соль фосфат, гидрофосфат или гидрофосфат, предпочтительно состоящую из катиона, выбранного из группы, состоящей из натрия, калия и аммония.

7. Способ по любому из пп. 1-6, где pH на стадии 3) находится в диапазоне от 8,5 до 10,7.

8. Способ по любому из пп. 1-7, где на стадии смешивания 3) второй раствор добавляют к прозрачному первому раствору.

9. Способ по любому из пп. 1-8, где на стадии 4) осаждение осуществляют путем обеспечения циклов седиментации путем удаления надосадочной жидкости центрифугированием, сбора и промывки осадка.

10. Способ по любому из пп. 1-9, где стадия сушки 5) выбрана из лиофилизации, сушки распылением и сушки в сушильном шкафу с вентиляцией.

11. Способ по любому из пп. 1-10, где на стадии 1) добавляют фторидное соединение.

12. Способ по п. 11, где фторидное соединение представляет собой фторид катиона, выбранного из группы, состоящей из натрия и калия.

13. Покрытая цитратом наночастица аморфного фосфата кальция, которая может быть получена с помощью способа по любому из пп. 1-10, где стадия сушки 5) представляет собой стадию лиофилизации, причем указанная наночастица характеризуется удельной поверхностью от $250 \text{ м}^2/\text{г}$ до $360 \text{ м}^2/\text{г}$, как измерено методом Брунауэра-Эммета-Теллера (BET) на основе адсорбции газа, и имеет морфологию округлой формы с диаметром в диапазоне от 30 до 80 нм, как измерено при помощи изображений, полученных методом просвечивающей электронной микроскопии (ТЕМ).

14. Агломерат покрытых цитратом наночастиц аморфного фосфата кальция, который может быть получен с помощью способа по любому из пп. 1-10, где стадия сушки 5) представляет собой стадию сушки распылением, причем указанный агломерат наночастиц характеризуется удельной поверхностью от $2 \text{ м}^2/\text{г}$ до $10 \text{ м}^2/\text{г}$, как измерено методом Брунауэра-Эммета-Теллера (BET) на основе адсорбции газа, и имеет морфологию округлой формы с диаметром в диапазоне от 2 до 25 мкм, как измерено методом сканирующей электронной микроскопии (SEM).

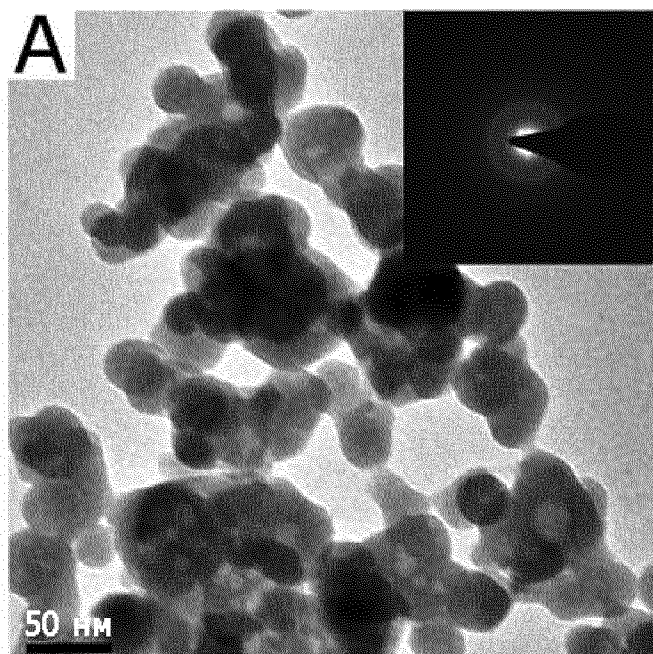
15. Допированные фтором покрытые цитратом наночастицы аморфного фосфата кальция, которые могут быть получены с помощью способа по любому из пп. 1-12, где стадия сушки 5) представляет собой стадию лиофилизации, причем указанная наночастица характеризуется удельной поверхностью от $250 \text{ м}^2/\text{г}$ до $370 \text{ м}^2/\text{г}$, как измерено методом Брунауэра-Эммета-Теллера (BET) на основе адсорбции газа, и имеет морфологию округлой формы с диаметром от 30 до 80 нм, как измерено при помощи изображений, полученных методом просвечивающей электронной микроскопии (ТЕМ).

16. Допированный фтором покрытый цитратом агломерат наночастиц аморфного фосфата кальция, который может быть получен с помощью способа по любому из пп. 1-12, где стадия сушки 5) представляет собой стадию сушки распылением, причем указанный агломерат наночастиц характеризуется удельной поверхностью от $3 \text{ м}^2/\text{г}$ до $10 \text{ м}^2/\text{г}$, как измерено методом Брунауэра-Эммета-Теллера (BET) на основе адсорбции газа, и имеет морфологию округлой формы с диаметром в диапазоне от 2 до 25 мкм, как измерено методом сканирующей электронной микроскопии (SEM).

