



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2010 01231**

(22) Data de depozit: **29/11/2010**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30/08/2019** BOPI nr. **8/2019**

(41) Data publicării cererii:
29/06/2012 BOPI nr. **6/2012**

(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;*
• **DAVID GETA,** *STR. ȘTEFAN CEL MARE
ȘI SFÂNT, NR. 4, SC. A, ET. 2, AP. 4, IAȘI,
IS, RO;*
• **POPA MARCEL,** *BD.NICOLAE IORGA
NR.59 B, BL.R 1, SC.A, ET.6, AP.25, IAȘI,
IS, RO;*

• **LEFTER CRISTINA MIHAELA,**
*STR. LIBERTĂȚII, BL. 323, SC. D, AP. 1,
VASLUI, VS, RO*

(56) Documente din stadiul tehnicii:
P.-C WANG, T. TAKEYAWA,
**"RECONSTRUCTION OF RENAL
GLOMERULAR TISSUE USING
COLLAGEN VITRIGEL SCAFFOLD,**
**"JOURNAL OF BIOSCIENCE AND
BIOENGINEERING, VOL. 99 (6), PP.
529-540, 2005; T. TAKEZAWA, T.
TAKEUCHIA, A. NITANI, Y. TAKAYAMA, M.
KINO-OKAD, M. TAYA, S. ENOSAWAE,**
**"COLLAGEN VITRIGEL MEMBRANE
USEFUL FOR PARACRINE ASSAYS IN
VITRO AND DRUG DELIVERY SYSTEMS
IN VIVO", JOURNAL OF
BIOTECHNOLOGY, VOL. 131,
PP. 76-83, 2007**

(54) **COMPOZIȚII VITRIGELIFIABILE ȘI PROCEDEU
PENTRU OBTINEREA VITRIGELURILOR, CU APLICAȚII
BIOMEDICALE**



RO 127487 B1

1 Invenția se referă la formularea unor compoziții vitrigelifiabile cu conținut de
2 atelocolagen cvasi-nativ, de polizaharide biologice active și de specii biochimice mic
3 moleculare, precum și la un procedeu de transformare a respectivelor compoziții în vitrigeluri
4 destinate aplicațiilor biomedicale și dermato-cosmetice, caracterizate prin aceea că se
5 prezintă sub forma unor filme compacte și flexibile, libere sau depuse pe substrat purtător,
6 cu grosimi de ordinul zecilor sau sutelor de microni, care, în urma rehidratării controlate în
7 soluții apoase, sunt capabile a reforma geluri structurate, microporoase, cu morfologie
8 internă microfibrilară, apte a susține procesele de aderare și de migrare ale celulelor
9 specifice țesuturilor conjunctive. În virtutea bioinvadabilității lor de către celule, respectivele
10 vitrigeluri pot fi utilizate ca precursori ai substraturilor destinate culturii celulare în aplicații
11 specifice ingineriei tisulare și realizării de biomateriale compozite, laminare stratificate, precum
12 și drept componente în sisteme planare de eliberare a speciilor farmaceutice la nivelul
13 plăgilor și al arsurilor, ori pentru sorbția sau eliberarea locală a fluidelor în cadrul
14 tratamentelor medicale sau dermato-cosmetice. Toate potențialele aplicații fructifică prezența
15 în vitrigeluri, sau în gelurile reformate din acestea, a structurilor microfibrilare de tip
16 colagenic, caracterizate prin morfologie și reactivitate fizico-chimică similare celor din
17 matricea extracelulară a țesuturilor conjunctive, precum și asocierea fizico-chimică a
18 acestora cu polizaharidele și speciile biochimice mic-moleculare adăugate la formulare, dar
19 și cu vectorii farmaceutici ori cosmetologici incluși în cursul obținerii vitrigelurilor, sau în
20 etapa de postprocesare a acestora.

21 Termenul de vitrigel a fost introdus pentru a defini substraturile proteice planare, cu
22 caracteristici similare gelurilor semirigide și cu rezistențe fizico-mecanice suficiente pentru
23 a permite manipularea lor în tehnicile de cultură celulară bidimensională pe ambele suprafețe
24 exterioare (**Takezawa T., Ozaki K., Nitani A., Takabayashi C, Shimo-Oka T., Cell**
25 **Transplantation, vol. 13, 2004, pp. 463-473**). Metodologia generică de obținere a
26 vitrigelurilor colagenice implică transformarea unei soluții coloidale de collagen nativ într-un
27 film semirigid hidratat, parcurgând trei etape succesive: de gelifiere prin microfibrilare, de
28 vitrifiere prin deshidratare controlată și, respectiv, de rehidratare limitată în soluții apoase,
29 cu compoziții similare fluidelor organismului uman, sau în soluții coloidale aglomerate
30 macromoleculare, cu compoziții similare fazei fluide din matricea extracelulară a țesuturilor
31 conjunctive (**Wang P.-C, Takezawa T., Journal of Bioscience and Bioengineering, 99 (6),**
32 **2005, pp. 529-540**).

