



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2008 00877**

(22) Data de depozit: **12/11/2008**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **29/12/2017** BOPI nr. **12/2017**

(41) Data publicării cererii:
30/06/2010 BOPI nr. **6/2010**

(73) Titular:
• **UNIVERSITATEA TEHNICĂ
"GHEORGHE ASACHI" DIN IAȘI,
BD. PROF. DIMITRIE MANGERON NR.67,
IAȘI, IS, RO**

(72) Inventatori:
• **MAIER STELIAN SERGIU,
STR.FÂNTÂNILOR NR.37, BL.B 2, ET.7,
AP.69, IAȘI, IS, RO;**
• **MAIER VASILICA, STR.FÂNTÂNILOR
NR.37, BL.B 2, ET.7, AP.69, IAȘI, IS, RO;**
• **PRUNEANU MELINDA,
STR.VASILE LUPU NR.83, BL.D 1, SC.C,
ET.9, AP.33, IAȘI, IS, RO;**

• **BUCIȘCANU INGRID IOANA,
STR.GRĂDINARI NR.2, BL.D1, SC.A, ET.2,
AP.3, IAȘI, IS, RO**

(56) Documente din stadiul tehnicii:
**STELIAN S. MAIER, VASILICA MAIER,
MELINDA PRUNEANU, "STUDY ON THE
CROSSLINK-INDUCED RADICAL
INTERCOUPLING BETWEEN
ATELOCOLLAGEN AND IN
SITU-GENERATED (CO)POLYMERS",
2008; STELIAN S. MAIER, VASILICA
MAIER, MELINDA PRUNEANU,
"PRELIMINARY STUDY ON A
BIOTORELABLE TERNARY SYSTEM,
ACTING AS REDOX INITIATOR", 2008**

(54) **PROCEDEU PENTRU OBTINEREA REȚELELOR
NEREGULAT INTERCUPLATE, DE TIP
ATELOCOLAGEN-(CO)POLIMERI GENERAȚI *IN SITU*,
CU PROPRIETĂȚI DE HIDROGEL**



1 Invenția se referă la un procedeu pentru obținerea rețelelor neregulat intercuppate, de
2 tip atelocolagen-(co)polimeri sintetici generați *in situ*, cu proprietăți de hidrogel, caracterizate
3 prin aceea că prezintă elemente morfologice la nano- și micro-scară, precum și comportamente
4 fizico-mecanice și reologice modulabile, fiind obținute pornind de la agregate supramoleculare
5 tactoidale ale atelocolagenului, interconectate prin scurte punți de reticulare (co)polimere.
6 Respectiv rețele cu proprietăți de hidrogel sunt destinate mimării caracteristicilor matricei
7 extracelulare a țesuturilor conjunctive, cu aplicații în ingineria tisulară, cultura celulară, obținerea
8 substraturilor și structurilor utile în refacerea tisulară ghidată, tratarea rănilor extinse și a
9 arsurilor, obținerea de biomateriale cu componentă scleroproteică, obținerea vehiculanților
10 pentru specii farmaceutice și pentru factorii de modulare a activității celulare, precum și în
11 oricare alte domenii ce apelează la surrogate și substituenți ai matricei extracelulare. Toate
12 clasele de aplicații citate impun utilizarea de sisteme macromoleculare înalt hidratate, ce
13 posedă niveluri structurale la scară microscopică, și reactivitate specifică scleroproteinelor din
14 țesuturile conjunctive vii, care să fie lipsite de componente imunogenice și citotoxice, ori de
15 specii chimice capabile să interfereze negativ în derularea lanțurilor metabolice la nivel tisular.
16 Rețelele macromoleculare obținute conform procedurii ce face obiectul prezentei invenții
17 îndeplinesc aceste condiții.

18 Din literatura de specialitate și din cea de brevete este cunoscut faptul că substituirea
19 funcțiilor matricei extracelulare implică mimarea fizico-chimismului și morfologiei țesuturilor la
20 micro- și nano-scară, pe calea structurării tridimensionale a unor specii macromoleculare
21 naturale și/sau de sinteză (Lanza R., Langer R., Vacanti J. (Editori) - **Principles of Tissue
22 Engineering - Third Edition. 2007. Elsevier Academic Press, New York**). Substraturile
23 artificiale de tip hidrogel, mai ales cele generate pornind de la forme colagenice și structuri de
24 agregare supramoleculară a acestora, sunt acceptate atât în medicina regenerativă, sub forma
25 implanturilor microfibrilare purtătoare de celule special cultivate, cât și în medicina curativă, sub
26 forma vectorilor unor specii farmaceutice sau al factorilor de modulare a activității celulare (Suh
27 H. - **Collagen Fabrication for Cell-based Implants in Regenerative Medicine, in Cell and
28 Tissue Research** (Editori: Artmann G. M., Chien S.), Springer Verlag, Berlin, 2008, pp. 159-
29 192, Helary C, Foucault-Bertraud A., Godeau G., Coulomb B., Giraud Guille M. M.,
30 **Fibroblast populated dense collagen matrices: cell migration, cell density and
31 metalloproteinases expresion**, Biomaterials, 2005, 26 (13), pp. 1533-11543, Keely J. P.,
32 **Cell Matrix Adhesion in Three Dimensions**, în Cell Junctions, Adhesion, Development and
33 Disease (Editori: LaFlamme S. E., Kowalczyk A.), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KgaA,
34 Darmstadt, 2008, pp. 135-149, și 5. Jiang H., Grinnell F., **Cell-Matrix Entanglement and
35 Mechanical Anorage Fibroblasts in Three-dimensional Collagen Matrices**, Molecular
36 **Biology of the Cell**, 2005, 16, pp. 5070-5076). Principalul motiv pentru care, la ora actuală,
37 colagenul extras și purificat pornind de la surse naturale depășește încă performanțele
38 polimerilor biocompatibili de sinteză rezidă în abilitatea fibroblastelor de a recunoaște
39 reactivitatea și morfologia locală, particulare, ale unor tronsoane ale macromoleculei sale triplu-
40 helicale. Chiar și *in vitro*, toate ciclurile de viață ale fibroblastelor sunt declanșate sau facilitate
41 de prezența agregatelor colagenice de tip microfibrilar (Heath J. K., **Biology of the Cell Cycle,
42 în Principles of Cell Proliferation**, Blakwell Science Ltd., London, 2001, pp. 1-17). Sistemul
43 de semnalizare celulară asupra caracterului cito-prietenos al substratului implică, în cazul
44 fibroblastelor, cel puțin două clase de mediatori prezenți la nivelul membranei celulare,
45 respectiv, integrinele și sindecanii (Morgan M. R., Humphries M. J., Bass M. D., **Synergistic
46 controll of cell adhesion by integrins and syndecans**, Nature Reviews: Molecular Cell
47 **Biology**, 2007, 8, pp. 957-969). Stimularea acestora de către situsurile complementare

specifice triplului helix colagenic determină recunoașterea substratului ca fiind biocompatibil (Xu 1
 Y., Gurusiddappa S., Rich R. L., Owens R. T., *Multiple Binding Sites in Collagen Type I* 3
for Integrins $\alpha_1\beta_1$ and $\alpha_2\beta_1$, *The Journal of Biological Chemistry*, 2000, 50, pp. 38981-
 38989). Structurile macromoleculare de sinteză nu pot mima în mod satisfăcător funcționalitatea 5
 domeniilor specifice, plasate în regiunea triplu-helicală a colagenului fibrilar, ce funcționează
 drept declanșatori ai recunoașterii substratului de către fibroblaste. Grefarea pe catenele 7
 (co)polimerilor de sinteză a unor peptide cu secvența necesară recunoașterii de către integrine,
 deși este o soluție testată deja, nu asigură încă densitatea necesară a domeniilor cu rol de 9
 semnalare, și nici poziționarea spațială corectă și suficient de rigidă a acestora, astfel încât ele
 să devină eficiente în raport cu integrinele (Chollet C, Chanseau C, BrouiUaud B., Dunieu M.
 C., *RGD Peptides grafting onto polyfethylene terephthalate) with well controlled densities*, 11
Biomolecular Engineering, 2007, 24, pp. 477-482, și Xu X., Hook M., Kim J. - US 0099244
 A1/2007). Colagenul fibrilar extras în stare cvasi-nativă din țesuturile conjunctive ale unor 13
 mamifere rămâne, așadar, singura sursă fezabilă pentru realizarea de structuri supramoleculare
 destinate aplicațiilor din ingineria tisulară și din sfera biomaterialelor, atunci când acestora li se 15
 impune restricția de biocompatibilitate necondiționată.

Două probleme majore au fost semnalate în tentativele de realizare a substraturilor cu 17
 componentă colagenică, puternic hidratate, de tip hidrogel, și anume: (i) asigurarea unui nivel
 suficient al rezistențelor fizico-mecanice, respectiv, (ii) inducerea unui comportament reologic 19
 controlabil. Ambele pot fi soluționate prin generarea de punți de reticulare cu caracteristici
 controlate între macromoleculele și/sau agregatele macromoleculare ale colagenului fibrilar ce 21
 stă la baza obținerii respectivelor substraturi. O modalitate pentru realizarea unor astfel de punți
 constă în generarea de rețele intercuppate hibride, colagen - oligomeri sintetici. Literatura de 23
 brevete prezintă variante de realizare a unor astfel de rețele ce includ colagen (Kuzma P.,
 Odorisio G. - US 33997/1992, Scholz M. T. - US 4883864/1989 și Bucevschi M. D., Colț M. 25
 - US 6833488/2004) sau chiar proteine nefibrilare (Damodaran S., Hwang D.-C. - US
 5847089/1998). Deși brevetele citate afirmă că rețelele generate sunt biocompatibile sau cel 27
 puțin biotolerabile, principala deficiență a acestora constă în faptul că includ forme colagenice
 denaturate, ori care se denaturează în cursul sintezei, precum și o serie de compuși citotoxici, 29
 în special urme de monomeri nereacționați și inițiatori ai polimerizării. Din acest motiv produsele
 de tip hidrogel obținute nu pot fi utilizate în aplicații ce implică însămânțarea lor *ex-vivo* cu 31
 celule, ori bioinvadarea lor de către celule, după grefarea la nivelul țesuturilor conjunctive.

