



(11) **RO 126014 B1**

(51) **Int.Cl.**

A61L 27/42 (2006.01),
A61L 27/12 (2006.01),
A61L 27/24 (2006.01),
A61L 27/20 (2006.01),
A61K 6/033 (2006.01),
A61K 6/097 (2006.01),
A61F 2/28 (2006.01)

(12)

BREVET DE INVENȚIE

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

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

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30.08.2013** BOPI nr. **8/2013**

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

(73) Titular:

- **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.A 1, 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.G 1, SC.3, AP.15, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **OPRIȚA ELENA IULIA, STR.VĂLEA IALOMIȚEI NR.6, BL.C 10, 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**

(56) Documente din stadiul tehnicii:

WO 03/071991 A1; WO 2006/031196 A1

(54) **SUPORT COMPOZIT POROS PENTRU TRATAREA DEFECTELOR OSOASE ȘI PROCEDEU DE OBȚINERE**



RO 126014 B1

1 Inventția se referă la un suport compozit, poros, pe bază de fosfați de calciu și
2 magneziu, colagen și condroitin sulfat, destinat terapiei defectelor osoase (nesudări osoase,
3 fracturi, înlocuirea osului vătămat, cancer etc.) și la un procedeu de obținere a acestuia.

4 Compușii utilizați în compoziția acestui suport compozit, fosfații de calciu și mag-
5 neziu, colagenul și condroitin sulfatul sunt constituenți naturali, care intră în compoziția
6 osului, proprietate ce face ca acest produs să fie suportul ideal pentru stimularea creșterii
7 și proliferării osteoblastelor, celule implicate în sinteza componentelor matriceale ale noului
8 țesut osos. Osul este un compozit biomineralizat complex, constând în principal dintr-o com-
9 ponentă anorganică (cristale de fosfat de calciu) și apă (70...80%) și o componentă organică
10 formată din colagen tip I, proteoglicani și alte proteine (20...30%). În timpul formării acestui
11 țesut, cristalele de fosfați de calciu se acumulează și se asociază intim la fibrele compo-
12 nentei organice, astfel că se formează un compozit cu proprietăți mecanice (greutate, rezis-
13 tență, duritate, elasticitate) și biologice (activități osteoinductive, osteogenice, angiogenice,
14 chemotactice etc.) excelente. Defectul osos și necesitatea reintegrării zonei lipsă sau măririi
15 zonei existente constituie o problemă majoră în domeniul ortopedic, maxilofacial și neuro-
16 chirurgical.

17 Principalele componente minerale ale osului sunt calciul și fosforul, care formează
18 săruri complexe ce se depun sub formă de microcristale de hidroxiapatită la nivelul fibrelor
19 de colagen. Alți compuși anorganici din compoziția osului sunt fluoruri, săruri de sodiu,
20 potasiu și magneziu. Hidroxiapatita este fosfatul de calciu cel mai des utilizat în compoziția
21 substituenților de os. Acest material are avantajul că asigură substituenților o rezistență
22 mecanică ridicată, dar, comparativ cu alte materiale ce conțin fosfat de calciu precum fosfatul
23 tricalcic (TCP) sau octocalcic (OCP), prezintă o solubilitate foarte scăzută. În cazul în care
24 se urmărește producerea de biomateriale osoase cu grad de biodegradare ridicat, se preferă
25 utilizarea fosfatului tricalcic în formă alfa-TCP sau beta-TCP.

26 Colagenul tip I este componenta organică majoră a matricelor extracelulare și se
27 cunoaște că este un substrat optim pentru atașarea și proliferarea a numeroase tipuri
28 celulare, incluzând pe cele responsabile de menținerea și organizarea osului, precum
29 celulele osteoprogenitoare, osteoblastele, osteocitele și osteoclastele (Barrere F., VAN
30 Blitterswijk C. A., De Groot K., *Internat. J. Nanomed.*, 2006, 1, 317-332). Comparativ cu osul
31 natural, colagenul este un material cu rezistență mecanică mai scăzută, dar proprietățile
32 biologice sunt superioare materialelor ceramice. Este cunoscută utilizarea acestei proteine
33 sub formă de colagen insolubil sau gelatină, mineralizată cu fosfat de calciu, pentru
34 realizarea unor materiale polimerice destinate regenerării osoase (**WO 03/071991 A1**; **WO**
35 **2006/031196 A1**). De asemenea, se cunoaște utilizarea amestecului de colagen denaturat
36 (gelatina) cu beta-fosfat tricalcic sub formă de particule sferice la realizarea de compozite
37 osoase având o suprafața specifică mare pentru aderarea celulelor (**CN 101401967**).