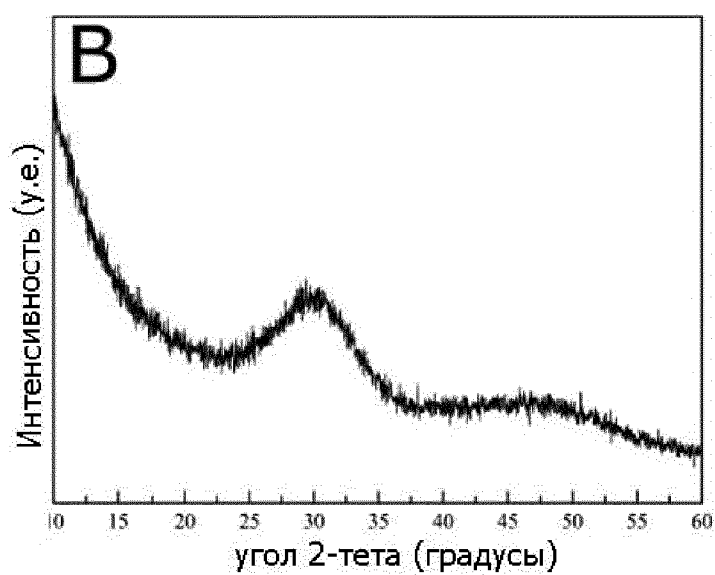
17. Наночастица или агломерат наночастиц по любому из пп. 13-16 в качестве биоматериала для применения в стоматологии.

18. Наночастица в качестве биоматериала для применения по п. 17, где

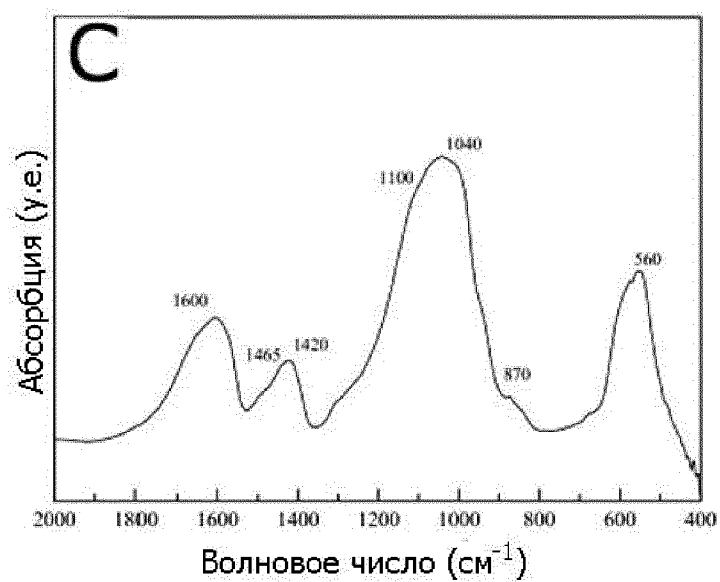
биоматериал применяют в качестве средства для реминерализации или в качестве десенсибилизатора дентина.