Study on the crosslinking-induced radical intercoupling between atelocollagen 33
and in situ-generated (co)polymers, Maier S. S., Maier V., Pruneanu M, 07.04.2008, prezintă 35
 un studiu cu privire la obținerea de rețele colagenice interpătrunse și intercuppate, care implică
 lanțuri scurte de (co)polimeri ca punți de reticulare, cu scopul de a obține hidrogeluri cu 37
 personalitate reologică definită, care să permită manipularea convenabilă în tehnicile de
 cultivare celulară. Etapele implicate sunt: (i) obținerea de entități tactoidale de atelocolagen, prin 39
 reticulare asistată de transglutaminază, (ii) conjugarea atelocolagenului cu glicidil-metacrilat
 (GMA), cu scopul de a-i atașa funcții etilenice nesaturate, și (iii) implicarea acestor funcții în 41
 reacții de (co)polimerizare cu GMA sau cu alți monomeri biotolerabili. Procesul de
 (co)polimerizare este indus la temperatură scăzută (sub 6°C), folosind un amestec inițiator 43
 ternar ce include H₂O₂, acid ascorbic (AA) și acid uric (UA). Compoziția optimă a amestecului,
 care asigură un timp de gelifiere minim (640 min) și o consistență maximă a hidrogelului 45
 (0,61 Pa·s), cuprinde 0,67 H₂O₂, 0,22 AA și 0,11 UA, exprimate ca fracții de masă.

1 **Preliminary study on a biotolerable ternary system acting as a redox initiator,**
2 **Maier S. S. , Maier V., Pruneanu V., 21.03.2008**, descrie inițierea radicalică a reticulării într-un
3 amestec model de 19:1 acrilamidă : N,N'-metilen-bis-actilamidă, realizată la temperatură
4 scăzută (sub 6°C), folosind un amestec inițiator ternar ce conține perhidrol (H₂O₂), în calitate de
5 inițiator radicalic, acid ascorbic (AA) drept activator, și acid uric (UA) ca promotor și modulator
6 al proceselor radicalice. Sistemul de inițiere conține numai componente biotolerabile ce pot fi
7 utilizate pentru obținerea de hidrogeluri macromoleculare compozite între scleroproteine și
8 oligomeri generați *in situ*, utilizabile în ingineria tisulară. Studiul stabilește: (i) compoziția optimă
9 a amestecului inițiator (raport molar H₂O₂:AA:UA de 1:1:0,1), (ii) raportul molar fezabil între
10 monomer și inițiator (de 1:0,021) și (iii) concentrația minim fezabilă de H₂O₂ care determină
11 simultan consistența maximă a hidrogelului și volumul minim de apă eliminată prin sinereză, ca
12 urmare a reticulării.

13 Problema pe care o rezolvă invenția este legată de realizarea unor rețele hibride,
14 atelocolagen - (co)polimeri de sinteză, în care cele două componente sunt neregulat
15 intercuppate covalent, în virtutea faptului că scurtele lanțuri (co)polimere sunt generate *in situ*,
16 prin mecanism radicalic, după ce, în prealabil, agregatele supramoleculare atelocolagenice, de
17 tip microfibrilar, au fost funcționalizate utilizând monomeri etilenici biotolerabili. Structura de tip
18 rețea hibridă neregulat intercuppată, rezultată, păstrează caracterul dominant, conferit de către
19 componenta atelocolagenică, fiind înalt hidrofilă, și funcționând drept hidrogel cu caracteristici
20 fizico-chimice, fizico-mecanice și reologice modulabile prin formularea amestecului de reacție
21 și prin intermediul parametrilor de conducere a procesului de (co)polimerizare radicalică
22 reticulantă.

23 Procedeul conform invenției înlătură dezavantajele de mai sus prin aceea că decurge
24 în următoarele etape succesive, dependente și interconținute, derulate exclusiv în condiții
25 nenedenaturante pentru componenta scleroproteică:

26 (i) - prepararea specifică a reactivilor și a amestecurilor de reactivi, în vederea aducerii
27 acestora la parametri fizico-chimici impuși de condițiile particulare de lucru în generarea
28 rețelelor intercuppate cu componentă atelocolagenică;

29 (ii) - prepararea specifică a precursorului proteic, pornind de la soluții coloidale de
30 atelocolagen hipoimunogen, în vederea inducerii de punți de reticulare selectivă, ce nu
31 intercalează specii chimice mic-moleculare;

32 (iii) - funcționalizarea preliminară a precursorului proteic, prin grefarea cu compuși
33 chimici cu moleculă mică bifuncționali, nesaturați și, respectiv, hidrofobi;

34 (iv) - (co)polimerizarea radicalică a precursorului proteic funcționalizat cu (co)monomeri
35 nesaturați bifuncționali, utilizând un sistem de inițiere activ la temperaturi joase, alcătuit doar
36 din specii chimice biocompatibile;

37 (v) - condiționarea fizico-chimică a produsului de (co)polimerizare, în vederea pregătirii
38 acestuia pentru aplicații din domeniul biomedical.

39 Prin aplicarea invenției se obțin următoarele avantaje:

40 - se asigură obținerea unor rețele hibride intercuppate, cu caracteristicile unui hidrogel
41 al cărui comportament reologic pseudoplastice poate fi controlat prin parametri de receptură ai
42 (co)polimerizării, pentru a dobândi consistențe (numite și viscozități dinamice aparente) cuprinse
43 între 500 și 900 mPa · s, măsurate în plaja de pH 7,2 ÷ 7,8, la conținuturi de apă de 65 ÷ 85%
44 sau mai mari; acești parametri finali ai hidrogelului fac posibilă utilizarea sa în gama de aplicații
45 vizată prin obiectivele invenției;

46 - se asigură obținerea de substraturi gelificate, caracterizate prin morfologie internă, la
47 nano- și micro-scară, generată de către agregatele supramoleculare tactoidale atelocolagenice,
incluse în rețele (co)polimere laxe, sintetizate recurgând doar la (co)monomeri biotolerabili;

RO 125508 B1

- se elimină caracterul citotoxic și imunogen al substraturilor gelificate, făcându-le apte 1
utilizării biomedicale și din ingineria tisulară;
- se asigură o inițiere radicalică non-agresivă asupra componentei atelocolagenice, deși 3
face apel la specii radicalice oxidante; acest fapt este posibil deoarece recurge la un sistem
ternar (tricomponent) de inițiere radicalică a (co)polimerizării, activ la temperaturi joase, 5
cuprinse între 2 și 10°C, precum și în medii apoase aglomerate și cu tărie ionică ridicată;
sistemul de inițiere radicalică include doar specii chimice biotolerabile, lipsite de caracter 7
citotoxic;
- se asigură menținerea predominanței caracterului scleroproteic al rețelei intercuplate 9
hibride, prin faptul că recurge la un amestec de specii chimice cu rol de protecție a stării native
a atelocolagenului. 11
- În plus, prezenta invenție soluționează problema prezenței în hidrogelul final a urmelor 13
de monomeri nereacționați și de inițiatori citotoxici, asigurând obținerea de substraturi înalt
biocompatibile, posibil de utilizat în vederea însămânțării cu celule. Dat fiind faptul că forma 15
atelocolagenică utilizată este hipoimunogenă, hidrogelul rezultat nu declanșează reacții de
respingere la nivel tisular, putând fi grefat în țesuturile conjunctive sănătoase sau divers 17
afectate. În virtutea caracteristicilor de agregare supramoleculară controlată a formei atelocola-
genice utilizate, și dat fiind faptul că aceasta își păstrează caracterul nativ, hidrogelul rezultat 19
dobândește o morfologie internă apropiată de cea a țesuturilor conjunctive, la nano- și la micro-
scară, stimulând astfel bioinvadarea și proliferarea fibroblastelor provenite din țesuturile 21
subiacente, pe care este grefat.
- În principiu, procedeul pentru obținerea rețelelor neregulat intercuplate hibride, de tip 23
colagen -(co)polimeri de sinteză, cu proprietăți de hidrogel, implică parcurgerea următoarelor
etape (**Maier S. S., Maier V., Pruneanu M., Study on the crosslink-induced radical 25**
**intercoupling between atelocollagen and in situ-generated (co)polymers, Scientific Study
and Research, 2008, 9 (2), pp. 213-220):**
- i. generarea de agregate supramoleculare atelocolagenice cvasi-ordonate spațial, 27
caracterizate prin morfologie tactoidală, suficient de compacte și stabile structural, cu
dimensiuni în plaja nano (60 ÷ 100 nm) și micro (100 ÷ 500 nm); 29
- ii. funcționalizarea chimică superficială a agregatelor tactoidale, în vederea pregătirii lor 31
pentru implicarea în reacții de (co)polimerizare reticulantă prin mecanism radicalic;
- iii. intercuplarea laxă a agregatelor tactoidale funcționalizate, prin generarea de punți 33
covalente cu lungimi și poziții de grefare variabile, neramificate sau doar slab ramificate,
alcătuite din lanțuri oligomere ce includ unul sau mai multe tipuri de unități merice provenite din 35
monomeri etilenici, (co)polimerizabili prin inițiere radicalică.
- Condiția esențială privind conducerea proceselor prin care decurg cele trei etape este 37
menținerea stării cvasi-native a moleculelor de atelocolagen, lucrând la temperaturi coborâte
(uzual sub 10°C), în prezența unor agenți protectori ai structurii terțiare și cuaternare a proteinelor. 39
În plus, speciile atelocolagenice utilizate trebuie să fie non-imunogenice ori să posede
hipoimmunogenicitate certă. De asemenea, toți compușii mic moleculari utilizați (monomerii, 41
inițiatorii radicalici, compușii cu rol protector, agenți de conservare etc.) trebuie să fie bio-
tolerabili la nivel tisular, și lipsiți de acțiune citotoxică, astfel încât hidrogelurile rezultate să poată 43
fi utilizate în domeniile și în scopurile vizate în cadrul invenției.
- Soluția coloidală de atelocolagen hipoimunogen, utilizabilă în atingerea obiectivelor 45
citate, trebuie să aibă inițial, în soluția stoc, concentrația în atelocolagen de 1,2 ÷ 1,8%, mediul
lichid fiind alcătuit din soluție 0,01 M acid clorhidric în apă deionizată liberă de pirogeni, cu 47
adaos de 0,2 M clorură de sodiu. Forma proteică trebuie solubilizată doar prin tratamente
enzimatice, și trebuie supusă mai întâi unui tratament puternic alcalin, de scurtă durată, cu

RO 125508 B1

1 scopul inactivării eventualilor prioni, iar apoi ultrapurificării prin degradarea enzimatică a tuturor
moleculilor al căror triplu helix a fost alterat în etapele anterioare. Forma atelocolagenică astfel
3 procesată trebuie să aibă punctul izoelectric în plaja 8,2 ÷ 8,6 unități de pH, și un conținut minim
de grupări amidice de 0,58%. Înaintea utilizării, soluția stoc trebuie supusă schimbării mediului
5 lichid, prin diafiltrare peste membrane cu MWCO de 100 kD, cu o soluție tampon HEPES cu
pH-ul de 7,4.