33 Etapa determinantă pentru asigurarea caracteristicilor morfostructurale și de
34 reactivitate fizico-chimică a vitrigelurilor este cea de vitrifiere. Aceasta decurge prin procese
35 de eliminare treptată a apei reținute fizic în hidrogelul colagenic microfibrilar, după o cinetică
36 și în condiții care să nu conducă la asocierea ireversibilă a entităților colagenice agregate
37 supramoleculare, prevenind astfel cornificarea ireversibilă a fazei solide rezultate. Pe durata
38 etapei de vitrifiere este esențială evitarea colapsării suprafețelor exterioare ale hidrogelului,
39 expuse agentului de deshidratare, fapt care ar încetini sau chiar bloca difuzia apei dinspre
40 secțiunea stratului gelificat, cu consecințe în modificarea semnificativă a mecanismelor de
41 îndepărtare a apei. Conform literaturii de specialitate, evitarea colapsării se asigură exclusiv
42 pe calea reglării parametrilor fizici ai atmosferei în care se efectuează deshidratarea
43 (**Takezawa T., Takeuchi T., Nitani A., Takayama Y., Kino-oka M., Taya M., Enosawa S.,**
44 **Journal of Biotechnology, 131, 2007, pp. 76-83**), fapt care prelungește mult durata etapei
45 de vitrifiere, și sporește șansele de atac al microorganismelor, de impurificare cu particule
46 solide prezente în atmosferă, și de degradare hidrolitică a collagenului sub efectul
47 electroliților prezenți în secțiunea umedă a hidrogelului în curs de deshidratare.

RO 127487 B1

Formele colagenice clasic utilizate pentru obținerea vitrigelurilor cu aplicații biomedicale sunt soluțiile coloidale de colagen fibrilar tip I (denumite generic soluri colagenice), obținute prin solubilizare nednaturantă, în soluții saline sau acide. Respectiv soluri se obțin în cantități limitate și cu randamente modeste, pornind de la surse tisulare cu caracteristici speciale, în care agregarea supramoleculară este dominant asigurată prin interacțiuni fizice, și mai puțin prin reticulare covalentă. Una dintre sursele tisulare utilizate în acest sens este reprezentată de tendoanele din coada șobolanilor de laborator crescuți în condiții de strictă supraveghere veterinară. O altă sursă posibilă este reprezentată de derma sau de tendoanele unor animale îmbolnăvite intenționat de latirism. Drept consecință, solurile citate sunt costisitoare, fapt ce reduce mult aplicabilitatea la scară semiindustrială a tehnicilor de obținere a vitrigelurilor.

Problema pe care o rezolvă invenția constă în prezentarea unor compoziții vitrigelifiabile destinate obținerii de vitrigeluri cu aplicații biomedicale și farmaco-cosmetice, și a unui procedeu de obținere a acestora.

Compozițiile vitrigelifiabile, conform invenției, sunt amestecuri fizico-chimice alcătuite din trei componente unitare sau reprezentând, la rândul lor, amestecuri de specii (bio)chimice similare, constituite din:

- componenta biologic activă scleroproteică, o componentă biologic activă polizaharidică și o componentă lipsită de activitate biologică, de natură polipeptidică sau polizaharidică;

- componenta scleroproteică a amestecurilor, individual sau în asociere cu componenta polizaharidică biologic activă, se regăsește sub formă structurată microfibrilar, tactoidal sau ca domenii lax reticulate;

- componentele polipeptidice și polizaharidice lipsite de activitate biologică ale amestecurilor au rol de adjuvanți, excipienți, agenți de șarjare, agenți porogeni erodabili, având un raport de amestecare cuprins în intervalul 3:1:1...5:3:1, cu rol de generare a fazei solide.

Procedeul pentru obținerea vitrigelurilor cu aplicații biomedicale și farmaco-cosmetice, conform invenției, constă în faptul că, pornind de la compoziția definită în revendicarea 1, se obțin vitrigeluri libere sau atașate la un suport temporar, prin parcurgerea următoarelor etape: (i) gelifierea componentelor generatoare ale fazei solide, (ii) vitrifierea compoziției gelifiate, (iii) rehidratarea controlată a straturilor vitrificate, și (iv) maturarea și stocarea în condiții sterile.