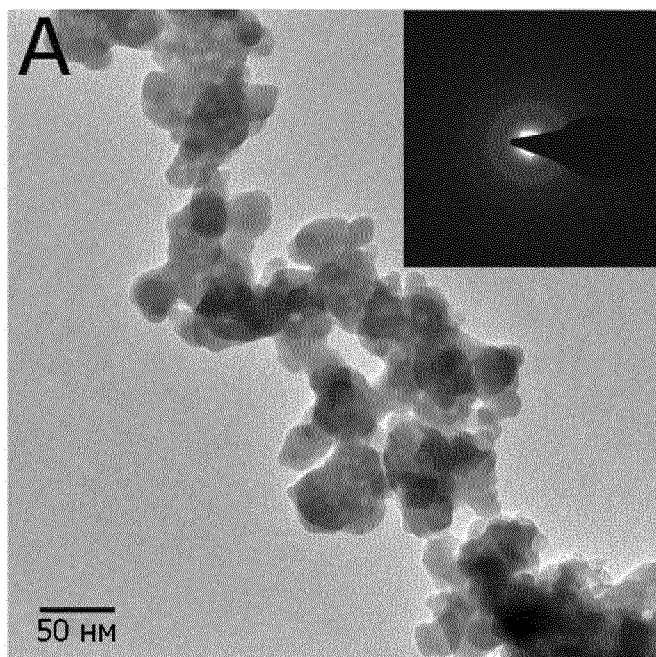
Фиг. 1А



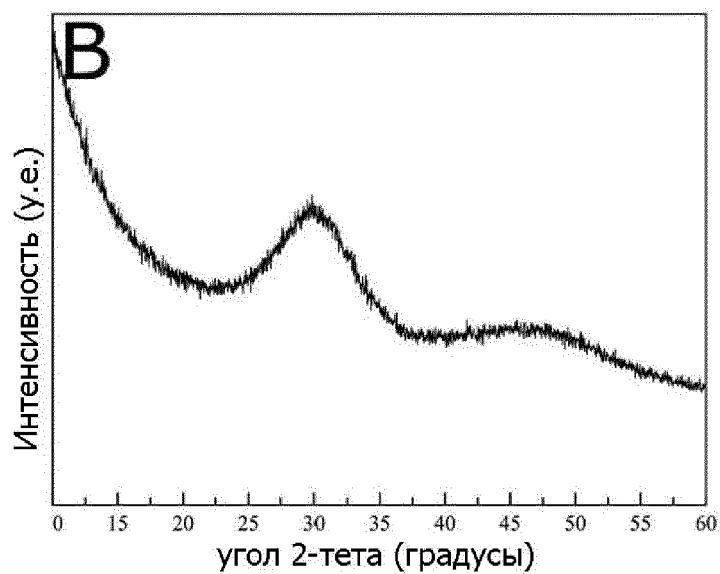
Фиг. 1В



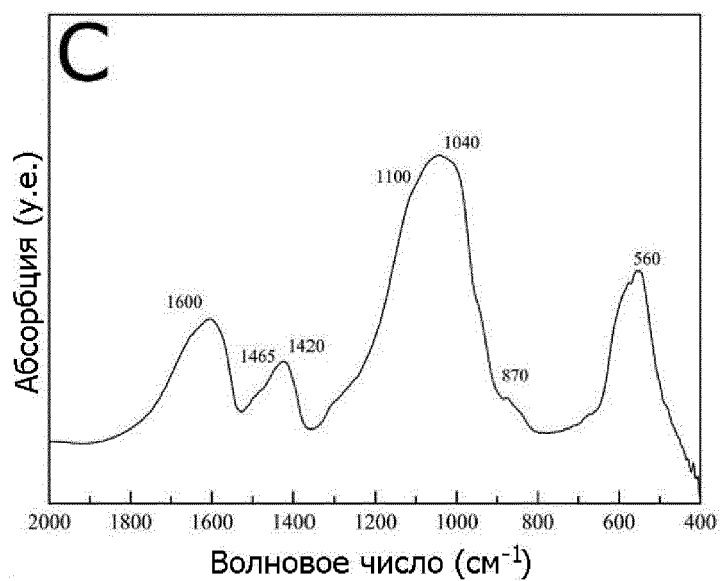