7 Menținerea stării cvasi-native a macromoleculilor de atelocolagen, în toate etapele mai
sus enumerate, trebuie asigurată utilizând o compoziție lichidă special formulată, ce conține
9 specii chimice mic moleculare sau oligomere, cu acțiuni protectoare asupra integrității triplului
helix. În principiu, respectivele amestecuri includ săruri anorganice active drept cosmotropi, și,
11 ca regulatori ai ionizării, compuși organici cu rol de coloid protector, compuși organici oligomeri
cu efect de aglomerare moleculară, compuși organici regulatori ai constantei dielectrice a
13 mediului lichid, tensioactivi lipsiți de capacitate denaturantă, compuși organici cu rol de tampon
de pH, agenți de chelatare a ionilor grei, agenți cu efect micelizant, antibiotice și antifungice.

15 Obiectivele primei etape, de generare a agregatelor atelocolagenice tactoidale stabile
și compacte, sunt îndeplinite prin inducerea de punți de reticulare cu lungime zero între
17 macromoleculile de atelocolagen hipoimunogen, sub acțiunea unei enzime, transglutaminaza
(EC 2.3.2.13) extrasă din ficat sau izolată din mediile de cultură ale unor microorganisme.
19 Pentru a asigura controlul densității de reticulare enzimatică, se impune ca atelocolagenul
utilizat să conțină un număr suficient de grupări aminice, capabile să participe la realizarea de
21 punți covalente (grupările aminice ale lizinei). De asemenea, soluția coloidală atelocolagenică
trebuie să aibă o concentrație suficient de ridicată pentru a asigura aglomerarea locală a
23 moleculilor, necesară pentru ca transglutaminaza să-și exercite acțiunea reticulantă. Dat fiind
faptul că transglutaminaza este o enzimă calciu-dependență, aglomerarea locală poate fi
25 realizată prin gelifierea fizică a soluției atelocolagenice, mediată de ionii de calciu bivalent, care,
chiar la o concentrație coborâtă, realizează punți ionice intra- și inter-moleculare suficient de
27 stabile. Pe această cale sunt asigurate concomitent două efecte favorabile asupra mecanisme-
lor de reticulare enzimatică, respectiv, asocierea preliminară a macromoleculilor de atelocola-
29 gen, și activarea locală a transglutaminazei.

31 Dacă la finalul tratamentului de reticulare se impune inactivarea transglutaminazei, acest
efect se poate realiza utilizând inhibitori specifici, cum sunt iodura de β-fenil-propionil-tiocolină
sau N-benziloxycarbonil-L-fenilalanil-6-dimetilsulfoniu-5-oxo-L-norleucina. Aceștia sunt substi-
33 tuenți înalt eficienți ai substratului proteic, blocând situsul activ al respectivei enzime. Un efect
de inhibare mai puțin intens poate fi obținut prin adaosul unui agent de chelatare a ionilor de
35 calciu.

A doua etapă, cea de funcționalizare a structurilor tactoidale, implică grefarea unui
37 număr suficient de funcțiuni etilenice nesaturate, capabile să participe ulterior la reacții de
(co)polimerizare. În acest scop se utilizează monomeri bifuncționali, în care, de preferință, una
39 dintre funcțiunile chimice este cea oxiranică, înalt reactivă în raport cu mai multe dintre grupările
de pe catenele aminoacidice laterale, mai ales față de cele carboxilice și aminice. Pentru a
41 limita inactivarea funcțiunii oxiranice în mediul apos, monomerul se dizolvă inițial într-un solvent
organic miscibil cu apa, după care soluția respectivă se diluează 1:2 ÷ 1:5 cu apă deionizată
43 liberă de pirogeni. În vederea dispersării rapide a soluției citate în mediul de reacție (constituit
din soluția amestecului de compuși cu rol protector al triplu-helixului), înaintea utilizării i se
45 adaugă 0,1 ÷ 0,4% tensioactiv neionogen nedenaturant. Modificând pH-ul mediului apos, parte-
nerul de reacție al funcțiunii oxiranice se poate selecta dintre grupările carboxil și cele aminice.
47 Creșterea tăriei ionice a mediului de reacție poate contribui la creșterea randamentului de
grefare a monomerului la grupările aminoacidice laterale, prin limitarea reacției funcțiunii
49 oxiranice cu apa, ori cu grupări ale altor compuși organici.

În vederea diminuării discrepantei între partenerii reacției de (co)polimerizare, respectiv, 1
 agregatele atelocolagenice înalt hidrofile și monomerii sintetici, în majoritate hidrofobi sau dificil 3
 de solubilizat în medii apoase aglomerate, înaintea declanșării (co)polimerizării se poate aplica 3
 un tratament de hidrofobizare controlată a agregatelor atelocolagenice tactoidale. Acest proces 5
 se realizează prin reacția formei proteice cu cantități mici de compuși oxiranici care posedă 5
 scurte lanțuri hidrofobe. Fiind ei înșiși greu solubili, respectivii compuși vor fi mai întâi emulsio- 7
 nați utilizând tensioactivi neionogeni nedenaturanți, în prezența unor mici cantități de solvent 7
 organic nedenaturant.

La finalul etapei de funcționalizare, sistemul coloidal rezultat se supune purificării, 9
 eliminându-se compușii mic moleculari inutili în etapa ulterioară. Procesele de purificare pot 9
 include cicluri repetate de diluare cu amestecul lichid de protectori ai stării native, urmate de 11
 separarea prin filtrare și/sau centrifugare. O ultimă operație de maturare poate fi aplicată. 11

A treia etapă, cea de intercuplare laxă a agregatelor tactoidale, este cea mai complexă. 13
 Ea implică generarea *in situ* a unor scurte punți de reticulare (co)polimere, pornind de la unul 13
 sau mai multe tipuri de monomeri etilenici și structurile tactoidale funcționalizate. Conducerea 15
 acestei etape implică formularea și utilizarea unui amestec sinergetic de compuși chimici cu 15
 efect de inițiere radicalică prin mecanism red-ox, perfect biotolerabil, capabil a genera radicali 17
 la temperaturi scăzute, dar pozitive, de regulă sub 10°C (**Maier S. S., Maier V., Pruneanu M.,** 17
Study on the crosslink-induced radical intercoupling between atelocollagen and in situ- 19
generated (co)polymers, Scientific Study and Research, 2008, 9 (2), pp. 213-220, și Maier 19
S. S., Maier V., Pruneanu M., Preliminary study on a biotolerable ternary system, acting 21
as redox initiator, Scientific Study and Research, 2008, 9 (1), pp. 17-26). Radicalii generați 21
 au eficacitatea necesară pentru a iniția procese de (co)polimerizare în medii cu compoziție 23
 complexă, aglomerate, în care speciile (co)polimerizabile se află în concentrații scăzute. 23

Pentru a asigura eficiența inițierii radicalice în condițiile citate, amestecul de inițiere 25
 formulat în cadrul invenției conține trei componente: un compus oxidant capabil a genera 25
 radicali de mici dimensiuni, caracterizați prin reactivitate și mobilitate ridicate, un activator al 27
 descompunerii radicalice și un modulator eficient al proceselor radicalice, capabil a acționa 27
 drept promotor în primele etape ale procesului de descompunere radicalică, iar apoi drept pro- 29
 tector împotriva degradării oxidative a componentei proteice din sistem. Speciile chimice selec- 29
 tate pentru a asigura cele trei efecte citate sunt: apa oxigenată, drept oxidant, acidul ascorbic, 31
 drept activator și acidul uric, drept modulator. Ambii acizi avuți în vedere, ascorbic și uric, induc 31
 suplimentar un efect protector asupra componentei atelocolagenice, acționând drept antioxidanți 33
 în raport cu aceasta, dar nu și în raport cu funcțiunea nesaturată a monomerilor utilizați, care 33
 este mult mai sensibilă la atacul radicalic. Toate cele trei specii chimice sunt biotolerabile și 35
 generează doar subproduși sau derivați biotolerabili. 35

Formularea amestecului de inițiere radicalică este supusă unor restricții generate de 37
 reactivitatea ridicată a apei oxigenate, dar și de caracteristicile fizico-chimice ale celorlalte două 37
 componente. Astfel, la concentrații ridicate în sistem, apa oxigenată induce două efecte: 39
 degradări semnificative ale proteinelor (**Shacter E., Quantification and significance of** 39
protein oxidation in biological samples, Drug Metabolism Reviews, 2000, 32 (3-4), pp. 41
307-326) și, respectiv, reticulări necontrolate prin mecanism radicalic (**Kodadeka T., Duroux-** 43
Richardb L, Bonnafous J.-C., Oxidative cross-linking as an emergent tool for the analysis 43
of receptor-mediated signalling events, Trends in Pharmacological Sciences, 2005, 26 (4), 45
pp. 210-217). Evitarea acestor efecte impune utilizarea de cantități mici și foarte mici de apă 45
 oxigenată. Acidul ascorbic este înalt sensibil la oxidarea indusă de către oxigenul atmosferic 47
 și cel solubilizat în mediul apos slab alcalin (**Meucci E., Martorana G. E., Ursitti A., Pischiutta** 47