Procedeul de obținere a vitrigelurilor cu aplicații biomedicale, conform prezentei invenții, prezintă următoarele avantaje:

- utilizează drept componentă colagenică speciile de tip atelocolagenic unimere, aduse în soluții coloidale hipoimunogene, obținute prin demultimerizare hidrolitică din surse tisulare nepretențioase, soluții accesibile în cantități ridicate, la costuri diminuate, comparativ cu solurile colagenice obținute prin solubilizare nehidrolitică;

- pornește de la amestecuri fizice complexe, formulate pentru a răspunde nuanțat caracteristicilor morfostructurale și de reactivitate fizico-chimică ale vitrigelurilor adaptate aplicațiilor din ingineria tisulară, pentru eliberarea speciilor farmaceutice, sorbția și vehicularea fluidelor în tratamente medicale și cosmetice;

- recurge la amestecuri ternare ce includ atelocolagen, polizaharide ori glicoproteine biologic active și compuși macromoleculari naturali, proteici și/sau polizaharidici biologic inactivi, aceștia din urmă cu rol de excipienți, de adjuvanți, de agenți de șarjare sau de agenți porogeni erodabili fizico-chimic ori enzimatic;

RO 127487 B1

1 - asigură structurarea și costructurarea atelocolagenului și a speciilor polizaharidice
ori glicozidice biologic active, cu generarea unei microstructuri fibrilare, opțional asociate cu
3 o microstructură poroasă colapsată;

- elimină riscul colării elementelor microfibrilare constituente, precum și riscul
5 cornificării ori al microfisurării în cursul etapei de vitrifiere, prin asigurarea plastifierii interne
prin intermediul speciilor (bio)chimice macromoleculare și oligomere;

7 - generează filme vitrigelifiate cu grosimi controlabile în plaja zecilor sau sutelor de
microni, unitare sau cu caracteristicile unor compozite laminare stratificate;

9 - generează filme vitrigelifiate cu grade de hidratare și/sau umflare controlate, în care
se rețin soluții ale unor specii (bio)chimice mic-moleculare din clasa modulatorilor activității
11 celulare, a speciilor farmaceutice, ori a vectorilor cosmetologici;

- generează filme vitrigelifiate cu porozitate superficială și de profunzime indusă pe
13 cale fizică, precum și cu rugozitate controlată a suprafețelor libere, obținută prin erodare;

- generează filme vitrigelifiate plane, libere sau aderente la un substrat inert de tip
15 sită, ambele forme stocabile în stare întinsă, închise sub vid și opțional congelate;

- generează filme vitrigelifiate ce pot fi formate spațial, individual sau sub formă de
17 compozit stratificat, prin aplicarea de procese fizico-chimice de reticulare controlată pe cale
hidrotermică, dehidrotermică, chimică, ori fotochimică.

19 Problema pe care o rezolvă invenția este legată de controlul riguros al derulării etapei
de vitrifiere, asigurat pe două căi, respectiv, prin formularea și preprocesarea fizico-chimică
21 și fizico-mecanică a compozițiilor și structurilor supuse deshidratării, și prin reglarea corelată
a parametrilor agentului de uscare, fapt care evită deficiențele tehnicilor de vitrifiere raportate
23 până în acest moment. Compozițiile formulate includ atelocolagen hipoimunogen de înaltă
puritate, o formă colagenică mai ieftină și accesibilă în cantități mult mai ridicate, ceea ce
25 permite transpunerea la scară tehnologică a metodei de obținere a vitrigelurilor. Prin
formulare, alături de atelocolagen, în compozițiile supuse vitrifierii se pot include și alte specii
27 biochimice, farmaceutice și chimice, utile în costructurarea microfibrilară și în inducerea unor
efecte biomedicale și cosmetice nuanțate, mult extinse comparativ cu cele asigurate de către
29 vitrigelurile clasic obținute. De asemenea, invenția soluționează problema suplimentar indusă
prin formulare, aceea a eliminării sau inactivării speciilor chimice cu rol de adjuvant al
31 structurării morfologice, în etapa de gelifiere, și, respectiv, de asistare a deshidratării, în
etapa de vitrifiere. Eliminarea sau inactivarea adjuvanților este asigurată în cadrul unor
33 subetape de postprocesare specifice, incluse în etapa de rehidratare controlată.

Formularea compozițiilor vitrigelifiabile, conform invenției, are în vedere trei etape,
35 respectiv:

(i) realizarea unor amestecuri fizice ternare, cu rol de generare a fazei solide a
37 vitrigelului, ce conțin:

- o componentă biologic activă scleroproteică, respectiv, atelocolagenul
39 hipoimunogen sau alte forme colagenice native sau cvasi-native, unimerice, aduse în soluție
coloidală stabilă;

41 - o componentă biologic activă polizaharidică, din clasa glicoz-amino-
glicanilor, a polizaharidelor funcționalizate și/sau a glicoproteinelor, capabilă de asociere și
43 de costructurare cu componenta proteică și aptă a reține, în vitrigelul final, cantități
controlabile de apă și electroliți mic moleculari anorganici și/sau organici;

45 - o componentă lipsită de activitate biologică în aplicațiile finale ale
vitrigelurilor, cu rol de excipient, de agent de șarjare, sau de proogen macromolecular solubil,
47 a cărei prezență în vitrigel poate fi temporară sau definitivă, componentă ce poate fi unitară
sau de tipul unui amestec preformat, selectată din categoria speciilor biochimice
49 polipeptidice și/sau polizaharidice uzuale;

RO 127487 B1

- componente capabile a interacționa doar fizic între ele, nu și chimic, amestecate în proporții variabile, respectând regula sumei unitare; primele două componente pot fi supuse structurării sau costructurării supramoleculare, individual sau în amestec binar, înaintea includerii în amestecul ternar;