Фиг. 1С



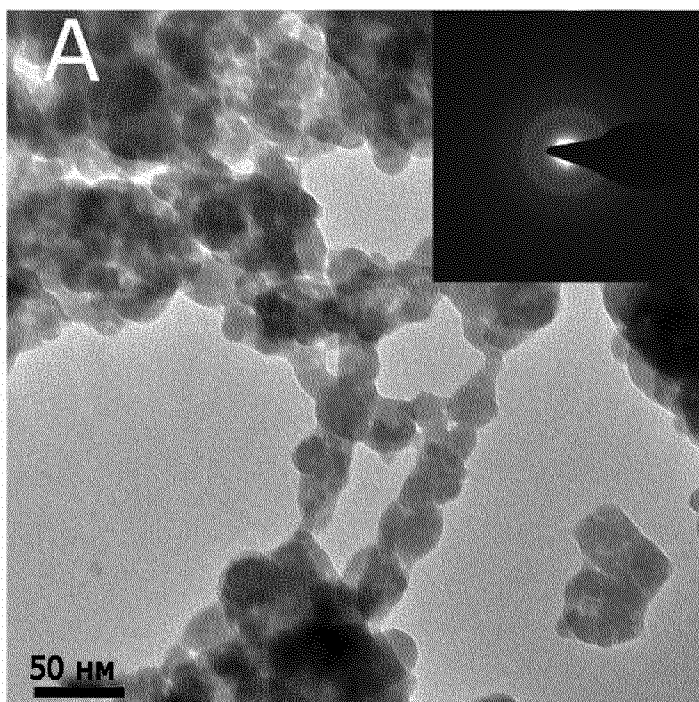
Фиг. 2А



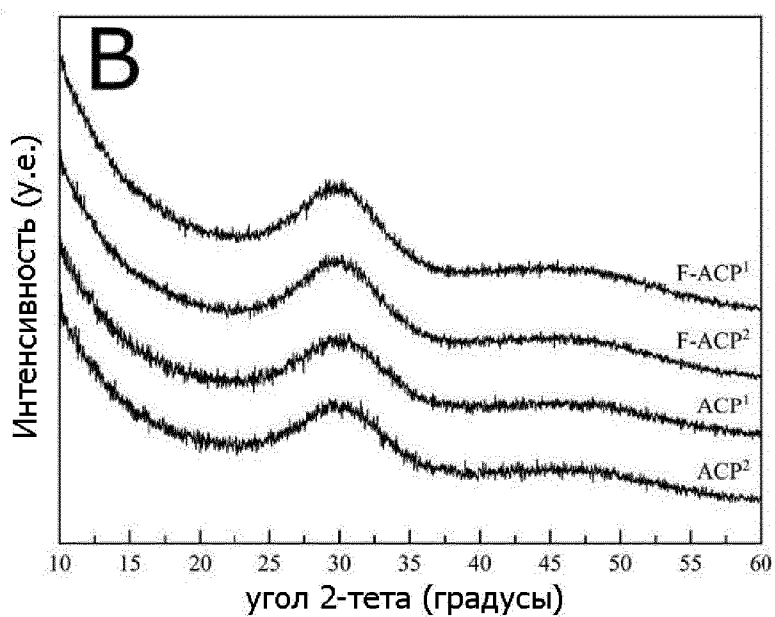
Фиг. 2В



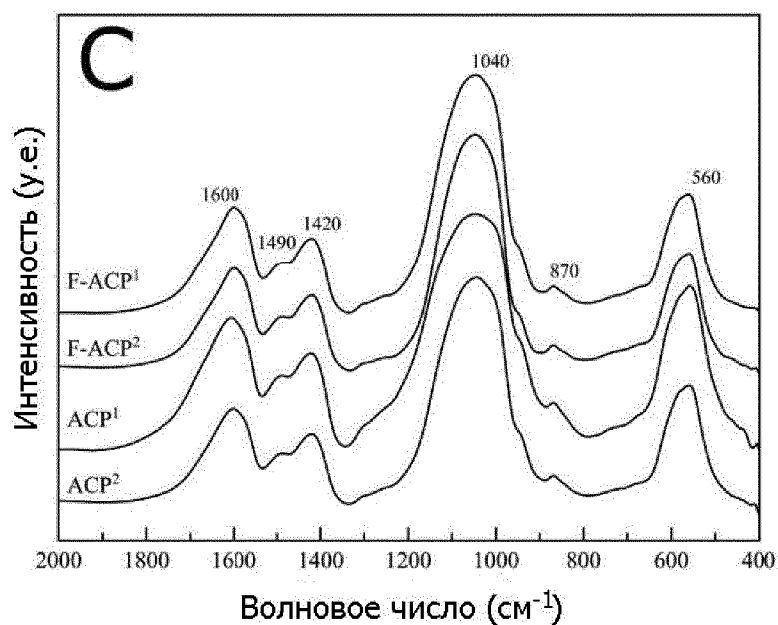