RO 125508 B1

1 **M. G., Miggiano G. A., Castelli A., *Ascorbic acid stability in aqueous solutions, Acta***
2 ***Vitaminology and Enzymology*, 1985,7(3-4), pp. 147-153**), inactivându-se rapid și diminuând
3 concentrația formei sale active în soluție. De aceea fie va fi supradozat față de cantitatea
4 necesară în amestecul de inițiere, fie se vor lua măsuri de dezaerare a sistemului de reacție,
5 prin menținere preliminară sub vid, suprasaturare cu un gaz inert și lucru în atmosferă inertă ori
6 de bioxid de carbon. Acidul uric prezintă o solubilitate deosebit de scăzută în apă (70 μg/ml, la
7 20°C) (**Wang Z., Siedel J., Wolf G., Konigsberger E., *Dissolution enthalpies of uric acid***
8 ***and uric acid dihydrate, Thermochemica Acta*, 2000, 354, pp. 7-13**), mai ales în prezența
9 glucozei [**19. Elgawish A., Glomb M., Friedlander M., Monnier V. M., *Involvement of***
10 ***Hydrogen Peroxyde in Collagen Cross-linking by High Glucose in vitro and in vivo, The***
11 ***Journal of Biological Chemistry*, 1996, 271 (22), pp. 12964-12971**), ce se reduce suplimentar
12 în soluții aglomerate. De aceea, acesta trebuie adus și utilizat sub formă de dihidrat proaspăt
13 recristalizat, iar calculele de formulare a amestecului de inițiere radicalică trebuie să pornească
14 de la concentrația maxim posibilă a acidului uric în mediul de reacție dat.

15 Cei doi acizi utilizați în sistemul ternar de inițiere radicalică oxidativă a (co)polimerizării
16 se vor purifica înainte de utilizare, pornind de la produsele comerciale. În practică s-a constatat
17 faptul că, dată fiind participația redusă a acidului uric în formula amestecului de inițiere, atunci
18 când impuritățile din produsul comercial depășesc circa 0,3 ÷ 0,8%, fracția formei active se
19 reduce semnificativ, diminuând abilitatea sa de a controla efectele secundare ale speciei
20 radicalice oxidante asupra formei proteice. În cazul acidului ascorbic, cinetica de solubilizare
21 trebuie să fie suficient de rapidă pentru a furniza în toată masa sistemului de reacție cantități
22 suficiente de activator al descompunerii apei oxigenate, înainte ca alți oxidanți din sistem să îi
23 diminueze concentrația.

24 Preliminar (co)polimerizării, mediul de reacție se pregătește prin dozarea precisă a
25 formei atelocolagenice funcționalizată și apoi a amestecului de inițiere radicalică. În funcție de
26 natura monomerului oxiranic utilizat în etapa de funcționalizare a tactoizilor atelocolagenici, și
27 în funcție de aplicarea sau nu a pretratamentelor de hidrofobizare controlată, se prevăd timpi
28 suficienți pentru inducerea caracterului radicalic la nivelul grupărilor nesaturate din sistemul de
29 reacție. (Co)polimerizarea propriu-zisă se conduce dozând (co)monomerii etilenici, individual
30 sau sub formă de amestec preformat, incluși sau nu în miclele de tensioactiv neionogen
31 nedenaturant, în funcție de solubilitatea lor în mediul apos aglomerat, și de stabilitatea funcțiilor
32 lor reactive în respectivele condiții. Energizarea proceselor de difuzie și reacție a (co)mono-
33 merilor se poate realiza doar prin tehnici nedenaturante, eficiente la temperaturi scăzute,
34 preferate fiind curgerea turbulentă prin tuburi cu diametrul interior de ordinul 1 ÷ 5 mm, sau
35 ultrasonarea.

36 Toate procesele celei de-a treia etape se conduc în condiții sterile, la temperaturi sub
37 10°C. Date fiind sensibilitatea la denaturare a componentei scleroproteice și cinetica lentă a
38 proceselor de difuzie cu reacție în medii aglomerate, se impune alternarea unor perioade de
39 energizare cu a unora de maturare statică, astfel încât derularea reacțiilor chimice să fie
40 favorabilă formării de punți oligomere între tactoizii atelocolagenici. Un echilibru particular
41 trebuie realizat între duratele și cadențele celor două procese citate, de energizare și de
42 maturare. Energizarea excesivă, mai ales prin ultrasonare, poate conduce la denaturarea
43 componentei atelocolagenice, în timp ce duratele prelungite de maturare favorizează generarea
44 de rețele semi-interpenetrate, în care tactoizii atelocolagenici nu sunt implicați covalent, ci doar
45 reținuți fizic în ochiurile laxe ale (co)polimerului de sinteză haotic reticulat. O predominantă a
energizării este recomandată, în condițiile supravegherii efectelor și reglării intensității acesteia.

RO 125508 B1

În continuare se prezintă două exemple de realizare a invenției.	1
<i>Exemple de aplicare a procedurii descrise în invenție</i>	
Descrierile ce urmează au titlu exemplificativ din următoarele puncte de vedere:	3
- sursa colagenică (organul, structura anatomică, țesutul de start);	
- tipul de atelocolagen utilizat (provenit din colagen de tipul I, II sau III);	5
- natura și cantitățile de specii chimice (reactivi și/sau adjuvanți) utilizate;	
- parametrii de operare (timp, temperaturi, pH-uri, regimuri hidrodinamice ale agitării,	7
tipuri și regimuri de energizare a proceselor, moduri și regimuri de maturare, regimuri de	
termostatare, rapoartele masice între forma proteică și speciile chimice mic moleculare);	9
- ordinea, cadența, repetarea proceselor și operațiilor din fluxul operațiilor de generare	
a rețelei cu caracteristici de hidrogel.	11
Toate elementele enumerate admit variații ce țin de alegerea și dozarea speciilor	
chimice utilizate (similare acțiunii, rolului și eficacității în raport cu cele incluse în descrierile	13
exemplificative), și de plajele uzuale de formulare a amestecurilor de inițiere și de reacție.	
Exemplele vizează obținerea rețelelor hibride de tip hidrogel la nivel de laborator și semi-	15
industrial. Pentru asigurarea fezabilității proceselor, șarjele medii pornesc de la 300 ÷ 3000 mL	
soluție coloidală atelocolagenică, la nivel de laborator, respectiv, de la 10 ÷ 50 L soluție	17
coloidală atelocolagenică, la nivel semiindustrial. Anterior procesării la nivel semiindustrial,	
soluțiile coloidale atelocolagenice de start se supun unei concentrări suplimentare, prin ultra-	19
filtrare tangențială, până la un raport de 4:1 față de cele procesate la nivel de laborator. Date	
fiind diferențele între timpii de rezidență în utilaje și racorduri, comparativ cu lucrul la nivel de	21
laborator, în toate soluțiile utilizate la nivel semiindustrial se dozează un antibiotic rezistent la	
condițiile de lucru, lipsit de cicluri de carbohidrați, de preferință din clasa antibioticelor de	23
semisinteză, așa cum este doxiciclina hclat (monoclorhidrat - hemietanolat - hemihidratul de	
doxiciclină). Deoarece majoritatea antibioticelor interferează în metabolismul celulelor cultivate pe	25
substraturi artificiale [spre exemplu, doxiciclina inhibă proliferarea și migrarea celulară, precum	
și activitatea matrix-metallo-proteinazelor, MMP (Franco C., Ho B., Mulholland D., Hou G.,	27
Islam M., Donaldson K., Bendeck M. P., <i>Doxycycline Alters Vascular Smooth Muscle Cell</i>	
<i>Adhesion, Migration, and Reorganization of Fibrillar Collagen Matrices, American Journal</i>	29
<i>of Pathology, 2006, 168 (5), pp. 1697-1709</i>); fiind unul dintre cei mai puternici inhibitori ai MMP	
bacteriene (Golub L. ML, Lee H.-M., Ryan M. E., Giannobile W. V., Payne J., Sorsa T.,	31
<i>Tetracyclines Inhibit Connective Tissue Breakdown by Multiple Non-Antimicrobial</i>	
<i>Mechanisms, Advances in Dental Research, 1998, 12, pp. 12-26</i>), doxiciclina poate evita	33
însă degradarea componentei atelocolagenice în prezența unor microorganisme rezistente la	
acest antibiotic], gelurile obținute la nivel semiindustrial vor fi eliberate, la final, de urmele de	35
antibiotic, prin difuzie prelungită contra unor soluții tampon sterile.	
Exemplul 1	37
<i>Obținerea rețelelor hibride, neregulat intercuppate, cu caracteristici de hidrogel</i>	
Se pornește de la o soluție coloidală de atelocolagen hipoimunogen ultrapurificat, cu	39
următoarele caracteristici: pH = 2,0 ÷ 2,2 (acid clorhidric 0,01 M), eliberată de săruri prin	
diafiltrare, concentrație 2,2 ÷ 2,8 g/L formă proteică, conținut de formă nativă 96 ÷ 2%, pH	41
izoelectric 8,2 ÷ 8,6, conținut de grupări aminice libere 0,55 ÷ 0,63%, sub 1% fracții proteice	
inferioare valorii de 100 kDa, sub 3% agregate colagenice superioare valorii de 1000 kDa.	43
Exemplul 1.1.	
<i>Fluxul general al operațiilor de obținere</i>	45
Procedul de obținere a rețelelor hibride, neregulat intercuppate, atelocolagen -(co)poli-	
meri generați <i>in situ</i> , implică parcurgerea următoarelor etape:	47
(i) prepararea soluțiilor și precursorilor necesari;	
(ii) obținerea hidrogelului fizic de atelocolagenat de calciu;	49

RO 125508 B1

1 (iii) obținerea agregatelor tactoidale de atelocolagen;
2 (iv) funcționalizarea superficială controlată a gregatelor tactoidale de atelocolagen;
3 (v) (co)polimerizarea reticulantă controlată, prin mecanism radicalic a tactoizilor
4 funcționalizați cu (co)monomeri etilenici. La final se obțin hidrogeluri laxe, cu caracteristici fizico-
5 chimice, fizico-mecanice și cu comportamente reologice reproductibile, reglabile prin parametrii
6 receptorilor aplicate, mai ales prin cei ai ultimei etape.