(ii) realizarea unor amestecuri de specii biologic- și biochimic-active mic-moleculare, dozate și omogenizate în soluții tampon cu pH-uri neutre sau în apropierea neutralității, la valori dictate de asigurarea microfibrilării (atelo)colagenului și a costructurării acestuia cu polizaharidele biologic active, specii selectate din rândul modulatorilor ciclului celular, al nutrienților, al antibioticelor, al neutralizanților metaboliților celulari, al regulatorilor reologici, tensioactivilor, plastifianților biocompatibili etc.; pentru asigurarea unor efecte speciale în vitrigelurile finale, și pentru extinderea funcționalității acestora, în amestec se pot adăuga și oligomeri ori polimeri de tipul agenților de aglomerare macromoleculară, bloc-copolimerilor biocompatibili etc.;

(iii) realizarea unor blenduri finale, conținând cele două tipuri de amestecuri anterior prezentate, în proporții variabile, stabilite în mod particular, în funcție de aplicațiile vizate pentru vitrigelurile ce vor fi obținute din respectivele blenduri; de regulă, componenta dominantă a blendurilor este reprezentată de amestecul ternar, generator al fazei solide a vitrigelurilor; aducerea în contact și omogenizarea celor două componente citate ale blendurilor, precum și a subcomponentelor acestora se poate face în una sau mai multe etape succesive, utilizând diverse tehnici, între care: ampastarea, amestecarea, malaxarea, trecerea prin diafragme, recircularea prin pompare în regim peristaltic, ultrasonarea, vibrarea cu amplitudini milimetrice, parcurgerea repetată a ciclului precipitare - separare centrifugală - ampastare - resuspendare - concentrare prin diafiltrare.

Formularea amestecurilor parțiale și a blendului final se realizează conform principiilor proiectării experimentelor cu factori corelați (**Box G. E. P., Draper N. R., Response Surfaces, Mixtures and Ridge Analyses, Second Edition, John Wiley & Sons Inc., Hoboken, New Jersey, 2007, cap. 16, 17, 18**), iar stabilirea influenței condițiilor de amestecare fizică se realizează aplicând principiile experimentelor cu variabile de proces (**Smith W. F., Experimental Design for Formulation, ASA-SIAM Series on Statistics and Applied Probability, SIAM, Philadelphia, ASA, Alexandria, VA, 2005, cap. 13**). Oportunitatea încorporării în amestecuri a speciilor chimice mic moleculare, precum și natura acestora se decid în funcție de caracteristicile funcționale impuse vitrigelului vizat, pe baza principiilor ingineriei tisulare, farmacologiei, dermatologiei și cosmetologiei, după caz.

O variantă particulară de formulare a amestecurilor implică utilizarea agenților reticulantți biocompatibili, pentru pregelifierea componentei (atelo)colagenice și/sau pentru costructurarea acesteia cu componenta polizaharidică biologic activă. În acest sens, drept reticulantți se pot utiliza fie agenți ce induc punți covalente de lungime zero, care implică doar grupările funcționale ale componentelor citate, fie specii care generează punți cu lungime diferită de zero, ce interpun tronsoane catenare între grupările funcționale interconectate. Condițiile impuse reticulantților utilizabili și proceselor de reticulare în care aceștia intervin sunt biocompatibilitatea, operarea în plaja pH-urilor fiziologice și inexistența ori biocompatibilitatea produselor secundare și a celor de control sau inhibare a reacțiilor de reticulare. Din prima categorie de reticulantți se pot utiliza diverse carbodiimide sau transglutaminaza (EC 2.3.2.13), o enzimă deosebit de eficientă în reticularea substraturilor proteice. Din cea de-a doua categorie, aplicabile sunt oricare dintre speciile reactive difuncționale mic-moleculare sau oligomere, liniare, solubile și stabile în mediu apos, biocompatibile, presintetizate sau generate *in situ*. Drept exemple se citează diizocianații, dicarbonilii, dioxiranii, oligomerii acrilici difuncționali, precum și orice alți compuși utilizabili în procesele

RO 127487 B1

1 de conjugare a proteinelor cu diverse specii de interes biochimic (**Wong S. S., Chemistry**
2 **of Protein Conjugation and Cross Linking, CRC Press Inc., 1993, capitolele 3, 4, 5, 6**),
3 ori cu polimeri de sinteză (**Niemeyer C. M., Bioconjugation Protocols. Strategies and**
4 **Methods, Methods in Molecular Biology vol. 283, Humana Press Inc., Totowa,**
5 **New Jersey, 2004, cap. 4**). Componenta colagenică pregelifiată, rezultată în urma
6 proceselor de reticulare, o poate înlocui pe cea microfibrilată, atunci când integritatea
7 domeniilor triplu helicale nu este esențială în aplicațiile vitrigelurilor. În aceste cazuri,
8 colagenul sau atelocolagenul poate fi înlocuit, total sau parțial, cu gelatine înalt moleculare,
9 de preferință obținute prin tratament acid, pentru a avea un pH izoelectric minimal deplasat
10 către plaja acidă.