Фиг. 2С



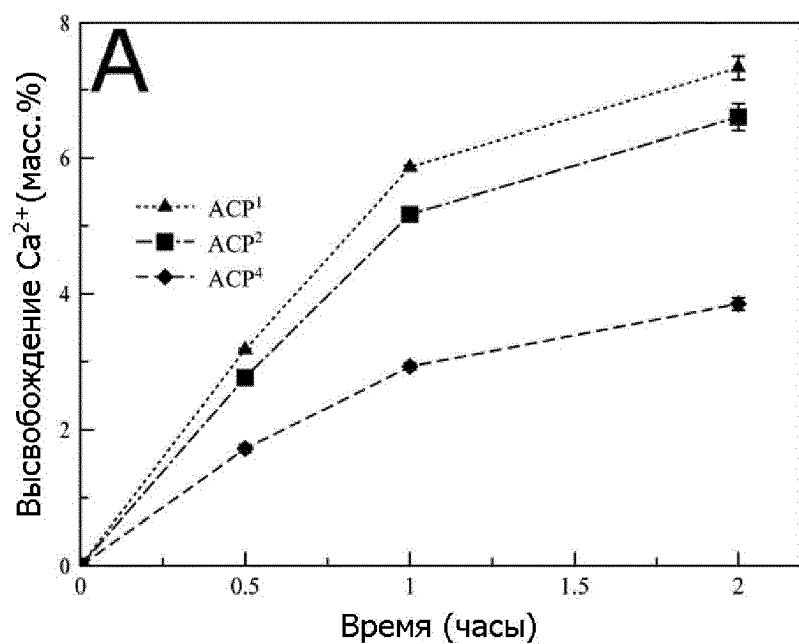
Фиг. 3А



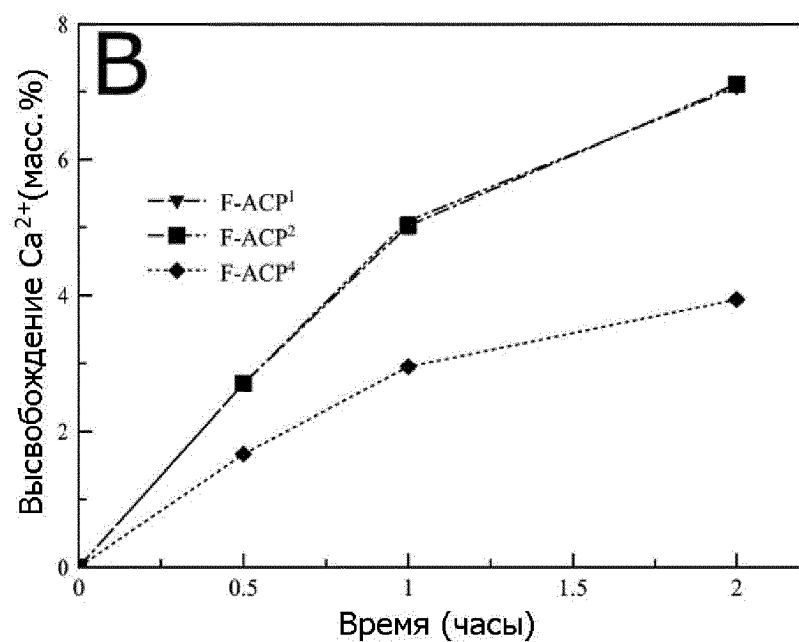
Фиг. 3В