7 **Exemplul 1.2**

Prepararea soluției de agenți protectori ai stării native a atelocolagenului

8 Soluția va conține următoarele componente: (i) săruri anorganice cosmotrope, cu efect
9 suplimentar de control al ionizării, respectiv: 136 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 0,42 mM NaH₂PO₄,
10 12 mM NaHCO₃, (ii) un agent de inhibare sau de retardare a tendinței naturale de supraagrega-
11 gare moleculară a atelocolagenului, respectiv, 5,5 mM glucoză, (iii) un agent de stabilizare
12 conformațională a domeniului triplu-helical, respectiv, 10 mM Triton X 100, (iv) un agent de limi-
13 tare a tendinței de micelizare în sistemul coloidal, sub influența tensioactivului neionogen, res-
14 pectiv, 25 mM 1,2-etandiol, (v) un agent de limitare a tendinței de hidratare excesivă a formelor
15 atelocolagenice, în condițiile unei tensiuni superficiale coborâte, respectiv, 5% glicerină pură,
16 (vi) un antibiotic de semisinteză, care interacționează minimal cu metabolismul celulelor ce
17 urmează a fi cultivate, sau care vor bioinvada hidrogelul, respectiv, 0,75 g/l doxiciclină hclat,
18 (vii) un agent pentru stabilizarea pH-ului în zona fiziologică, respectiv, 5 mM HEPES (tampon
19 pentru pH 7,4). Pentru preparare se utilizează apă deionizată, liberă de pirogeni, adusă la
20 temperatura de 8 ÷ 10°C. Mai întâi se solvă sărurile anorganice, în ordinea din enumerarea de
21 mai sus, apoi se adaugă HEPES și se verifică valoarea pH-ului soluției, precum și capacitatea
22 de tamponare. În continuare, sub agitare energetică, se adaugă glucoza, iar după completa solu-
23 bilizare se dozează glicerina și doxiciclina hclat. Soluția se termostatează la 4°C și se lasă la
24 maturare timp de 24 h, în condiții statice, la întuneric. Între timp, volumul necesar de tensioactiv
25 se diluează 1:20, sub agitare lentă, evitând spumarea, iar apoi se adaugă diolul și se termo-
26 statează la 4°C. Cele două soluții apoase se supun dezaerării la rece, prin menținere sub vid
27 moderat (50 ÷ 150 Pa) timp de 6 ÷ 18 h. La final, soluția cu tensioactiv se adaugă, prin prelin-
28 gere în fir subțire, peste soluția tamponată, sub agitare lentă, în condiții de termostatare la 4°C.
29 O maturare suplimentară, de 6 ÷ 18 h, se impune înaintea utilizării. Pentru evitarea introducerii
30 unor posibile impurități în mediul de sinteză a rețelei intercuppate hibride, soluția amestecului
31 de agenți protectori se supune centrifugării la 1000 ÷ 3000 g, în condiții de termostatare la 4°C,
32 timp de 20 ÷ 60 min. Pentru utilizare, se prelevă doar cele două treimi superioare din flaconul
33 centrifugei. Dacă soluția finală se stochează perioade îndelungate, după fiecare 48 h se supune
34 dezaerării statice sub vid, în condiții de termostatare la 4°C, timp de 6 ÷ 18 h.

35 **Exemplul 1.3**

Prepararea soluției de transglutaminază

36 Transglutaminaza extrasă din ficatul mamiferelor (EC 2.3.2.13, CAS 80146-85-6) se
37 stochează, sub formă liofilizată, la temperatura de -20°C, în absența umidității. Soluția necesară
38 inducerii reticulării la nanoscară se prepară doar înaintea utilizării, urmând procedura descrisă
39 în continuare. Cantitatea calculată se aduce într-un flacon din sticlă deschis, ce se menține la
40 o temperatură cât mai apropiată de 0°C, timp de 0,5 ÷ 3 h, într-o atmosferă cu umiditatea
41 relativă de 60 ÷ 85%. În continuare, peste pulberea parțial rehidratată se adaugă, în picături,
42 o soluție 10 mM de 1,4-bis-sulfanilbutan-2,3-diol (CAS 16096-97-2) în tampon HEPES cu pH-ul
43 de 6,8 unități, adusă la 4°C. În vederea ampastării, diluării și apoi dizolvării enzimei într-o
44 cantitate minimă de lichid, vasul din sticlă se agită prin rotire - unduire pe baie de termostatare,
45 crescând temperatura cu 0,25 ÷ 1°C/min, până la 15 ÷ 20°C. După menținerea la această
46 temperatură, se adaugă soluția de transglutaminază și se agită în continuare la această temperatură
47 timp de 15 ÷ 30 min.

RO 125508 B1

temperatură timp de 20 ÷ 60 min, temperatura băii de termostatare (și a soluției cu enzimă) se scade, cu aceeași pantă, până la 4°C. Soluția de transglutaminază se prepară extemporaneu, dar se poate stoca timp de maximum 48 h, la 4°C. După perioade mai lungi, activitatea enzimatică a transglutaminazei tinde să scadă rapid, soluția devenind inutilizabilă după circa 120 h.

Exemplul 1.4

Prepararea precursorilor amestecului de inițiere radicalică

Forma anhidră comercială a acidului uric are o solubilitate nesatisfăcătoare în condițiile de lucru. De aceea se convertește în cristalohidratul dihidrat corespunzător, aplicând protocolul explicat în continuare. Pulberea anhidră se suspendă 1:400 în apă deionizată, liberă de pirogeni. Suspensia se aduce la fierbere și apoi i se adaugă, în fir subțire, același tip de apă, preîncălzită la 90°C, până la un raport de diluție de 1:4000, urmărind evoluția solubilizării pulberii. După răcirea până la 80°C, soluția se introduce într-un vas ce poate fi ermetic închis, adăugându-i-se acid acetic glacial, anterior filtrat prin membrane cu porozitatea de 0,22 μm, până ce valoarea pH-ului atinge 3 unități. În condiții etanșe, temperatura soluției acide se ridică la 105°C și se menține timp de 3 ÷ 9 h sub agitare lentă. Apoi soluția se filtrează, caldă încă, peste site metalice preîncălzite, recirculând-o la filtrare până când temperatura sa atinge 80°C. În aceste condiții, soluția se răcește brusc, mai întâi prin prelingere peste pereți răciți și apoi prin purjare cu gheață carbonică, până când atinge temperatura de 8 ÷ 10°C. După o nouă filtrare, soluția se termostatează la 4°C și se menține timp de 3 ÷ 12 h, urmărindu-se formarea dihidratului acidului uric. La final, soluția se agită energetic și se supune filtrării, reținându-se cristalele. Acestea se spală abundant, pe filtru, utilizând apă deionizată liberă de pirogeni, apoi se usucă sub vid. În formă de cristalohidrat dihidrat, acidul uric se poate stoca, sub vid sau în condiții de umiditate scăzută, atât timp cât cristalele rămân translucide, dar nu mai mult de 90 de zile.

Acidul ascorbic se purifică prin recristalizare repetată, cu formarea de particule de dimensiuni uniforme, în plaja 100 ÷ 300 μm, parcurgând protocolul descris în continuare. Produsul anhidru comercial se dizolvă în apă complet deionizată, liberă de pirogeni, pentru a forma o soluție saturată, de 400 g/L, la 50 ± 2°C. Caldă încă, această soluție se adaugă, în picături, sub agitare energetică, peste un volum de zece ori mai mare de amestec apă:acetat de etil cu raportul 1:100 ÷ 2,5:100. Agitarea energetică se menține încă 30 ÷ 90 min după încheierea picurării soluției saturate de acid ascorbic. În continuare, suspensia se centrifughează 10 ÷ 30 min la 2500 g. Supernatantul se îndepărtează prin sucțiune, iar sedimentul se acoperă imediat cu alcool etilic absolut. Pasta obținută se usucă sub vid moderat, la 30 ÷ 60°C, observându-se forma și dimensiunile cristalelor dezvoltate. După completa uscare, cristalele se redizolvă în 400 ÷ 600% alcool etilic absolut, iar soluția se centrifughează 30 ÷ 45 min la 3600 g. Patru cincimi din supernatant se recuperează prin sucțiune, iar apoi, sub agitare lentă, se adaugă eter etilic până la raportul alcool:eter de 1:0,4 ÷ 1:0,7, când acidul ascorbic recristalizează. După sedimentare, supernatantul se recuperează, iar pasta se usucă mai întâi sub vid moderat, la 30 ÷ 60°C, iar apoi în curent de azot uscat. Cristalele astfel obținute se păstrează sub pernă de azot, în recipiente ermetic închise, putându-se stoca astfel, practic, nelimitat în timp.

Exemplul 1.5

Pregătirea soluției coloidale de atelocolagen

Soluția inițială stoc de atelocolagen hipoimunogen ultrapurificat, cu pH = 2,0 ÷ 2,2, se aduce la parametrii necesari prin îndepărtarea acidului, urmată de echilibrarea formei proteice în soluția agenților protectori ai stării native. În funcție de cantitatea de atelocolagen necesară, îndepărtarea acidității se realizează prin neutralizare lentă (pentru lucrul la nivel de laborator, în șarje de până la 500 ml soluție stoc), sau prin liofilizare (pentru lucrul la nivel semiindustrial).