38 Condroitin sulfatul este un glicozaminoglican prezent în matricea extracelulară și pe
39 suprafața celulară a țesuturilor conjunctive animale, printre care și osul. În acest țesut,
40 condroitin sulfatul face parte din structura proteoglicanilor mici, de tipul decorinei și biglica-
41 nului, care au rol în reglarea mineralizării cristalelor de fosfat de calciu din compoziția osului
(Boskey A. L., Spevak L., Doty S. B., Rosenberg L., *Calcif. Tiss. Int.*, 1997, 61, 298-305).

42 Diferite biomateriale au fost investigate și propuse ca substituenți osoși, care trebuie
43 să prezinte proprietăți de biocompatibilitate ridicată și caracteristici biomimetice, pentru a
44 activa mecanismele biologice în țesutul osos gazdă și componenta lor celulară să favorizeze
45 procesele de formare și consolidare a osului. Materialele sunt, apoi, complet resorbite,
46 lăsând spațiu pentru osul nou format (**WO 2009/004445**). Dintre factorii care controlează
47 proprietățile mecanice și biologice ale biomaterialelor, cei mai importanți sunt compoziția
48 chimică și microstructura acestora, iar porozitatea joacă un rol esențial. Prezența porilor este
49 foarte importantă, pentru că permite dezvoltarea noului țesut osos în interiorul lor.

RO 126014 B1

S-a raportat obținerea unui material pentru înlocuirea osului, conținând hidroxiapatită, collagen și condroitin sulfat, prin amestecarea mecanică a celor 3 componente și reticularea dehidrotermală (EP 0214070 A1). Acest material a prezentat o bună compatibilitate, dar o remodelare limitată a țesutului lezat. Hae-Won Kim et al. descriu un nanocompozit biomimetic obținut prin coprecipitarea hidroxiapatitei cu o soluție de gelatină și liofilizarea ulterioară a amestecului (Kim H.-W., Kim H.- E., Salih V., *Biomaterials*, 2005, 26, 5221-5230). Produsul s-a obținut prin adăugarea de ioni de calciu și fosfat în soluția de gelatină, rezultând un compozit poros, util în regenerarea osului și a cartilajului, datorită unei viteze de resorbție *in vivo* adecvată, proporțională cu procesele de formare rapidă a noului țesut.

Problema tehnică pe care urmărește să o rezolve invenția constă în regenerarea țesutului osos după traumatisme, nesudări osoase, cancere, inflamații etc.

Produsul conform invenției reprezintă un suport compozit, poros, cu dimensiunea medie a porilor variind între 20 și 200 μm, biocompatibil și bioresorbabil, și este constituit din: 35...60% beta-fosfat tricalcic substituit cu 2,5...10 mol% magneziu, cu dimensiunea medie a particulelor cuprinsă între 1 și 5 μm, 25...40% collagen tip I acido-solubil, cu greutatea moleculară medie între 280 și 330 kDa, și conținut în collagen mai mare de 80%, 12...20% condroitin sulfat cu greutatea moleculară medie de 9...30 kDa și conținut în acizi uronici de minimum 25% și 2...4% acid hidroxietil-piperazin-etan-sulfonic, părțile fiind exprimate în greutate.

Procedeele de obținere a produsului, conform invenției, constă în aceea că se amestecă prin vortexare puternică, timp de 10...50 min, la temperatura camerei: 9...18 părți compoziție 1, constituită dintr-o soluție de beta-fosfat tricalcic substituit cu 2,5...10 mol % magneziu, de concentrație 4...9%, preparată în tampon fosfat salin 2...4% și pH 7...7,7, cu 74...85 părți compoziție 2, constituită dintr-o soluție vâscoasă de 4...6% collagen acido-solubil, dializat în prealabil față de apă distilată și o soluție opalescentă de 2...4% condroitin sulfat și cu 9...10 părți compoziție 3, constituită dintr-o soluție de acid hidroxietil-piperazin-etan-sulfonic, de concentrație 0,3...0,5%; amestecul astfel obținut se liofilizează prin înghețare la -30...-40°C și uscare sub vid la +18...+25°C, apoi se introduce într-o soluție de etanol 30...50%, timp de 30...60 min, la temperatura camerei, apoi, într-o soluție de etil-dimetil-aminopropil carbodiimidă de concentrație 5...30 mM, preparată, în prealabil, în tampon acid morfolino-etanol-sulfonic ce conține etanol 70%, la pH 5,5...6, timp de 15...24 h, la temperatura camerei, prin agitare continuă.