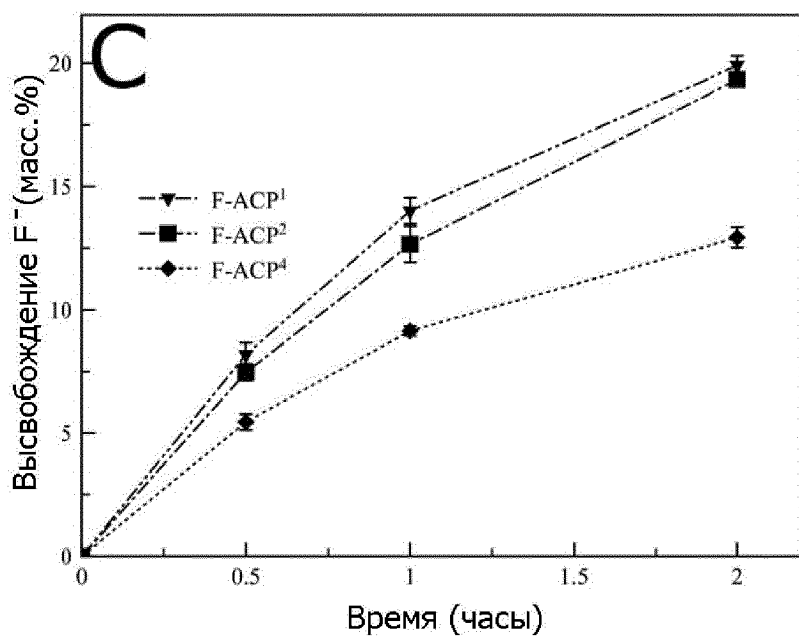
Фиг. 3С



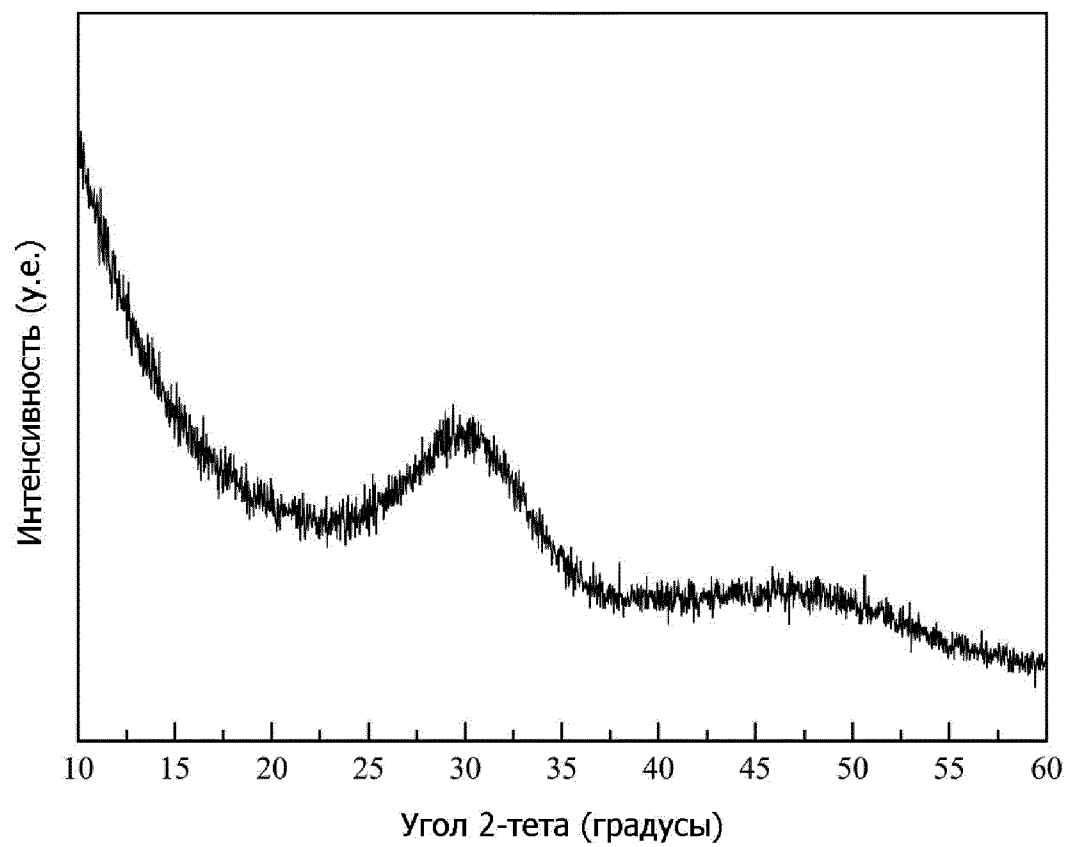
Фиг. 4А



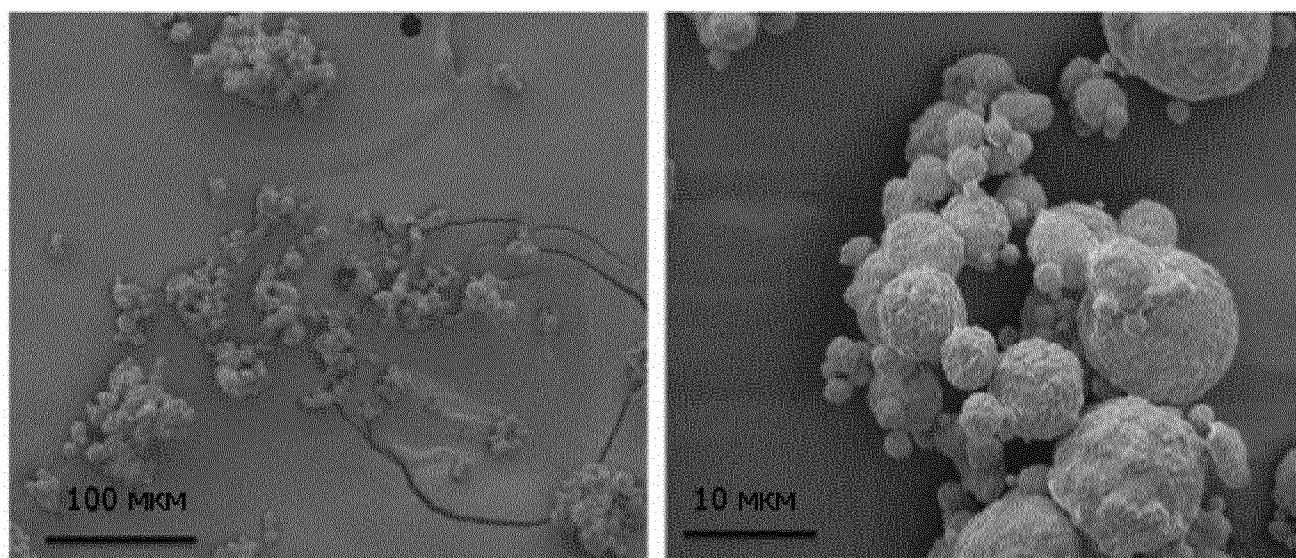
Фиг. 4В



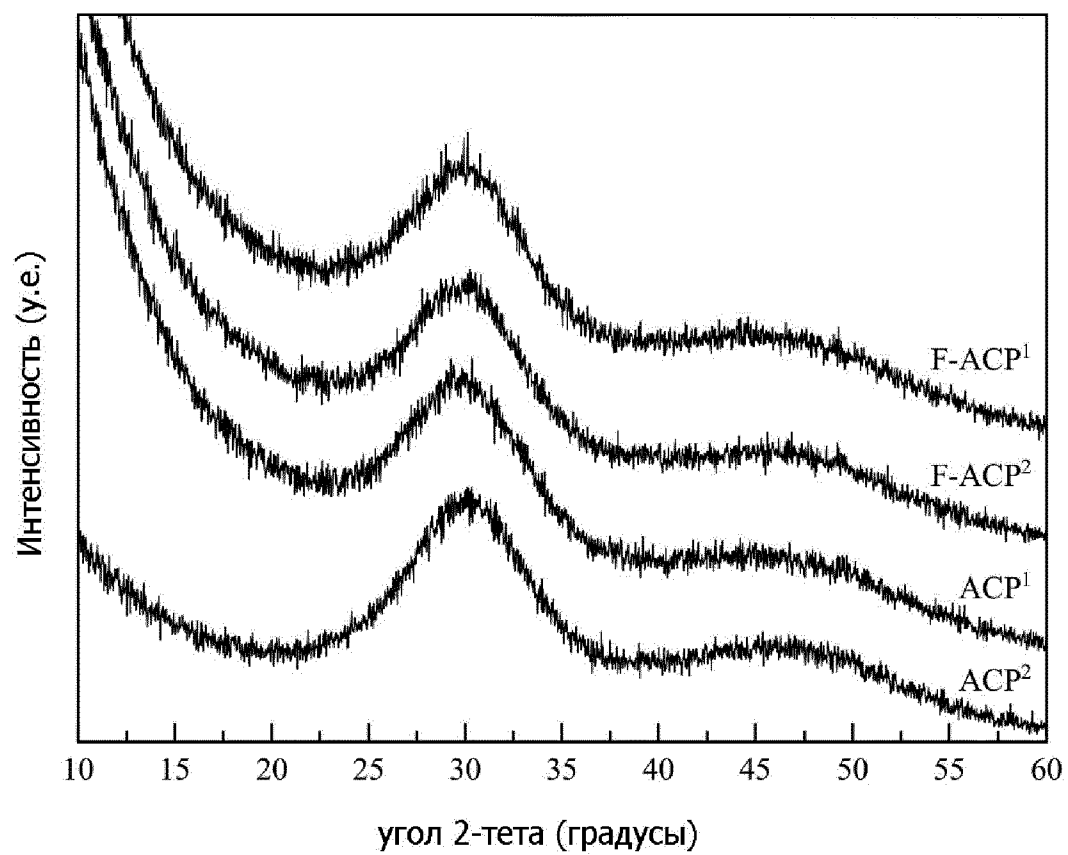
Фиг. 4С



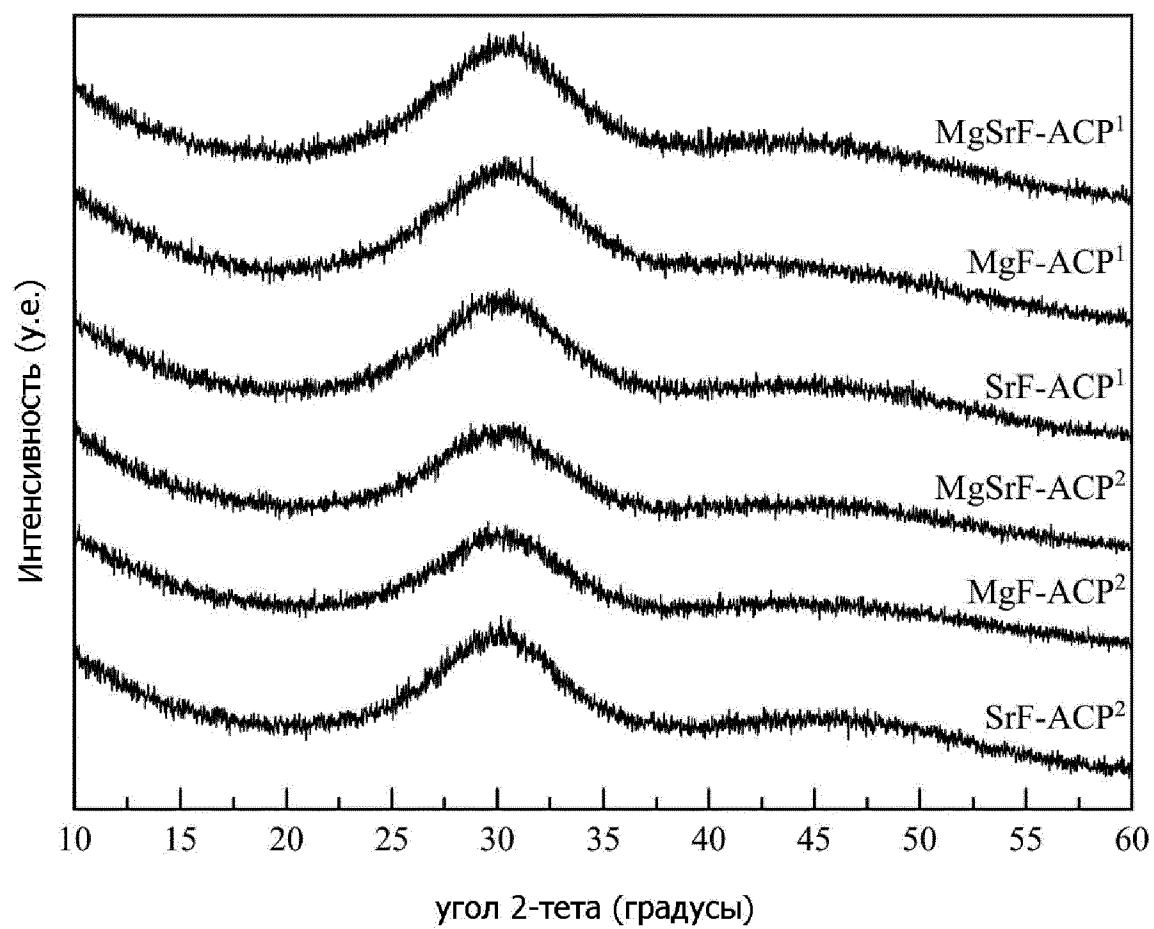
Фиг. 5



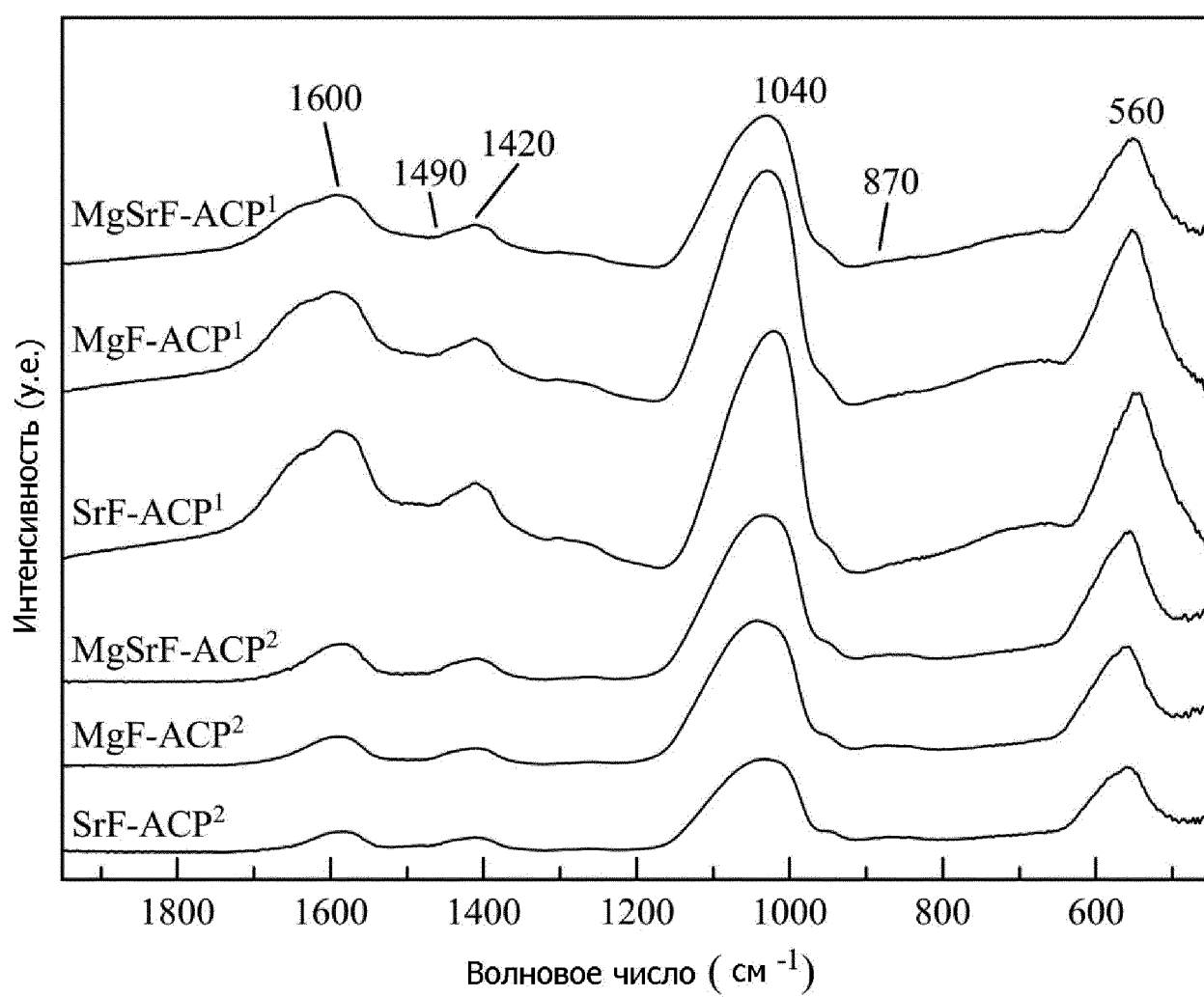