11 Procedeu pentru obținerea vitrigelurilor, conform invenției, include următoarele etape,
12 proiectate pentru a asigura reproductibilitatea compozițională și structurală, derulate toate
13 în condiții de sterilitate și de curățenie conforme reglementărilor corespunzătoare aplicațiilor
14 finale ale produsului, dublate de condiții de lucru nedenaturante pentru forma proteică
15 înglobată:

16 (i) formularea și realizarea efectivă a blendului din care se va genera vitrigelul, cu
17 aducerea sa sub formă fluidă; această etapă este echivalentă celei de gelifiere cuprinsă în
18 metodologia generică de obținere a vitrigelurilor;

19 (ii) procesarea fizico-chimică și fizico-mecanică a blendului fluid, pentru perfectă
20 omogenizare a componentelor, prin cicluri repetate de ultrasonare, ampastare, recirculare
21 prin pompare în regim peristaltic, extrudare prin orificii inelare etc.;

22 (iii) reducerea conținutului de umiditate a blendului fluid pe cale fizico-mecanică, sub
23 influența vibrațiilor și/sau prin centrifugare;

24 (iv) depunerea blendului fluid, în strat subțire, pe suport solid acoperit cu un film
25 uscat, obținut pornind de la soluția unui polimer hidrofil greu solubil, sau de la o soluție ce
26 conține un amestec de polimeri hidrofilii și hidrofobi, în proporții favorabile celor hidrofilii; drept
27 polimer hidrofil se poate utiliza polivinilpirolidona, polietilenoxidul sau hidroxipropil-
28 metilceluloza (CAS 9004-65-3), iar drept polimer hidrofob, acetatul de polivinil, polivinil
29 stearatul (CAS 9003-95-6) sau polivinil cinamatul (CAS 9050-06-0); toți polimerii de sinteză
30 utilizați vor avea mase moleculare de ordinul sutelor de kilodaltoni, pentru a preîntâmpina
31 migrarea lor facilă în stratul de blend fluid depus; filmul de acoperire poate fi realizat și
32 utilizând amestecuri de tensioactivi cu valori HLB distonante, care însă furnizează
33 amestecului un HLB favorabil repelenței soluțiilor apoase; între tensioactivii utilizabili se
34 înscriu cei din gama Tween și Span; o variantă preferabilă pentru realizarea filmului de
35 acoperire este utilizarea unor amestecuri de poloxameri, al căror HLB este, de asemenea,
36 favorabil repelenței soluțiilor apoase; înaintea depunerii blendului fluid, filmul de interfață se
37 supune unor spălări succesive cu soluții apoase sterile, ce conțin, între altele, alcooli,
38 antibiotice și antifungice; depunerea blendului fluid se poate realiza și pe suporturi
39 purtătoare, de tipul sitelor fine, cu ochiuri de 103 până la 381 μm (150 până la 40 mesh), din
40 fire de polipropilenă sau nylon (cu diametre de 0,066 până la 0,264 mm), anterior tratate cu
41 amestecuri de poloxameri al căror HLB final este favorabil repelenței soluțiilor apoase;
42 grosimea stratului de blend fluid depus pe suportul solid sau pe cel de tip sită se stabilește
43 în funcție de grosimea finală dorită a vitrigelului, de metodologia de deshidratare ce va fi
44 aplicată, de modul de formulare a blendului și de eventuala transformare preliminară în
45 criogel, înaintea vitrifierii;

RO 127487 B1

(v) vitrifierea stratului de blend fluid, prin eliminarea progresivă a apei din volumul acestuia pe calea vaporizării lente, sub acțiunea unui agent fizic de uscare; deshidratarea se realizează în patru etape ce diferă între ele în funcție de parametrii agentului de uscare: într-o primă etapă, stratul de blend fluid se menține spre maturare în incinte sterile, închise ermetic, la temperatura ambiantă, la umiditate relativă ridicată, asigurată de o soluție saturată de KNO_3 ; în cursul acestei etape suprafața stratului de blend fluid se „relaxează” și devine perfect netedă, uniform hidratată și neaderentă la marginile casetei în care blendul a fost depus; cea de-a doua etapă decurge sub vid moderat, în condiții sterile, la temperatura ambiantă, în prezența unei soluții saturate de NaOH, avidă față de vaporii de apă, care asigură în incintă o umiditate relativă de $75 \pm 2\%$; pe durata acestei etape, la suprafața și în etajele exterioare ale stratului de blend se formează micropori ce vor permite ulterior eliminarea uniformă a umidității din profunzimea stratului; vidarea incintei se aplică periodic, pentru a asigura variații de maximum 30 mm coloană Hg față de depresiunea aleasă ca parametru de lucru; deși umiditatea relativă de echilibru în incinte scade puțin odată cu scăderea presiunii (Ivashchenko V. E., Rudykh I. A., Kolomyitsev V. P., Simulik M. D., Belashitskii A. P., Platonov A. A., **Saturated Salt Solutions for Calibrating Humidity at Elevated Pressures, Measurement Techniques (Izmeritelnaya Tekhnika), 6, 1974, pp. 85-85**), vidarea asigură preluarea excesului de vaporii de apă, dar mai ales constanța și reproductibilitatea caracteristicilor microporilor formați în stratul de blend fluid; a treia etapă se conduce sub vid, dar concomitent și în prezența unui desicant solid (CaCl_2 sic., silicagel, NaOH), fin măcinat și depus în săculeți din sită de polipropilenă sau nylon; în cursul acestei etape se elimină apa reținută fizic în porii deja existenți și în capilarele în curs de formare; a patra etapă se derulează la temperatura ambiantă, timp de câteva zile, într-o incintă sterilă în care aerul este recirculat, în condiții sterile, la debit constant, peste site moleculare de tipul 4A, astfel încât umiditatea reziduală să se încadreze între 200 și 350 ppm; în această etapă are loc uscarea avansată a stratului de blend, și transformarea acestuia într-un film semirigid;