Beta-fosfatul tricalcic substituit cu magneziu se obține prin amestecarea a 40...100 g carbonat de calciu cu 30...70 g fosfat acid de amoniu, 1...3 g oxid de magneziu și 0,200...0,500 l etanol, solvent ce se evaporă ulterior prin uscare, urmată de calcinarea amestecului de componente la 900°C și sinterizarea acestuia la 1000...1200°C.

Înainte de amestecarea cu compozițiile 2 și 3, compoziția 1 conținând beta-fosfat tricalcic substituit cu magneziu se omogenizează prin vortexare la temperatura camerei.

Suportul compozit, poros, reticulat este supus unor spălări repetate cu o soluție de fosfat disodic 0,1...0,2 M, de 1...2 ori, timp de 1...2 h, apoi cu o soluție de clorură de sodiu 0,5...1 M, de 1...2 ori, timp de 1...2 h, după care se realizează 5...6 spălări cu o soluție de clorură de sodiu 1,5...2 M, timp de 2...4 h și, în final, 5...6 spălări cu apă distilată, timp de 3...5 h, fiecare. Condiționarea produsului se realizează prin liofilizare, în condițiile prezentate anterior, după care se ambalează în pungi de polietilenă și se sterilizează prin expunere la radiații gamma, la doze de 15...20 kGy.

Prin aplicarea invenției, se obțin următoarele avantaje:

- eficiență mare în tratarea afecțiunilor osoase (nesudări osoase, fracturi, înlocuirea osului vătămat, cancer etc.) conținând, în compoziția sa, biopolimeri care se găsesc, în mod natural, în țesutul osos;

RO 126014 B1

1 - produsul este implicat în procesul de inițiere a depozitării de țesut osos nou, datorită
substanțelor organice și anorganice din compoziția acestuia (efect osteoinductiv). Datorită
3 structurii sale poroase, produsul realizează un contact strâns cu zona lezată, facilitând,
astfel, influxul celulelor din țesutul neafectat înconjurător și proliferarea acestora;

5 - produsul obținut poate servi și ca matrice suport pentru celulele osului (osteoblaste)
sau celulele stern mezenchimale, oferind acestora o rețea tridimensională, asemănătoare
7 matricei extracelulare osoase - condiție esențială pentru menținerea fenotipului celular;

- suportul este biocompatibil și biodegradabil în timp, asigurând, astfel, substratul
9 ideal pentru formarea de țesut nou, în timp ce produsul este degradat, condiție esențială în
chirurgia osoasă;

11 - produsul este stabil în timp, nu creează antigenicitate în contact cu organismul;

- procedeul de obținere este relativ simplu și fezabil.

13 În vederea îmbunătățirii calităților osteoinductive ale beta-fosfatului tricalcic, s-a
adăugat, în compoziția acestuia, magneziul, care reduce degradarea fosfatului tricalcic și
15 este implicat în metabolismul mineral și previne osteoporoza. Pentru realizarea prezentei
inventii, s-a utilizat, ca sursă anorganică, un beta-fosfat tricalcic substituit cu magneziu în
17 raportul molar (Mg_xCa_{3-x}):(PO_4) de 1,5, în care substituția calciului cu magneziu a fost de
maximum 10 mol%. Verificarea purității compușilor ceramici elaborați s-a realizat prin
19 măsurători de difracție de raze X și spectroscopie în infraroșu. Morfologia și dimensiunile
granulelor au fost măsurate prin microscopie electronică de baleiaj.

21 **Exemplul 1.** Într-o moară planetară, prevăzută cu două incinte de măcinare din
poliamidă, cu un volum util de minimum 200 ml, se introduc 70 g carbonat de calciu, 50 g
23 fosfat acid de amoniu, 2 g oxid de magneziu și 250 ml etanol și se omogenizează, timp de
6 h, folosind bile de alumină. Suspensia rezultată se usucă într-o etuvă, la o temperatură de
25 80°C, timp de 8 h și, apoi, se calcinează într-un cuptor, timp de 2 h, la 900°C, temperatură
la care are loc formarea compusului fosfat tricalcic. Materialul calcinat este măcinat din nou,
27 în același tip de moară, în raportul material:bile de măcinare de 1:1,5, după care este
sinterizat la temperatura de 1100°C, timp de 2 h, în prezență de aer, când are loc formarea
29 de beta-fosfat tricalcic cu substituție izomorfă de ioni de magneziu ($-\beta-Ca_{3-x},Mg_x(PO_4)_2$),
conținând magneziu 5 mol%, cu dimensiunea medie a particulelor de 4 μm.