RO 125508 B1

1 În primul caz, peste soluția stoc, termostată la 4°C, se adaugă lent o soluție ce conține 0,1 M
Na₂HPO₄ și 0,5 M Na₂SO₄ (pH = 8,5 ÷ 9,0), până când nu se mai înregistrează variații de pH.
3 Precipitatul floconos obținut se lasă să sedimenteze și apoi se separă centrifugal (30 min la
1500 g). Sedimentul se spală abundant, pe filtru, cu apă deionizată liberă de pirogeni, răcită la
5 4°C, iar apoi se resuspendă în soluția agenților protectori, pentru a atinge o concentrație de
7 1,0 ÷ 1,6 g/l. În cel de-al doilea caz, soluția stoc se degazează mai întâi, prin menținere sub vid
9 moderat (50 ÷ 150 Pa, 6 ÷ 18 h), la 4°C, iar apoi se introduce în tăvi scunde, din polietilenă de
11 înaltă densitate, și se congelează la -18°C (pantă 0,5 ÷ 0,8°C/min, timp de menținere 16 ÷ 36 h),
13 apoi la -40°C (pantă 1,5 ÷ 3,5°C/min, timp de menținere 24 ÷ 72 h), de preferință sub vid
15 moderat (80 ÷ 240 Pa). În continuare, conținutul congelat al tăvilor se supune liofilizării după un
17 ciclu specific pozițiilor cu conținut proteic. Mai întâi, presiunea se reduce până la 5 ÷ 15 Pa
19 și se menține 1,5 ÷ 6,0 h, în condiții de termostatare la -42°C. Apoi temperatura se crește lent
21 (0,2 ÷ 0,8°C/min) până la -30°C, menținându-se sub aceeași presiune, timp de 24 ÷ 36 h. La
23 final, în condiții izobare, temperatura se crește până la 25°C, cu o pantă de 0,2 ÷ 0,6°C/min,
sistemul menținându-se la această temperatură timp de 8 ÷ 12 h. După creșterea lentă a
presiunii (10 ÷ 30 Pa/min), produsul liofilizat se răcește din nou, în liofilizator, până la 4°C, iar
apoi se împachetează sub vid. În aceste condiții, produsul liofilizat se poate stoca până la un
an la -20°C, fără a i se înrăutăți capacitatea de redizolvare. În vederea solubilizării produsului
uscat, acesta se condiționează mai întâi în atmosferă cu umiditatea relativă de 70 ÷ 85%, apoi
se ampastează cu mici adaosuri de soluție a protectorilor stării native, și se diluează cu aceeași
soluție, răcită la 4°C, până la o concentrație de 2,6 ÷ 3,8 g/l. Soluția se supune ultrasonării
(150 W, 22 kHz) la 4°C, timp de 3 ÷ 15 min, se diluează la 1,0 ÷ 1,6 g/l, ultrasonarea se repetă,
iar apoi se ultrafiltrează prin membrană din polisulfonă cu MWCO 500 kDa.

Exemplul 1.6

Obținerea hidrogelului fizic de atelocolagenat de calciu

25 Soluția coloidală de atelocolagen, pregătită conform prescripțiilor din exemplul 1.5, se
27 termostatează la 4°C, iar apoi se aduce la pH = 9,2, utilizând soluție 25% NH₄OH. În continuare,
sub agitare energetică, pentru fiecare 100 mL soluție se adaugă, sub formă solidă, în porții mici,
29 0,18 ÷ 0,20 g CaCl₂ · 6H₂O proaspăt uscată (105°C, 6 h), astfel încât concentrația sării de calciu
să atingă 0,8 mM. Sistemul se lasă spre maturare timp de 4 ÷ 12 h, sub agitare lentă prin
31 unduire, la 4°C. În aceste condiții, se obține o suspensie de flocoane friabile, albe, voluminoase.
Acestea se supun destructurării prin agitare energetică, rezultând o suspensie fină, stabilă, care
33 se lasă la maturare încă 16 ÷ 24 h, sub agitare lentă prin unduire, la 4°C. Apoi, suspensia se
diluează 1:2 ÷ 1:5 cu soluție slab alcalină (pH = 9,2, ajustat cu NaOH 0,05 M). După decantare
35 și centrifugare (1000 ÷ 3000 g, 10 ÷ 40 min), sedimentul se colectează și se resuspendă în
soluție a agenților protectori, cu pH-ul corectat la 9,2 (utilizând NH₄OH 25%), astfel încât să se
37 aducă la volumul inițial luat în lucru. Suspensia se termostatează la 4°C, apoi se ultrasonează
(350 W, 22 kHz) timp de 10 ÷ 40 min. Pentru eliminarea avansată a ionilor de Ca²⁺ în exces,
39 diluarea, decantarea, centrifugarea, resuspendarea, ultrasonarea se repetă încă de una până
la trei ori. La final, suspensia se degazează sub vid moderat (50 ÷ 150 Pa, 6 ÷ 18 h), la 4°C,
41 ocazie cu care are loc și un proces de maturare statică. În vederea utilizării, suspensia se
reagită energetic, se decantează timp de 30 ÷ 180 min și se preiau cele cinci șesimi superioare
43 din volumul supus decantării.

Exemplul 1.7

Obținerea agregatelor supramoleculare de atelocolagen

45 pH-ul suspensiei obținute conform exemplului 1.6 se ajustează la 6,8, utilizând soluție
47 0,5 M acid acetic, iar apoi se adaugă cantitatea de uree necesară pentru a atinge concentrația
de 0,3 M, cu scopul de a preveni agregarea supramoleculară excesivă a atelocolagenatului de
49 calciu pe durata tratamentelor enzimactice ulterioare. Soluția de transglutaminază, proaspăt

RO 125508 B1

preparată conform prescripțiilor din exemplul 1.3, se adaugă în cantitate echivalentă cu 100 ÷ 400 U enzimă/g atelocolagen, sub agitare viguroasă. (Activitatea enzimatică a soluției de transglutaminază se determină cantitativ și se exprimă în unități conform protocolului Sigma-Aldrich, utilizând kit-ul CS1070.) Suspensia se aduce apoi, sub agitare energetică, la temperatura de 20 ± 0,5°C, cu o pantă de 0,5°C/min, și se menține la această temperatură timp de 0,5 ÷ 2 h, în funcție de regimul hidrodinamic al agitării aplicate, sau timp de 4 ÷ 12 h în condiții statice. În acest interval de timp se supraveghează evoluția gelifierii. La final, temperatura sistemului parțial gelifiat se coboară la 4°C, cu panta de 0,5°C/min. Gelul lax rezultat se supune ultrasonării (100 W, 22 kHz) timp de 5 ÷ 15 min. După o maturare statică de 60 ÷ 240 min la 4°C, peste sistemul coloidal rezultat se adaugă Na₄EDTA (CAS 8013-51-2) și iodacetamidă (CAS 144-48-9), în cantitățile necesare pentru a asigura concentrațiile de 2,2 ÷ 2,5 mM și, respectiv, 0,08 ÷ 0,14 mM, repetându-se ultrasonarea, până la obținerea unei suspensii moderat vâscoase (55 ÷ 70 cP). După o altă perioadă de maturare (12 ÷ 72 h, 4°C, sub agitare lentă prin unduire), sistemul coloidal se diluează de 2 ÷ 5 ori cu soluție a protectorilor stării native, se supune centrifugării (15 ÷ 60 min, 1000 ÷ 2400 g) și îndepărtării supernatantului, în mod repetat (de 2 ÷ 6 ori), pentru eliminarea urmelor de enzimă și inhibitori ai acesteia. Pentru a evita repetarea ciclului diluare-centrifugare-izolare, inactivarea completă a enzimei se poate realiza adăugând, cu ocazia primei diluări, inhibitori specifici, cum sunt iodura de β-fenil-propionil-tiocolină sau N-benziloxycarbonil-L-fenilalanil-6-dimetilsulfoniu-5-oxo-L-norleucina. După ultima izolare, sistemul coloidal se aduce la volumul inițial al suspensiei luate în lucru, și se supune unei maturări finale, cu durata de 36 ÷ 72 h, la 4°C, în condiții sterile, sub agitare lentă prin unduire.

Exemplul 1.8

Funcționalizarea superficială a agregatelor de atelocolagen

Se realizează utilizând, drept reactiv bifuncțional, glicidil metacrilatul (CAS 106-91-2), adus în emulsie 1:10:5 cu acetonă și, respectiv, apă deionizată liberă de pirogeni, în aceasta din urmă adăugându-se 10 ÷ 25 mM Triton X 100. Cantitatea necesară de glicidil metacrilat se calculează astfel încât să se utilizeze 0,15 ÷ 0,35 M glicidil-metacrilat pentru fiecare mol din suma grupărilor aminice și amidice ale atelocolagenatului de calciu luat în lucru. Pentru realizarea funcționalizării, suspensia tactoizilor atelocolagenici, preparată conform exemplului 1.7, se supune dezaerării prin menținere sub vid moderat (50 ÷ 150 Pa, 6 ÷ 18 h), se termostatează la 4°C, se aduce la pH = 9,0 utilizând o soluție 0,05 M NaOH, iar apoi se adaugă emulsia de glicidil metacrilat, agitând energetic timp de 45 ÷ 180 min. La final, sistemul coloidal se diluează de 2 ÷ 5 ori, sub agitare energetică, cu soluție a protectorilor stării native, răcită la 4°C, se supune centrifugării (15 ÷ 60 min, 1000 ÷ 2400 g) și îndepărtării supernatantului, în mod repetat (de 2 ÷ 6 ori), pentru eliminarea urmelor de adjuvanți și a produșilor secundari de reacție. Se urmărește suprimarea tendinței de spumare sub agitare. Înainte de trecerea la următoarea etapă, tactoizii funcționalizați se resuspendă într-un volum de soluție a protectorilor stării native egal cu volumul inițial de atelocolagenat de calciu luat în lucru, sistemul se ultrasonează (250 W, 22 kHz) timp de 5 ÷ 15 min, iar apoi se supune unei maturări de 16 ÷ 48 h, la 4°C, sub agitare lentă, prin unduire.

Exemplul 1.9

Generarea rețelei neregulat intercuppate prin (co)polimerizare radicalică reticulantă controlată

Sistemul tactoidal funcționalizat, obținut conform prescripțiilor din exemplul 1.8, se supune unei dezaerări avansate, prin menținere sub vid (30 ÷ 50 Pa, 12 ÷ 24 h), la 4°C. Se dozează apoi cantitatea de (co)monomer(i) acrilic(i) corespunzător(i), dizolvată sau emulsionată, într-o cantitate totală echivalentă cu 0,4 ÷ 0,9 M pentru fiecare mol din suma grupărilor aminice și amidice libere ale atelocolagenatului de calciu luat în lucru. Drept (co)monomeri se

RO 125508 B1

1 preferă acidul acrilic, acidul metacrilic sau derivați funcționali ai acestora, cu catenă scurtă, dar
se pot utiliza și alți monomeri nesaturați, ce pot fi corespunzător aduși în soluție, în condițiile de
3 lucru citate. În continuare, se adaugă amestecul ternar de inițiatori ai proceselor radicalice,
format din 0,5 ÷ 0,7 părți H₂O₂, 0,2 ÷ 0,3 părți acid ascorbic, 0,1 ÷ 0,2 părți acid uric, într-o
5 participație totală masică de 0,001:1 până la 0,02:1 față de cantitatea de suspensie tactoidală
funcționalizată luată în lucru. Se începe cu dozarea cantității necesare de acid uric, se continuă
7 cu cea de acid ascorbic, iar după o omogenizare avansată (prin agitare eficientă) și o maturare
de 30 ÷ 180 min, în condiții statice, la 4°C, se dozează în picături o soluție 1:3 ÷ 1:5 H₂O₂ în apă
9 deionizată, liberă de pirogeni. Sistemul lichid de reacție se agită timp de 30 ÷ 180 min, după
care se depune în tăvi scunde, din polietilenă de înaltă densitate. Procesul de (co)polimerizare
11 radicalică reticulantă se continuă la 4°C, în condiții statice, timp de alte 180 ÷ 420 min. Can-
titățile de apă separate prin sinereză se îndepărtează periodic de la suprafața hidrogelului
13 format, prin sucțiune la colțul tăvilor, după o ușoară înclinare a acestora. La final, tăvile ce conțin
hidrogelul se supun vibrării mecanice, în condiții sterile, cu frecvența de 30 ÷ 150 Hz și
15 amplitudinea de 0,05 ÷ 0,5 mm, timp de 15 ÷ 60 min, în vederea eliminării apei de imbibitiție
excesivă, care se îndepărtează continuu, prin sucțiune pe la un colț înclinat. În continuare,
17 partea expusă a hidrogelului se zvântă, în condiții sterile, prin menținerea tăvilor sub vid
moderat (100 ÷ 250 Pa), timp de 30 ÷ 240 min, la 8 ÷ 20°C. După acest interval, hidrogelul se
19 extrage din tăvi și se depune cu partea zvântată pe o folie din polietilenă de înaltă densitate,
perfect întinsă. Zvântarea se repetă, în aceleași condiții, și pentru partea anterior neexpusă
21 vidului. La final, hidrogelul se împachetează între structuri textile poroase, sterilizate hidrotermic,
și se sigilează sub vid, în pungi din polietilenă de uz medical, sterilizate, și acestea, prin
23 expunere la radiații germicide (UV 200 ÷ 280 nm, 200 W, 12 h).

Exemplul 2

25 *Condiționarea rețelei intercuplate, cu caracteristici de hidrogel, în vederea utilizării în*
ingineria tisulară și în medicina regenerativă

27 La finalul operațiilor de obținere, dar și înaintea utilizării în aplicații în care celule vii
urmează a fi cultivate sau vor bioinvada hidrogelul obținut conform invenției, acesta se supune
29 unei purificări avansate și condiționării biochimice. În acest sens, hidrogelului i se aplică un ciclu
de umflare-dezumflare-spălare în medii lichide alcaline, saline și apoi hipotone, urmat de
31 doparea, prin sorbție, cu soluții specifice utilizărilor ulterioare.

Hidrogelul împachetat între straturile de material textil poros se depune pe suprafața
33 unui filtru cu site metalice inoxidabile, și se spală abundant, în condiții sterile, sub sucțiune, în
trei etape, cu recircularea a 70 ÷ 98% din volumul soluțiilor de spălare. Debitul de recirculare
35 se reglează astfel încât stratul de hidrogel să se mențină în permanență acoperit de către
soluție. Temperatura soluțiilor de spălare se va menține permanent în plaja 8 ÷ 15°C. În prima
37 etapă soluția de spălare va avea pH slab alcalin, inițial cuprins între 7,8 și 8,2 și se va recircula
în proporție de 80 ÷ 90% (adăugând continuu diferența de 10 ÷ 20% soluție proaspătă), atât
39 timp cât pH-ul se menține într-o plajă ce nu depășește cu ± 0,2 unități valoarea pH-ului soluției
proaspate, dar nu mai puțin de 30 min. Agentul alcalin utilizat poate fi orice sare cu hidroliză
41 bazică, preferându-se însă bicarbonatul de sodiu. Soluțiile saturate, proaspăt preparate, de
bicarbonat se decantează și se filtrează înainte de utilizare. În a doua etapă, spălarea se va
43 efectua cu soluție Ringer (8 g NaCl, 0,42 g KCl, 0,24 g CaCl₂, 0,20 g NaHCO₃ per litru) în care
se adaugă 3 ÷ 9% alcool etilic absolut și 5 ÷ 15% glicerină pură. Raportul de recirculare în
45 această etapă va fi de 90...95%, cu adăugarea diferenței de 5 ÷ 10%. Durata spălării saline va
fi de 60 ÷ 180 min. În cea de-a treia etapă, spălarea se efectuează cu soluție hipotonă de
0,3 ÷ 0,45% NaCl, la un raport de recirculare ce variază în timp în intervalul 70 ÷ 85% în primele 47
30 ÷ 90 min, și 95 ÷ 98% în următoarele 120 ÷ 180 min. La final, hidrogelul, menținut încă între

RO 125508 B1

straturile din material textil poros, se depune în tăvi din polietilenă de înaltă densitate, se 1
vibrează 10 ÷ 30 min (frecvența 30 ÷ 150 Hz, amplitudinea 0,05 ÷ 0,5 mm, condiții sterile), cu 1
îndepărtarea prin sucțiune a apei separate, se zvântă sub vid moderat (100 ÷ 250 Pa, 8 ÷ 20°C, 3
30 ÷ 240 min), pe ambele părți, se suflă cu aer steril (0,6 ÷ 0,8 atm, 10 ÷ 20°C, 15 ÷ 90 min) pe 5
ambele părți, după care se presează (0,01 ÷ 0,08 kgf/cm), în condiții sterile, între plăci sinteri- 5
zate din granule de polietilen glicol cu masa moleculară medie de 10 kDa, timp de 45 ÷ 120 min, 7
permițând drenarea soluției apoase. În continuare, în funcție de gama de utilizare avută în 7
vedere, precum și de durata întrevăzută a stocării, hidrogelul se echilibrează în soluții apoase 9
cu diverse compoziții, ce pot include săruri, acizi slabi, baze slabe, specii de interes biochimic, 9
compuși oligomeri, specii farmaceutice, enzime și modulatori ai activității enzimatică, modulatori 11
ai metabolismului celular, coloranți și indicatori de pH biotolerabili, tensioactivi nedenaturanți, 11
plastifianți și modificatori reologici biotolerabili etc. Tratamentul de echilibrare se realizează 13
similar operațiilor de spălare mai sus descrise, în condiții sterile, la rapoarte de recirculare de 13
95 ÷ 100%, la temperaturi cuprinse între 4 și 15 °C, pe durate variabile. După acest tratament, 15
hidrogelurile se eliberează de apa de imbibitiție excesivă, se zvântă pe ambele părți și se închid 15
sub vid, în condiții sterile, în pungi din polietilenă de înaltă densitate, de uz biomedical. Atunci 17
când compoziția soluțiilor de echilibrare o permite, înainte de închiderea sub vid, hidrogelurile 17
se pot expune radiației ultraviolete germicide (200 ÷ 280 nm, 200 W), timp de 15 ÷ 90 min.

Revendicări

1
3 1. Procedeu pentru obținerea rețelelor neregulat intercuppate, de tip atelocolagen -
5 (co)polimeri generați *in situ*, cu proprietăți de hidrogel, **caracterizat prin aceea că** decurge
7 succesiv în următoarele etape dependente și intercondiționate, derulate exclusiv în condiții
9 nedenaturante pentru componenta scleroproteică:

7 (i) - prepararea specifică a reactivilor și a amestecurilor de reactivi, în vederea aducerii
9 acestora la parametri fizico-chimici impuși de condițiile particulare de lucru în generarea rețe-
11 lelor intercuppate cu componentă atelocolagenică;

11 (ii) - prepararea specifică a precursorului proteic, pornind de la soluții coloidale de
13 atelocolagen hipoimunogen, în vederea inducerii de punți de reticulare selectivă, ce nu interca-
15 lează specii chimice mic-moleculare;

13 (iii) - funcționalizarea preliminară a precursorului proteic, prin grefarea cu compuși
15 chimici cu moleculă mică, bifuncționali, nesaturați și, respectiv, hidrofobi;

15 (iv) - (co)polimerizarea radicalică a precursorului proteic funcționalizat cu (co)monomeri
17 nesaturați bifuncționali, utilizând un sistem de inițiere activ la temperaturi joase, alcătuit doar
19 din specii chimice biocompatibile;

17 (v) - condiționarea fizico-chimică a produsului de (co)polimerizare, în vederea pregătirii
21 acestuia pentru aplicații din domeniul biomedical.