Фиг. 6



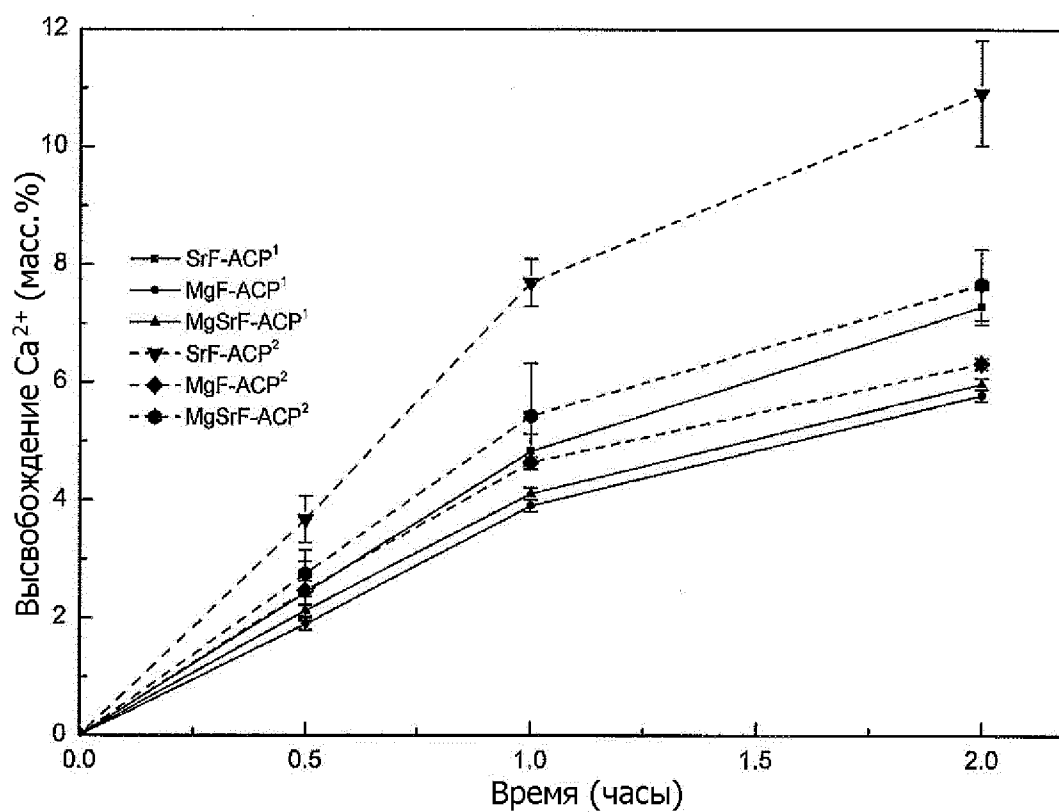
Фиг. 7



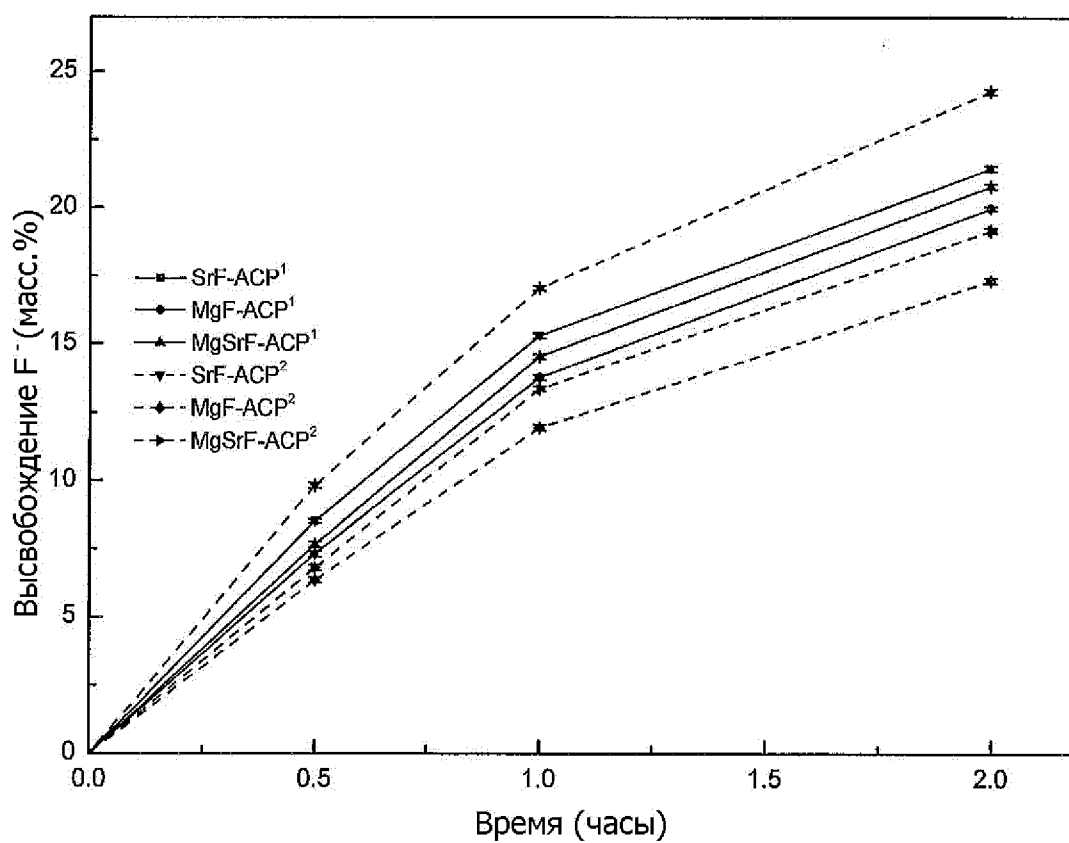
Фиг. 8



Фиг. 9



Фиг. 10А



Фиг. 10В