31 Se iau 20 g de pulbere de beta-fosfat tricalcic substituit cu magneziu astfel preparată
și se introduc într-un vas de sticlă, prevăzut cu agitare. Se adaugă apoi 0,4 l tampon fosfat
33 salin 0,2 M, pH 7,4 și se omogenizează minimum 15 min, la temperatura camerei. În final,
se obține o soluție opalescentă în care beta-fosfatul de calciu și magneziu este în suspensie
35 (compoziția 1).

Separat, într-un vas de inox, cu agitare continuă, se introduc 3 l soluție de colagen
37 0,4% (g/g), cu greutatea moleculară medie 300 kDa, obținută din tendon bovin prin extracție
cu pepsina dizolvată, în prealabil, în soluție de acid citric 0,1 M (raportul pepsină:țesut este
39 de 1:10), la 4°C, timp de 24 h și dializă excesivă față de apă distilată. Peste soluția de
colagen, se adaugă 0,15 l soluție de condroitin sulfat 5%, cu greutatea moleculară medie 10
41 kDa și conținut în acizi uronici de 27% (compoziția 2).

Într-un alt vas prevăzut cu agitare, se introduc 1,5 g HEPES și 400 ml apă distilată
43 și se agită până la dizolvarea completă (compoziția 3).

Compozițiile obținute din amestecul de colagen și condroitin sulfat și cea de HEPES
45 se adaugă peste suspensia de beta-fosfat tricalcic substituit cu magneziu, la temperatura
camerei, și se vortexează puternic, timp de 50 min, până la omogenizarea completă. Se
47 obține o soluție vâscoasă, cu aspect de gel, care se toarnă în tăvițe de inox și se liofilizează
prin înghețare la temperatura de -40°C și uscare sub vid la +25°C.

RO 126014 B1

În vederea reticulării, bucăți de suport liofilizat se introduc în etanol 40%, timp de 40 min, la temperatura camerei. Apoi, se prepară o soluție de EDC 30 mM în tampon MES dizolvat în etanol 70%, pH 5,5, în care se incubează suporturile compozite, timp de 18 h, la temperatura camerei, prin agitare continuă pe un shaker. În scopul eliminării reziduurilor de reticulant, produsul se spală de două ori cu o soluție de fosfat disodic 0,1 M, timp de 2 h, apoi, de două ori cu o soluție de clorură de sodiu 1 M, timp de 1 h, fiecare, de 6 ori cu o soluție de clorură de sodiu 2 M, timp de 3 h și, în final, se fac 6 spălări cu apă distilată, timp de 4 h, fiecare. Apoi, suporturile reticulate se usucă prin liofilizare în condițiile prezentate anterior. După liofilizare, suportul poros se ambalează etanș 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 collagen 0,6%, cu greutatea moleculară de 320 kDa, extrasă din piele bovină cu pepsină 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 collagen-condroitin sulfat s-a realizat conform exemplului 1. După liofilizarea soluției opalescente obținută, prin înghețare la -35°C și uscare la 20°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 etanș 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 collagenazei bacteriene. Gradul de reticulare al compozitului tratat cu EDC a fost de 3 ori mai mare față de proba martor, iar biodegradabilitatea, după 6 h de menținere în prezența collagenazei, 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 μm, și prezența particulelor de beta-fosfat tricalcic substituit cu magneziu, care sunt dispuse neomogen pe suprafața fibrelor de collagen.

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 șobolani nou-născuți. Osteoblastele au fost injectate în probele de suport, la o densitate celulară de 1×10^6 celule/ml și cultivate în mediu de cultură, timp de 21 de zile. S-au investigat viabilitatea și proliferarea celulelor, morfologia acestora și adeziunea lor la suport, comparativ cu două probe martor: material plastic și un suport care conține COL/beta-fosfat tricalcic fără magneziu. Rezultatele obținute au demonstrat ca produsul realizat favorizează viabilitatea și proliferarea celulară, menține morfologia normală a celulelor, cu nuclee eucromatice având 1-2 nucleoli și o citoplasmă clar delimitată. În cazul osteoblastelor cultivate în proba conținând magneziu, s-a observat o rată mai mare de proliferare a celulelor și o adeziune mai bună a acestora, comparativ cu

RO 126014 B1

1 suportul de COL/beta-fosfat tricalcic simplu. Celulele implantate în suportul de COL/beta-
3 fosfat tricalcic substituit cu magneziu au prezentat fenotip osteoblastic, chiar după perioade
lungi de cultivare (21 de zile), fiind detectați *in vitro* markerii specifici osteoblastelor: fosfataza
alcalină și osteocalcin.

5 Efectul *in vivo* al suportului compozit a fost demonstrat pe animale de laborator
(șobolani Wistar) cărora li s-au implantat subcutanat probe din compozitul poros, acestea
7 recoltându-se, apoi, la timpi variind între 2 și 6 săptămâni. Rezultatele testărilor au arătat că,
după 6 săptămâni de la implantare, suportul compozit poros a prezentat o activitate osteo-
9 inductivă, evidențiindu-se, la locul implantării, prezența substanței fundamentale preosoase
depusă de osteocite, precum și a substanței osoase mineralizate.

1. Suport compozit, poros, pe bază de fosfați de calciu și magneziu, collagen și condroitin sulfat, destinat terapiei defectelor osoase, **caracterizat prin aceea că prezintă dimensiunea medie a porilor variind între 20 și 200 um, este biocompatibil și bioresorbabil, și este constituit din: 35...60% beta-fosfat tricalcic substituit cu 2,5...10 mol % magneziu, cu dimensiunea medie a particulelor cuprinsă între 1 și 5 μm, 25 și 40% collagen tip I acido-solubil, cu greutatea moleculară medie între 280 și 330 kDa și conținut în collagen mai mare de 80%, 12...20% condroitin sulfat cu greutatea moleculară medie de 9...30 kDa și conținut în acizi uronici de minimum 25% și 2...4% acid hidroxietil-piperazin-etan-sulfonic, părțile fiind exprimate în greutate.**

2. Procedeu de obținere a produsului definit la revendicarea 1, **caracterizat prin aceea că se amestecă prin vortexare puternică, timp de 10...50 min, la temperatura camerei: 9...18 părți compoziție 1, constituită dintr-o soluție de beta-fosfat tricalcic substituit cu 2,5...10 mol% magneziu, de concentrație 4...9%, preparată în tampon fosfat salin 2...4% și pH 7...7,7, cu 74...85 părți compoziție 2, constituită dintr-o soluție vâscoasă de 4...6% collagen acido-solubil, dializat în prealabil față de apă distilată, și o soluție opalescentă de 2...4% condroitin sulfat și cu 9...10 părți compoziție 3, constituită dintr-o soluție de acid hidroxietil-piperazin-etan-sulfonic, cu o concentrație 0,3...0,5%; amestecul astfel obținut se liofilizează prin înghețare la -30...-40°C și uscare sub vid la +18...+25°C, apoi se introduce într-o soluție de etanol 30...50%, timp de 30...60 min, la temperatura camerei, apoi, într-o soluție de etil-dimetil-aminopropil carbodiimidă cu o concentrație 5...30 mM, preparată, în prealabil, în tampon acid morfolino-etanol-sulfonic ce conține etanol 70%, la pH 5,5...6, timp de 15...24 h, la temperatura camerei, prin agitare continuă.**

3. Procedeu conform revendicării 2, **caracterizat prin aceea că beta-fosfatul tricalcic substituit cu magneziu se obține prin amestecarea a 40...100 g carbonat de calciu cu 30...70 g fosfat acid de amoniu, 1...3 g oxid de magneziu și 0,200...0,500 l etanol, solvent ce se evaporă ulterior prin uscare, urmată de calcinarea amestecului de componente la 900°C și sinterizarea acestuia la 1000...1200°C.**

4. Procedeu conform revendicării 2, **caracterizat prin aceea că, înainte de amestecarea cu compozițiile 2 și 3, compoziția 1, conținând beta-fosfat tricalcic substituit cu magneziu, se omogenizează prin vortexare la temperatura camerei.**

5. Procedeu conform revendicării 2, **caracterizat prin aceea că suportul poros reticulat este supus unor spălări repetate cu o soluție de fosfat disodic 0,1...0,2 M, de 1...2 ori, timp de 1...2 h, apoi cu o soluție de clorură de sodiu 0,5...1 M, de 1...2 ori, timp de 1...2 h, după care se realizează 5...6 spălări cu o soluție de clorură de sodiu 1,5...2 M, timp de 2...4 h și, în final, 5...6 spălări cu apă distilată, timp de 3...5 h, fiecare.**

6. Procedeu conform revendicării 2, **caracterizat prin aceea că, respectiv, condiționarea produsului se realizează prin liofilizare, în condițiile prezentate anterior, după care se ambalează în pungi de polietilenă și se sterilizează prin expunere la radiații gamma, la doze de 15...20 kGy.**