21 2. Procedeu conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** aducerea reactivilor și
23 a amestecurilor de reactivi la parametri fizico-chimici impuși de condițiile particulare de lucru,
25 în obținerea rețelelor intercuppate cu componentă atelocolagenică, are loc prin următoarele
27 etape:

25 - amestecul de protectori ai stării native se prepară în apă deionizată, fără pirogeni,
27 dizolvând mai întâi unul sau mai mulți compuși cosmetropi, ce limitează ionizarea proteinelor,
29 apoi un compus cu acțiune de tamponare a pH-ului, un agent de blocare a agregării supramole-
31 culare, iar după solubilizare completă, un compus ce limitează suprahidratarea speciilor
33 proteice, și un antibiotic activ inclusiv împotriva micoplasmelor; după maturarea la rece, la
35 amestec se adaugă o soluție preparată separat, ce conține protectori ai conformației proteinelor;
37 după o maturare suplimentară, soluția se supune centrifugării, în vederea eliminării posibilelor
39 centre de nucleație a agregării supramoleculare a proteinelor;

33 - soluția de transglutaminază, ca agent reticulant biochimic, se prepară extemporaneu,
35 aducând cantitatea calculată într-un flacon din sticlă deschis, ce se menține la o temperatură
37 cât mai apropiată de 0°C, timp de 0,5 ÷ 3 h, într-o atmosferă cu umiditatea relativă de 60 ÷ 85%;
39 peste pulberea parțial rehidratată se adaugă, în picături, o soluție 10 mM de 1,4-bis-sul-
41 fanilbutan-2,3-diol în tampon HEPES cu pH = 6,8, adusă la 4°C; după ampastarea și dizolvarea
43 într-o cantitate minimă de lichid, vasul din sticlă se agită prin rotire-unduire pe baie de ter-
45 mostatare, crescând temperatura cu 0,25 ÷ 1°C/min, până la 15 ÷ 20°C, și menținând-o timp de
20 ÷ 60 min; apoi temperatura băii de termostatare se scade cu aceeași pantă, până la 4°C;

41 - acidul uric se convertește în cristalohidratul dihidrat corespunzător; pulberea anhidră
43 se suspendă 1:400 în apă deionizată fără pirogeni, iar suspensia se aduce la fierbere și apoi
45 se diluează 1:4000 cu apă preîncălzită la 90°C; după răcirea până la 80°C, pH-ul soluției se
47 aduce la valoarea 3 prin adăugare de acid acetic glacial, apoi se închide etanș, se încălzește
49 la 105°C și se menține timp de 3 ÷ 9 h, sub agitare lentă; după filtrare la 80°C, soluția se răcește
51 brusc la 8 ÷ 10°C, se refiltrează și se maturează la 4°C; la final cristalele rezultate se spală
53 abundent cu apă deionizată liberă de pirogeni, apoi se usucă sub vid;

RO 125508 B1

- acidul ascorbic comercial se dizolvă în apă deionizată, liberă de pirogeni, pentru a 1
forma o soluție saturată, de circa 400 g/L, la $50 \pm 2^\circ\text{C}$; caldă încă, soluția se adaugă, în picături, 2
sub agitare energetică, peste un volum de zece ori mai mare de amestec apă:acetat de etil cu 3
raportul 1:100 ÷ 2,5:100; suspensia rezultată se centrifughează la 2500 g, supernatantul se 4
îndepărtează, iar sedimentul se acoperă imediat cu alcool etilic absolut; pasta rezultată se 5
usucă sub vid moderat la $30 \div 60^\circ\text{C}$, apoi cristalele formate se redizolvă în 400 ÷ 600% alcool 6
etilic absolut și soluția se centrifughează la 3600 g, recuperând cele patru cincimi superioare 7
din supernatant; acestui volum i se adaugă eter etilic până la raportul alcool:eter de 8
1:0,4 ÷ 1:0,6, când acidul ascorbic recrystalizează; după sedimentare, faza solidă se usucă mai 9
întâi sub vid moderat, la $30 \div 60^\circ\text{C}$, iar apoi în curent de azot uscat; cristalele astfel obținute se 10
păstrează sub pernă de azot, în recipiente închise ermetic. 11

3. Procedeu conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** precursorul proteic se 12
prepară pornind de la soluții coloidale de atelocolagen hipoimunogen, stabilizate utilizând 13
amestecul de protectori ai stării native preparat așa cum s-a definit în revendicarea 2; aciditatea 14
soluției coloidale de start se elimină pe două căi reciproc exclusive, alese în funcție de 15
cantitatea de soluție necesară, respectiv, prin neutralizare lentă sau prin liofilizare controlată; 16
pentru cantități reduse de soluție, neutralizarea implică precipitarea lentă cu o soluție ce conține 17
0,1 M Na_2HPO_4 și 0,5 M Na_2SO_4 , urmată de sedimentare, separare centrifugală, spălare 18
abundentă cu apă deionizată fără pirogeni, și apoi resuspendare și dizolvare în soluție de agenți 19
protectori ai stării native; pentru cantități necesare mari, soluția inițială se degazează sub vid 20
moderat, se congelează inițial la -18°C și apoi la -40°C , după care se supune liofilizării; produsul 21
liofilizat se condiționează la o umiditate relativă de $70 \div 85\%$, se ampastează lent cu soluție de 22
protectori ai stării native, se diluează și se dizolvă cu aceeași soluție, până la concentrația de 23
 $2,6 \pm 3,8$ g/l, se ultrasonează sub termostatare la 4°C , la 22 kHz și 400 W, timp de $3 \div 15$ min, 24
se diluează la $1,0 \div 1,6$ g/l, se ultrasonează din nou, în aceleași condiții, și se ultrafiltrează prin 25
membrane cu MWCO 500 kDa.

4. Procedeu conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** precursorul proteic se 26
aduce mai întâi la starea de hidrogel fizic lax de atelocolagenat de calciu, care se supune apoi 27
agregării supramoleculare controlate, prin inducerea de punți de reticulare de lungime zero, cu 28
ajutorul transglutaminazei ($100 \div 400$ U, din soluția preparată conform revendicării 2); după 29
inactivarea transglutaminazei, suspensia moderat vâscoasă ce rezultă se maturează la rece, 30
sub agitare lentă, iar apoi, în cicluri repetate de $2 \div 6$ ori, se diluează cu soluție de protectori ai 31
stării native preparată așa cum este definit în revendicării 2, se centrifughează, se separă și se 32
resuspendă în același tip de soluție, eliminând complet din sistem enzima și inhibitorii acesteia; 33
ca ultimă operație, suspensia rezultată se aduce la volum prescris și se supune unei alte 34
maturări, la rece. 35

5. Procedeu conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** agregatele atelocola- 36
genice, obținute conform revendicării 4, se funcționalizează după cum urmează: suspensia de 37
atelocolagen agregat supramolecular se dezaerează sub vid moderat, se termostatează la 4°C , 38
se aduce la $\text{pH} = 9,0$, iar apoi i se adaugă, sub agitare energetică, $0,15 \div 0,35$ mM monomerul 39
bifuncțional emulsionat; sistemului coloidal i se aplică apoi două până la șase cicluri de: (i) 40
diluare cu soluție a protectorilor stării native, (ii) separare centrifugală, (iii) resuspendare în 41
același tip de soluție, în vederea îndepărtării adjuvanților anterior utilizați, și a produșilor 42
secundari de reacție; la final, sistemul coloidal se supune ultrasonării și maturării la rece. 43

6. Procedeu conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** rețelele neregulat 44
intercuplate atelocolagen-(co)polimeri generați *in situ*, cu caracteristici de hidrogel, se obțin 45
după cum urmează: suspensia de atelocolagen funcționalizat, obținută așa cum este definit în 46
revendicarea 5, se termostatează la 4°C , se dezaerează, iar apoi i se adaugă, sub agitare 47
eficientă, o cantitate totală de monomer acrilic/metacrilic, sau de amestec de monomeri 48
49

1 nesaturați bifuncționali, ori derivați ai acestora cu catenă scurtă, echivalentă cu $0,4 \div 0,9$ M
2 pentru fiecare mol de grupări aminice libere ale atelocolagenatului de calciu luat în lucru; se
3 adaugă apoi amestecul de inițiere radicalică, într-o participație masică totală de 0,001:1 până
4 la 0,02:1 față de cantitatea de suspensie luată în lucru; ordinea de dozare și participațiile
5 masice ale componentelor în amestecul ternar sunt următoarele: 0,1 \div 0,2 părți acid uric,
6 0,2 \div 0,3 părți acid ascorbic, 0,7 \div 0,5 părți H_2O_2 ; după dozarea celor doi acizi, se aplică o omo-
7 genizare prin agitare energetică, și apoi o maturare statică, timp de 30 \div 180 min, urmând
8 dozarea în picături a oxidantului diluat 1:3 \div 1:5 în apă deionizată liberă de pirogeni; după o
9 agitare timp de 30 \div 180 min, sistemul coloidal se depune în tăvi scunde din polietilenă de înaltă
10 densitate, și se menține static, la 4°C, timp de 180 \div 420 min; în continuare, hidrogelul format
11 se eliberează de apa de imbițiție excesivă, se zvântă pe ambele părți și se împachetează între
12 structuri textile poroase, apoi se închide în pungi din polietilenă, sterile.

13 7. Procedeu conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** rețelele covalent
14 intercuppate, obținute în stare de hidrogel așa cum s-a definit în revendicarea 6, se condi-
15 ționează în vederea utilizării lor în aplicații biomedicale și din ingineria tisulară, după cum
16 urmează: hidrogelul se spală abundant pe filtru, recirculând soluțiile în proporții variabile, la
17 temperaturi cuprinse între 8 și 15°C, în trei etape: mai întâi la pH slab alcalin (7,8 \div 8,2), apoi
18 cu soluție salină de tip Ringer suplimentată prin adaos de 3 \div 9% alcool etilic absolut și 5 \div 10%
19 glicerină pură, iar la final cu soluție hipotonă, conținând 0,3 \div 0,45% NaCl; în continuare hidro-
20 gelul se eliberează de apa de imbițiție excesivă, se zvântă pe ambele părți, mai întâi sub vid
21 și apoi prin suflare cu aer steril, și se presează între plăci sintetizate din granule de PEG cu
22 masa moleculară medie de 10 kDa, îndepărtând soluțiile scurse; la final, în funcție de gama de
23 utilizări vizată, hidrogelul se echilibrează în soluții ce includ specii chimice și de interes
24 biochimic, inclusiv modulatori ai metabolismului și ai ciclului de viață celular, iar dacă hidrogelul
25 nu se utilizează imediat, el se poate stoca la rece, după închiderea în pungi din polietilenă, de
26 uz biomedical, sterilizate; opțional, înainte de stocare, hidrogelul se poate expune radiației
27 ultraviolete germicide (200 \div 280 nm, 200 W), timp de 15 \div 90 min.