(v bis) vitrifierea stratului de blend se poate realiza și după transformarea preliminară a acestuia în criogel, prin liofilizare; în această variantă se induce o microstructurare la nivelul stratului, cu formarea de pori interconectați; în vederea liofilizării, stratul de blend fluid se supune mai întâi unei maturări la rece, iar apoi congelării; liofilizarea se conduce la temperatura ambiantă, sub depresiune constantă, asigurată prin vid avansat; în urma liofilizării rezultă un strat microporos, structurat, cu caracteristicile unui criogel; pentru transformarea acestuia într-un vitrigel care să „memoreze” microstructurarea, se impune rehidratarea sa controlată, în incinte climatizate, urmată de o eventuală îmbibare cu soluții tampon și apoi de vitrifiere; rehidratarea se efectuează în trei etape, în condiții sterile; parametrii umiditate relativă - temperatură la care se conduce rehidratarea sunt corelați astfel încât să nu se atingă punctul de rouă; dacă este necesar, o supraumidificare a criogelului se poate realiza prin menținere în atmosferă cu 92...95% umiditate relativă, într-o incintă sterilă, închisă ermetic, în prezența unei soluții saturate de KNO_3 ; dacă se impune îmbibarea cu soluții tampon ce pot conține specii de interes biochimic, farmacologic sau cosmetic, aceasta se efectuează pulverizând treptat soluția peste suprafețele libere ale criogelului, până la atingerea gradului dorit de îmbibare; dacă se urmărește stratificarea mai multor criogeluri, înaintea rehidratării sau îmbibării, suprafețele libere ale acestora se scămoșează superficial, utilizând o perie sterilă; stratul de criogel sau stiva anterior rehidratate ori îmbibate se supun apoi presării mecanice, în condiții sterile, la rece, cu preluarea excesului de umiditate scurs; presarea se poate realiza cu sau fără limitarea grosimii stratului; dacă respectiva grosime trebuie limitată, stratul sau stiva de criogel rehidratate sau îmbibate se depun într-o casetă din teflon, cu capac profilat și prevăzută cu orificii laterale, pentru drenarea lichidului dislocuit; deshidratarea stratului sau stivei rezultate în urma presării se efectuează, în continuare, după prescripțiile etapei (v);

RO 127487 B1

1 (vi) maturarea filmului vitrifiat, prin menținere timp de mai multe zile în incintă sterilă,
sub vid moderat, la temperatura ambiantă sau la frigider, în prezența unor pastile de „spirt
3 solid” sau a unei compoziții gelificate conținând alcool etilic, preparată conform exemplului 1
din brevetul **US 2613142/1948**, sau exemplului 4 din brevetul **US 4971597/1990**;

5 (vii) rehidratarea controlată a stratului sau stivei vitrificate, prin redobândirea lentă a
umidității în atmosferă controlată, urmată de îmbibarea și/sau umflarea limitată, cu soluții
7 apoase ale unor specii chimice mic-moleculare de interes biochimic, farmacologic sau
cosmetic; se efectuează în două etape, conduse astfel încât stratul sau stiva vitrifiată să
9 redobândească lent și progresiv apa de hidratare, apa capilară și apa de imbibitie necesare
atingerii caracteristicilor de vitrigel; prima etapă se derulează în incinte climatizate, cu
11 recircularea internă a aerului, în condiții sterile, la trei trepte de umiditate relativă crescătoare
a aerului, și la temperaturile cele mai joase, ce reușesc să evite atingerea punctului de rouă
13 (**Genskow L. R., Beimesch W. E., Hecht J. P., Kemp I., Langrish T., Schwartzbach C,
Smith F. L., Perry's Chemical Engineer Handbook, 8-th Edition, Section 12:
15 Psychrometry, Evaporative Cooling, and Solids Drying, McGraw-Hill Co. Inc., New
York, 2008; Wagner W., Kretzschmar H. J., International Steam Tables. Properties of
17 Water and Steam Based on the Industrial Formulation IAPWS-IF97, Second Edition,
Springer Verlag, Berlin, 2008**); a doua etapă se realizează prin pulverizarea sau prin
19 picurarea simultană în mai multe puncte a unei soluții apoase ce conține compuși
mic-moleculari necesari a fi introduși în vitrigel, în funcție de gama de aplicații vizate; dacă
21 în etapa de gelifiere, în cursul preparării blendului fluid, s-au aplicat tratamente de reticulare,
în etapa de rehidratare stratul sau stiva vitrificate se pot supune direct umflării în soluția cu
23 compuși mic-moleculari, controlând gradul de umflare prin măsurarea creșterii grosimii;

(viii) post-tratarea filmelor de vitrigel în scopul conferirii unor caracteristici morfo-
25 structurale și de reactivitate speciale se realizează prin eluarea suprafețelor libere ale
acestora cu soluții ale unor specii chimice și/sau ale unor enzime capabile să inducă atacul
27 selectiv și erodarea diferențiată asupra unora dintre componentele vitrigelului; de regulă sunt
vizate speciile cu rol de excipient, lipsite de activitate biologică, introduse în amestecul ternar
29 formulat; eluarea se realizează prin prelingerea soluțiilor de post-tratare pe suprafețele
vitrigelului plasat pe un suport plan, înclinat, prevăzut la partea superioară cu un deversor
31 unghiular, pentru uniformizarea filmului de lichid prelins; pe durata eluării, suportul se
menține într-o incintă sterilă, la temperatura ambiantă, în prezența unei soluții saturate de
33 $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, care asigură o umiditate relativă de $33 \pm 1\%$; excesul de soluție de post-tratare
„uzată” se colectează la baza planului înclinat, într-un recipient în care s-a introdus
35 $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ sau $CaCl_2$ sub formă solidă; durata eluării se stabilește în funcție de natura și
de cinetica proceselor de atac (bio)chimic și de erodare avute în vedere la post-tratare,
37 precum și de profunzimea până la care filmul de vitrigel trebuie afectat; în cursul acestui
tratament pot surveni procese fizico-chimice de tipul echilibrelor la interfețe, al căror control
39 se poate realiza modificând umiditatea relativă în incintă și/sau temperatura de lucru, în
sensul scăderii acesteia din urmă până în pragul atingerii punctului de rouă, evitând însă
41 saturarea cu vapori a atmosferei din incintă; post-tratarea se poate efectua și în scopul
contactării prelungite a filmului de vitrigel cu soluții apoase ale unor antibiotice și antifungice,
43 inclusiv cu compoziții active împotriva micoplasmelor libere sau intracelulare, de tipul
Plasmocin (produs de InvivoGen); un astfel de tratament poate, de asemenea, încheia etapa
45 de post-tratare;

(ix) maturarea vitrigelului obținut, în două etape, la două umidități relative des-
47 crescânde ale aerului, în vederea formării unei cruste ușor deshidratate la nivelul supra-
fețelor libere; prima etapă implică menținerea în incintă sterilă, la temperatura ambiantă, în
49 prezența unei soluții saturate de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, care asigură o umiditate relativă de $33 \pm 1\%$;

RO 127487 B1

a doua etapă se derulează la aceiași parametri, dar în prezența unei soluții de 60% H₂SO₄ analitic pur, care asigură o umiditate relativă de 16 ± 1%; deshidratarea superficială poate închide sau consolida porozitatea superficială a filmului de vitrigel, modificându-i caracteristicile de rehidratare suplimentară;

(x) desprinderea vitrigelurilor de pe suport se aplică doar filmelor generate pe substrat temporar, nu și celor aderente la site din polipropilenă sau nylon; se efectuează pe cale mecanică sau sub efectul combinat al congelării în incintă cu umiditate scăzută, și al tensionării mecanice; cea de-a doua tehnică de desprindere se aplică doar atunci când suportul a fost tratat cu un polimer, un amestec de polimeri, un amestec de poloxameri sau un amestec de tensioactivi, caracterizate prin temperaturi de tranziție vitroasă sub cea la care se efectuează congelarea;

(xi) maturarea finală a filmelor de vitrigel se aplică imediat după desprinderea acestora de pe suport; filmele de vitrigel se decupează la dimensiunile dorite, iar apoi se introduc între două folii din Mylar (polietilen tereftalat laminat biaxial, liber de plastifianți), iar ansamblul se presează moderat, în condiții sterile, menținându-se într-o incintă cu recirculare forțată a aerului, condiționată la 4°C și 30% umiditate relativă; înaintea utilizării, foliile din Mylar se sterilizează și se tratează cu compoziții active împotriva micoplasmelor; filmele de vitrigel formate pe suport purtător se decupează, anterior maturării, la dimensiunile dorite, iar pe conturul marginilor se practică incizii ale filmului de vitrigel, fără a afecta suportul; în continuare, maturarea se efectuează după aceeași procedură, dar presarea se înlocuiește cu tensionarea sitei pe o placă din teflon curbată; filmul se acoperă cu o folie din Mylar sterilizată și tratată împotriva micoplasmelor, tensionată și ea peste placa din teflon;

(xii) ambalarea filmelor de vitrigel obținute se realizează în funcție de modul în care au fost formate: cele libere se includ în plicuri din Mylar sterilizate și tratate împotriva micoplasmelor, iar acestea din urmă se închid ermetic sub vid, în condiții sterile, în pungi din polietilenă; cele formate pe suport purtător se eliberează de porțiunile marginale decupate, iar apoi se ambalează conform aceleiași proceduri;

(xiii) stocarea filmelor de vitrigel ambalate sub vid se realizează în loturi de 10...100 pungi, care se închid ermetic în casete din polietilenă în care s-a adăugat o soluție de antibiotice și antifungice de uz general; în această stare, filmele de vitrigel se pot păstra la frigider, timp de 9...18 luni, fără a-și pierde caracteristicile dobândite; după această perioadă, în vederea prelungirii stocării, casetele din polietilenă ce conțin pungile cu filmele de vitrigel se pot supune congelării rapide, la -80°C; în această stare, durata de stocare se poate tripla, dar caracteristicile vitrigelurilor se înrăutățesc, ele putând fi utilizate doar în scopuri farmaceutice și dermato-cosmetice, nu și în aplicații ale ingineriei tisulare; decongelarea casetelor se efectuează în două etape, mai întâi până la -20°C și apoi lent, până la 4°C.

În continuare se prezintă 9 exemple de formulare a compozițiilor vitrigelifiabile și de aplicare a procedurii de vitrigelifiere a acestora, conform invenției. Descrierile ce urmează au titlu exemplificativ din următoarele puncte de vedere:

- sursa tisulară din care se obține atelocolagenul și tipul de atelocolagen fibrilar utilizat;

- natura polizaharidelor sau a glicoproteinelor biologic active utilizate;

- natura compușilor polipeptidici, proteici și polizaharidici lipsiți de activitate biologică, utilizați la formularea compozițiilor vitrigelifiabile;

- natura compușilor (bio)chimici utilizați la formularea compozițiilor vitrigelifiabile;

- rapoartele de amestecare în oricare dintre amestecurile fizice care concură la formularea compoziției vitrigelifiabile;

- parametrii de lucru și speciile chimice implicate în oricare dintre etapele de formulare a compozițiilor vitrigelifiabile și de obținere a vitrigelurilor;

RO 127487 B1

1 - echipamentele, instalațiile și dispozitivele utilizate pentru procesarea compozițiilor
vitrigelifiabile și pentru formarea straturilor de vitrigel, în oricare dintre etapele de obținere
3 a vitrigelurilor;

5 - numărul și succesiunea subetapelor din cadrul celor trei etape generice de obținere
a vitrigelurilor, respectiv, cele de gelifiere, vitrifiere și rehidratare a blendurilor supuse
vitrigelifierii;

7 - natura speciilor chimice adjuvante și a suporturilor implicate în formularea
compozițiilor vitrigelifiabile și în obținerea vitrigelurilor;

9 - modul de pregătire în vederea stocării, și modul de stocare a vitrigelurilor obținute
conform invenției;

11 - denumirile atribuite etapelor, operațiilor și proceselor descrise în invenție.

Exemplul 1. Formularea compozițiilor vitrigelifiabile

13 Face parte integrantă din procedeul de obținere a vitrigelurilor, reprezentând prima
etapă a acestuia, ce se încheie cu obținerea blendului fluid. Toate operațiile pe care le
15 implică formularea compozițiilor vitrigelifiabile se efectuează în condițiile de sterilitate și de
curățenie impuse de gama de aplicații vizată, respectiv, în încăperi de tip clean-room de nivel
17 minim ISO 8 (conform ISO 14644-1/1999). În toate cazurile, apa utilizată în formulare, pentru
prepararea soluțiilor și a formelor lichide, va avea puritate farmaceutică, fiind sterilă și liberă
19 de pirogeni, preparată și testată conform prescripțiilor Farmacopeei Europene, ediția a 7-a,
monografia 01/2009:1927. Toate soluțiile compușilor mic moleculari se supun, imediat după
21 preparare, filtrării prin membrane cu porozitatea echivalentă de 0,22 μm , în vederea
sterilizării.

Exemplul 1.1. Formularea amestecurilor fizice ternare

23 Se pornește de la soluții de atelocolagen hipoimunogen de înaltă puritate, de tip I,
25 obținute conform cererilor de brevet **RO A2007-00766** sau **RO A2009-01018**. Într-o primă
etapă, acestea se supun microfibrilării sau, pornind de la ele, se generează agregate
27 tactoidale, ori hidrogeluri reticulate lax, pe cale chimică, în toate cele trei cazuri obținându-se
sisteme polidisperse la limita gelifierii.

29 **1.1.A.** