



(12)

## CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2010 00567**

(22) Data de depozit: **30.06.2010**

(41) Data publicării cererii:  
**28.02.2011** BOPI nr. **2/2011**

(71) Solicitant:

- **INSTITUTUL NAȚIONAL DE CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU ȘTIINȚE BIOLOGICE, SPLAIUL INDEPENDENȚEI, NR. 296, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **INSTITUTUL NAȚIONAL DE CERCETARE DEZVOLTARE PENTRU INGINERIE ELECTRICĂ ICPE-CA, SPLAIUL UNIRII, NR. 313, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **UNIVERSITATEA DIN BUCUREȘTI, BD. MIHAIL KOGĂLNICEANU, NR. 36-46, SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO**

(72) Inventatori:

- **CRĂCIUNESCU OANA, BD. NICOLAE GRIGORESCU, NR. 33, BL. A1, SC. 3, AP. 33, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **MOLDOVAN LUCIA, BD. CONSTRUCTORILOR, NR. 24, BL. 19, SC. A, AP. 13, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **TARDEI CHRISTU, STR. PROF. DR. ȘTEFAN S. NICOLAU, NR. 11, BL. G1, SC. 3, AP. 15, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **OPRIȚA ELENA IULIA, STR. VALEA IALOMIȚEI, NR. 6, BL. C10, SC. C, AP. 184, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **ZĂRNESCU OTILIA, BD. IULIU MANIU, NR. 59, BL. 10, SC. 1, AP. 17, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO**

## (54) SUPORT COMPOZIT POROS PENTRU TRATAREA DEFECTELOR OSOASE ȘI PROCEDEU DE OBTINERE

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un suport compozit poros, pentru tratarea defectelor osoase, și la un procedeu pentru obținerea acestuia. Suportul conform invenției este constituit din 35...60% *beta*-fosfat tricalcic substituit cu 2,5...10 mol% magneziu cu dimensiunea medie a particulelor de 1...5 μm, 25...40% colagen tip I acido-solubil, cu greutate moleculară medie 280...330 kDa și conținut de colagen peste 80%, 12...20% condroitin sulfat cu greutate moleculară medie 9...30 kDa și conținut de acizi uronici minimum 25%, și 2...4% acid hidroxietil-piperazin-etan-sulfonic, părțile fiind exprimate în greutate. Procedeu de obținere, conform invenției, cuprinde amestecarea a 9...18 părți compoziție 1, conținând o

soluție 4...9% de fosfat tricalcic substituit cu magneziu, în tampon fosfat salin 2...4%, pH 7...7,7, cu 74...78 părți compoziție 2, conținând un amestec de colagen 4...6% dializat în apă distilată și o soluție de condroitin sulfat 2...4% în apă, și cu 9...10 părți compoziție 3, conținând o soluție acid hidroxietil-piperazin-etan-sulfonic de concentrație 0,3...0,5%; amestecul astfel obținut, prin vortexare puternică, timp de 10...50 min, la temperatura camerei, se liofilizează la -30...-40°C și se usucă sub vid, la 18...25°C.

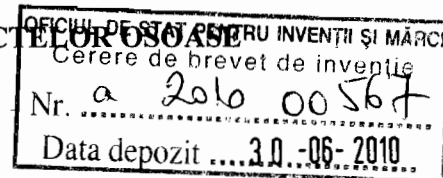
Revendicări: 1

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).



30

**SUPPORT COMPOZIT POROS PENTRU TRATAREA DEFECTELOR OSOASE  
SI PROCEDEU DE OBTINERE**



Oana Craciunescu, Lucia Moldovan, Christu Tardei, Elena Iulia Oprita, Otilia Zarnescu

Inventia se refera la un material compozit poros pe baza de fosfati de calciu si magneziu, colagen si condroitin sulfat, destinat terapiei defectelor osoase (nesudari osoase, fracturi, inlocuirea osului vatamat, cancer, etc) si un procedeu de obtinere a acestuia.

Compusii utilizati in compozitia acestui suport compozit, fosfatii de calciu si magneziu, colagenul si condroitin sulfatul sunt constituinti naturali, care intra in compozitia osului, proprietate ce face ca acest produs sa fie suportul ideal pentru stimularea cresterii si proliferarii osteoblastelor, celule implicate in sinteza componentelor matriceale ale noului tesut osos. Osul este un compozit biomineralizat complex, constand in principal dintr-o componenta anorganica (cristale de fosfat de calciu) si apa (70-80 %) si o componenta organica formata din colagen tip I, proteoglicani si alte proteine (20-30 %). In timpul formarii acestui tesut, cristalele de fosfati de calciu se acumuleaza si se asociaza intim la fibrilele componentei organice, astfel ca se formeaza un compozit cu proprietati mecanice (greutate, rezistenta, duritate, elasticitate) si biologice (activitati osteoinductive, osteogenice, angiogenice, chemotactice, etc) excelente. Defectul osos si necesitatea reintegrarii zonei lipsa sau maririi zonei existente constituie o problema majora in domeniul ortopedic, maxilo-facial si neurochirurgical.

Principalele componente minerale ale osului sunt calciul si fosforul care formeaza saruri complexe ce se depun sub forma de microcristale de hidroxiapatita la nivelul fibrelor de colagen. Alti compusi anorganici din compozitia osului sunt fluoruri, saruri de sodiu, potasiu si magneziu. Hidroxiapatita este fosfatul de calciu cel mai des utilizat in compozitia substituentilor de os. Acest material are avantajul ca asigura substituentilor o rezistenta mecanica ridicata dar, comparativ cu alte materiale ce contin fosfat de calciu precum fosfatul tricalcic (TCP) sau octocalcic (OCP), prezinta o solubilitate foarte scazuta. In cazul in care se urmareste producerea de biomateriale osoase cu grad de biodegradare ridicat se prefera utilizarea fosfatului tricalcic in forma alfa-TCP sau beta-TCP.

Colagenul tip I este componenta organica majora a matricilor extracelulare si se cunoaste ca este un substrat optim pentru atasarea si proliferarea a numeroase tipuri celulare, incluzand pe cele responsabile de mentinerea si organizarea osului, precum celulele osteoprogenitoare, osteoblastele, osteocitele si osteoclastele (BARRERE F., VAN

BLITTERSWIJK C.A., DE GROOT K., *Internat. J. Nanomed.*, 2006, 1, 317-332). Comparativ cu osul natural, colagenul este un material cu rezistenta mecanica mai scazuta, dar proprietatile biologice sunt superioare materialelor ceramice. Este cunoscuta utilizarea acestei proteine sub forma de colagen insolubil sau gelatina, mineralizata cu fosfat de calciu pentru realizarea unor materiale polimerice destinate regenerarii osoase (BREVET WO 03071991; BREVET WO 2006031196). De asemenea, se cunoaste utilizarea amestecului de colagen denaturat (gelatina) cu beta-fosfat tricalcic sub forma de particule sferice la realizarea de compozite osoase avand o suprafata specifica mare pentru aderarea celulelor (BREVET CN 101401967).

Condroitin sulfatul este un glicozaminoglican prezent in matricea extracelulara si pe suprafata celulara a tesuturilor conjunctive animale, printre care si osul. In acest tesut, condroitin sulfatul face parte din structura proteoglicanilor mici, de tipul decorinei si biglicanului, care au rol in reglarea mineralizarii cristalelor de fosfat de calciu din compozitia osului (BOSKEY A.L., SPEVAK L., DOTY S.B., ROSENBERG L., *Calcif. Tiss. Int.*, 1997, 61, 298-305).

Diferite biomateriale au fost investigate si propuse ca substituenti ososi, care trebuie sa prezinte proprietati de biocompatibilitate ridicata si caracteristici biomimetice pentru a activa mecanismele biologice in tesutul osos gazda si componenta lor celulara sa favorizeze procesele de formare si consolidare a osului. Materialele sunt, apoi, complet resorbite lasand spatiu pentru osul nou format (BREVET WO 2009004445). Dintre factorii care controleaza proprietatile mecanice si biologice ale biomaterialelor, cei mai importanti sunt compozitia chimica si microstructura acestora, iar porozitatea joaca un rol esential. Prezenta porilor este foarte importanta pentru ca permite dezvoltarea noului tesut osos in interiorul lor.

S-a raportat obtinerea unui material pentru inlocuirea osului continand hidroxiapatita, colagen si condroitin sulfat prin amestecarea mecanica a celor 3 componente si reticularea dehidrotermala (BREVET EP 0214070(A1)). Acest material a prezentat o buna compatibilitate, dar o remodelare limitata a tesutului lezat. Hae-Won Kim et al. descriu un nanocompozit biomimetic obtinut prin coprecipitarea hidroxiapatitei cu o solutie de gelatina si liofilizarea ulterioara a amestecului (KIM H.-W., KIM H.-E., SALIH V., *Biomaterials*, 2005, 26, 5221-5230). Produsul s-a obtinut prin adaugarea de ioni de calciu si fosfat in solutia de gelatina rezultand un compozit poros, util in regenerarea osului si a cartilajului datorita unei viteze de resorbtie *in vivo* adecvata, proportionala cu procesele de formare rapida a noului tesut.

30-06-2010

Prezenta inventie urmareste realizarea unui produs cu eficienta mare, util in regenerarea tesutului osos dupa traumatisme, nesudari osoase, cancere, inflamatii, etc.

Produsul, conform inventiei, reprezinta un suport compozit poros, cu dimensiunea medie a porilor variind intre 20 si 200  $\mu\text{m}$ , biocompatibil si bioresorbabil si este constituit din 35...60 % beta-fosfat tricalcic continand 2,5...10 mol.% magneziu, cu dimensiunea medie a particulelor cuprinsa intre 1...5  $\mu\text{m}$ , 25...40 % colagen tip I acido-solubil, cu greutatea moleculara medie intre 280 si 330 kDa si continut in colagen mai mare de 80%, 12...20 % condroitin sulfat cu greutatea moleculara medie de 9...30 kDa si continut in acizi uronici de minim 25 % si 2...4 % HEPES (acid hidroxietil-piperazin-etan-sulfonic), partile fiind exprimate in greutate.

Procedeeul de obtinere al produsului, conform inventiei, consta in aceea ca se realizeaza un suport compozit poros prin amestecarea a 9...18 parti compozitie 1, constituita dintr-o solutie de beta-fosfat tricalcic continand 2,5...10 mol.% magneziu, de concentratie 4...9 %, preparata in tampon fosfat salin 2...4 %, pH 7...7,7 cu 74...85 parti compozitie 2, reprezentand un amestec dintr-o solutie vascoasa de 4...6 % colagen acido-solubil, dializat in prealabil fata de apa distilata si o solutie opalescenta de 2...4 % condroitin sulfat si cu 9-10 parti compozitie 3 reprezentata de o solutie HEPES de concentratie 0,3...0,5 %. Beta-fosfatul tricalcic substituit cu magneziu se obtine prin amestecarea a 40...100 g carbonat de calciu cu 30...70 g fosfat acid de amoniu, 1...3 g oxid de magneziu si 0,200...0.500 l etanol, solvent ce se evapora ulterior prin uscare, urmata de calcinarea amestecului de componente la 900  $^{\circ}\text{C}$  si sinterizarea acestuia la 1000...1200  $^{\circ}\text{C}$ . Inainte de amestecarea cu compozitiile 2 si 3, compozitia 1 continand beta-fosfat tricalcic substituit cu magneziu se omogenizeaza prin vortexare la temperatura camerei. Amestecul celor 3 compozitii obtinut prin vortexare puternica, timp de 10...50 minute, la temperatura camerei, se toarna in tavite de inox si se liofilizeaza prin inghetare la temperatura de -30...-40  $^{\circ}\text{C}$  si uscare sub vid la temperaturi de +18...+25  $^{\circ}\text{C}$ .

In scopul cresterii rezistentei la degradare enzimatica, respectiv reticularii produsului, dupa liofilizare, acesta se introduce intr-o solutie de etanol 30...50 %, timp de 30...60 minute, la temperatura camerei, apoi, intr-o solutie de etil-dimetil-aminopropil carbodiimida (EDC) de concentratie 5...30 mM preparata, in prealabil, in tampon acid morfolino-etanol-sulfonic (MES) ce contine etanol 70 %, pH 5,5...6, timp de 15...24 ore, la temperatura camerei, prin agitare continua pe shaker. Suportul poros reticulat este supus unor spalari repetate cu o solutie de fosfat disodic 0,1...0,2 M, de 1...2 ori, timp de 1...2 ore, apoi cu o solutie de clorura de sodiu 0,5...1 M, de 1...2 ori, timp de 1...2 ore, dupa care se realizeaza 5-6 spalari cu o

solutie de clorura de sodiu 1,5...2 M, timp de 2...4 ore si, in final, 5-6 spalari cu apa distilata, timp de 3...5 ore fiecare. Conditionarea produsului se realizeaza prin liofilizare, in conditiile prezentate anterior, dupa care se ambaleaza in pungi de polietilena si se sterilizeaza prin expunere la radiatii gamma, la doze de 15...20 kGy.

Produsul biopolimeric, obtinut in conformitate cu prezenta inventie, prezinta urmatoarele avantaje:

- suportul compozit obtinut prezinta o eficienta mare in tratarea afectiunilor osoase (nesudari osoase, fracturi, inlocuirea osului vatamat, cancer, etc) continuand in compozitia sa biopolimeri care se gasesc, in mod natural, in tesutul osos.
- produsul este implicat in procesul de initiere a depozitarii de tesut osos nou datorita substantelor organice si anorganice din compozitia lui (efect osteoinductiv). Datorita structurii sale poroase, produsul realizeaza un contact strans cu zona lezata facilitand, astfel, influxul celulelor din tesutul neafectat inconjurator si proliferarea acestora.
- Produsul obtinut poate servi si ca matrice suport pentru celulele osului (osteoblaste) sau celulele stem mezenchimale oferind acestora o retea tridimensionala, asemanatoare matricei extracelulare osoase – conditie esentiala pentru mentinerea fenotipului celular.
- Suportul este biocompatibil si biodegradabil in timp asigurand, astfel, substratul ideal pentru formarea de tesut nou in timp ce produsul este degradat, conditie esentiala in chirurgia osoasa.
- Produsul este stabil in timp, nu creeaza antigenicitate in contact cu organismul.
- Procedul de obtinere este relativ simplu si fezabil.

In vederea imbunatatirii calitatilor osteoinductive ale beta-fosfatului tricalcic, s-a adaugat in compozitia sa magneziul, care reduce degradarea fosfatului tricalcic, este implicat in metabolismul mineral si previne osteoporoza. Pentru realizarea prezentei inventii, s-a utilizat ca sursa anorganica un beta-fosfat tricalcic substituit cu magneziu in raportul molar ( $Mg_xCa_{3-x}:(PO_4)$ ) de 1,5, in care substitutia calciului cu magneziu a fost de maxim 10 mol.%. Verificarea puritatii compusilor ceramici elaborati s-a realizat prin masuratori de difractie de raze X si spectroscopie in infrarosu. Morfologia si dimensiunile granulelor au fost masurate prin microscopie electronica de baleiaj.

#### **Exemplul 1.**

Intr-o moara planetara, prevazuta cu doua incinte de macinare din poliamida, cu un volum util de minim 200 ml se introduc 70 g carbonat de calciu, 50 g fosfat acid de amoniu, 2 g oxid de magneziu si 250 ml etanol si se omogenizeaza, timp de 6 ore, folosind bile de

alumina. Suspensia rezultata se usuca intr-o etuva, la o temperatura de 80 °C, timp de 8 ore si, apoi, se calcineaza intr-un cuptor, timp de 2 ore, la 900 °C, temperatura la care are loc formarea compusului fosfat tricalcic. Materialul calcinat este macinat din nou, in acelasi tip de moara, in raportul material:bile de macinare de 1:1,5, dupa care este sinterizat la temperatura de 1100 °C, timp de 2 ore, in prezenta de aer, cand are loc formarea de beta-fosfat tricalcic cu substitutie izomorfa de ioni de magneziu - ( $\beta$ -Ca<sub>3-x</sub>Mg<sub>x</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>), continand magneziu 5 mol.%, cu dimensiunea medie a particulelor de 4 μm.

Se iau 20 g de pulbere de beta-fosfat tricalcic substituit cu magneziu astfel preparata si se introduc intr-un vas de sticla, prevazut cu agitare. Se adauga apoi 0,4 l tampon fosfat salin 0,2 M, pH 7,4 si se omogenizeaza minim 15 minute, la temperatura camerei. In final, se obtine o solutie opalescenta in care beta-fosfatul de calciu si magneziu este in suspensie (compozitia 1).

Separat, intr-un vas de inox, cu agitare continua, se introduc 3 l solutie de collagen 0,4% (g/g), cu greutatea moleculara medie 300 kDa, obtinuta din tendon bovin prin extractie cu pepsina dizolvata, in prealabil, in solutie de acid citric 0,1 M (raportul pepsina:tesut este de 1:10), la 4 °C, timp de 24 de ore si dializa excesiva fata de apa distilata. Peste solutia de collagen se adauga 0,15 l solutie de condroitin sulfat 5 %, cu greutatea moleculara medie 10 kDa si continut in acizi uronici de 27 % (compozitia 2).

Intr-un alt vas, prevazut cu agitare, se introduc 1,5 g HEPES si 400 ml apa distilata si se agita pana la dizolvarea completa (compozitia 3).

Compozitiile obtinute din amestecul de collagen si condroitin sulfat si cea de HEPES se adauga peste suspensia de beta-fosfat tricalcic substituit cu magneziu, la temperatura camerei, si se vortexeaza puternic, timp de 50 minute, pana la omogenizarea completa. Se obtine o solutie vascoasa, cu aspect de gel, care se toarna in tavite de inox si se liofilizeaza prin inghetare la temperatura de -40 °C si uscare sub vid la +25 °C.

In vederea reticularii, bucati de suport liofilizat se introduc in etanol 40 %, timp de 40 minute, la temperatura camerei. Apoi, se prepara o solutie de EDC 30 mM in tampon MES dizolvat in etanol 70 %, pH 5,5, in care se incubeaza suporturile compozite, timp de 18 ore, la temperatura camerei, prin agitare continua pe un shaker. In scopul eliminarii reziduurilor de reticulant, produsul se spala de doua ori cu o solutie de fosfat disodic 0,1 M, timp de 2 ore, apoi, de doua ori cu o solutie de clorura de sodiu 1 M, timp de 1 ora fiecare, de 6 ori cu o solutie de clorura de sodiu 2 M, timp de 3 ore si, in final, se fac 6 spalari cu apa distilata, timp de 4 ore fiecare. Apoi, suporturile reticulate se usuca prin liofilizare in conditiile prezentate

anterior. După liofilizare, suportul poros se ambalează etans în pungi de polietilenă și se sterilizează prin expunere la radiații gamma, la o doză de 15 kGy.

### Exemplul 2

Compoziția 1, formată din beta-fosfat tricalcic substituit cu magneziu se prepară în aceleași condiții ca în exemplul 1, cu deosebirea că magneziul din compoziție are o concentrație de 10 mol.%.

Compoziția 2 se prepară prin amestecarea a 2,5 l soluție de colagen 0,6 %, cu greutatea moleculară de 320 kDa, extrasă din piele bovină cu pepsina în mediu de acid acetic 0,5 M, la temperatura camerei, cu o soluție de condroitin sulfat preparată în prealabil din 8 g de condroitin sulfat cu greutatea moleculară de 12 kDa, dizolvat prin agitare în 0,3 l de apă distilată.

Prepararea soluției de HEPES și amestecarea acesteia cu soluția de beta-fosfat tricalcic substituit cu magneziu și cea de colagen-condroitin sulfat s-a realizat conform exemplului 1. După liofilizarea soluției opalescente obținute, prin înghețare la  $-35^{\circ}\text{C}$  și uscare la  $20^{\circ}\text{C}$ , produsul poros obținut se tratează cu o soluție de EDC 20 mM, preparată ca în exemplul 1. Pentru eliminarea reziduurilor de reticulant, produsul se spală pe rând cu o soluție de fosfat disodic 0,2 M, o soluție de NaCl 1 M, o soluție de NaCl 2 M și apă distilată, în condițiile prezentate în exemplul 1. Apoi, suporturile reticulate se usucă prin liofilizare în condițiile prezentate anterior. După liofilizare, suportul poros se ambalează etans în pungi de polietilenă și se sterilizează prin expunere la radiații gamma, la o doză de 20 kGy.

În vederea evaluării gradului de reticulare al materialului compozit obținut, conform exemplurilor de mai sus, s-au determinat spectrofotometric grupările amino libere din structura materialului înainte (proba martor) și după reticularea cu EDC și s-a testat degradarea *in vitro* a materialului în prezența colagenazei bacteriene. Gradul de reticulare al compozitului tratat cu EDC a fost de 3 ori mai mare față de proba martor, iar biodegradabilitatea, după 6 ore de menținere în prezența colagenazei, a fost de 2 ori mai mică decât martorul. Caracterizarea morfologică a suportului compozit prin microscopie electronică de baleiaj a evidențiat structura lui microporoasă, mărimea porilor variind între 20 și 200  $\mu\text{m}$  și prezența particulelor de beta-fosfat tricalcic substituit cu magneziu, care sunt dispuse neomogen pe suprafața fibrilelor de colagen.

Suportul compozit a fost testat din punct de vedere al biocompatibilității atât *in vitro* cât și *in vivo*. Testarea *in vitro* s-a realizat pe un model experimental reprezentat de culturi primare de osteoblaste obținute din oase parietale de la sobolani nou-născuți. Osteoblastele au fost injectate în probele de suport, la o densitate celulară de  $1 \times 10^6$  celule/ml și cultivate în

mediu de cultura, timp de 21 de zile. S-au investigat viabilitatea si proliferarea celulelor, morfologia acestora si adeziunea lor la suport, comparativ cu doua probe martor: material plastic si un suport care contine COL/beta-fosfat tricalcic fara magneziu. Rezultatele obtinute au demonstrat ca produsul realizat favorizeaza viabilitatea si proliferarea celulara, mentine morfologia normala a celulelor, cu nucleii eucromatici avand 1-2 nucleoli si o citoplasma clar delimitata. In cazul osteoblastelor cultivate in proba continand magneziu s-a observat o rata mai mare de proliferare a celulelor si o adeziune mai buna a acestora, comparativ cu suportul de COL/beta-fosfat tricalcic simplu. Celulele implantate in suportul de COL/beta-fosfat tricalcic substituit cu magneziu au prezentat fenotip osteoblastic chiar dupa perioade lungi de cultivare (21 de zile), fiind detectati *in vitro* markerii specifici osteoblastelor: fosfataza alcalina si osteocalcin.

Efectul *in vivo* al suportului compozit a fost demonstrat pe animale de laborator (sobolani Wistar) carora li s-au implantat subcutanat probe din compozitul poros, acestea recoltandu-se, apoi, la timpi variind intre 2 si 6 saptamani. Rezultatele testarilor au aratat ca, dupa 6 saptamani de la implantare, suportul compozit poros a prezentat o activitate osteoinductiva evidentiindu-se, la locul implantarii, prezenta substantei fundamentale pre-osoase depuse de osteocite, precum si a substantei osoase mineralizate.



## REVENDICARI

Produsul pe baza de fosfati de calciu si magneziu, collagen si condroitin sulfat, destinat terapiei defectelor osoase **caracterizat prin aceea ca** se prezinta ca un suport compozit poros, cu dimensiunea medie a porilor variind intre 20 si 200  $\mu\text{m}$ , biocompatibil si bioresorbabil si este constituit din 35...60 % beta-fosfat tricalcic substituit cu 2,5...10 mol.% magneziu, cu dimensiunea medie a particulelor cuprinsa intre 1...5  $\mu\text{m}$ , 25...40 % collagen tip I acido-solubil, cu greutatea moleculara medie intre 280 si 330 kDa si continut in collagen mai mare de 80 %, 12...20 % condroitin sulfat cu greutatea moleculara medie de 9...30 kDa si continut in acizi uronici de minim 25 % si 2...4 % HEPES (acid hidroxietil-piperazin-etan-sulfonic), partile fiind exprimate in greutate.

Procedeul de obtinere al produsului definit la revendicarea 1, **caracterizat prin aceea ca**, se realizeaza un suport compozit poros prin amestecarea a 9...18 parti compozitie 1, constituita dintr-o solutie de beta-fosfat tricalcic substituit cu 2,5...10 mol.% magneziu, de concentratie 4...9 %, preparata in tampon fosfat salin 2...4 %, pH 7...7,7, cu 74...85 parti compozitie 2, reprezentata de un amestec dintr-o solutie vascoasa de collagen acido-solubil 4...6 % dializat, in prealabil, fata de apa distilata si o solutie opalescenta de condroitin sulfat 2...4 % si cu 9-10 parti compozitie 3 reprezentata de o solutie HEPES de concentratie 0,3...0,5 %. Beta-fosfatul tricalcic substituit cu magneziu se obtine prin amestecarea a 40...100 g carbonat de calciu cu 30...70 g fosfat acid de amoniu, 1...3 g oxid de magneziu si 0,200...0,500 l etanol, solvent ce se evaporata ulterior prin uscare, urmata de calcinarea amestecului de componente la 900  $^{\circ}\text{C}$  si sinterizarea acestuia la 1000...1200  $^{\circ}\text{C}$ . Inainte de amestecarea cu compozitiile 2 si 3, compozitia 1 continand beta-fosfat tricalcic substituit cu magneziu se omogenizeaza prin vortexare, la temperatura camerei. Amestecul celor 3 compozitii, obtinut prin vortexare puternica, timp de 10...50 minute, la temperatura camerei, se toarna in tavite de inox si se liofilizeaza prin inghetare la temperatura de -30...-40  $^{\circ}\text{C}$  si uscare sub vid la temperaturi de +18...+25  $^{\circ}\text{C}$ .

In scopul cresterii rezistentei la degradare enzimatica, respectiv reticularii produsului, dupa liofilizare, acesta se introduce intr-o solutie de etanol 30...50 %, timp de 30...60 minute, la temperatura camerei, apoi, intr-o solutie de etil-dimetil-aminopropil carbodiimida (EDC) de concentratie 5...30 mM preparata, in prealabil, in tampon acid morfolino-etanol-sulfonic (MES) ce contine etanol 70 %, pH 5,5...6, timp de 15...24 ore, la temperatura camerei, prin agitare continua pe shaker. Suportul poros reticulat este supus unor spalari repetate cu o

30-06-2010

solutie de fosfat disodic 0,1...0,2 M, de 1...2 ori, timp de 1...2 ore, apoi cu o solutie de clorura de sodiu 0,5...1 M, de 1...2 ori, timp de 1...2 ore, dupa care se realizeaza 5-6 spalari cu o solutie de clorura de sodiu 1,5...2 M, timp de 2...4 ore si, in final, 5-6 spalari cu apa distilata, timp de 3...5 ore fiecare. Conditionarea produsului se realizeaza prin liofilizare, in conditiile prezentate anterior, dupa care se ambaleaza in pungi de polietilena si se sterilizeaza prin expunere la radiatii gamma, la doze de 15...20 kGy.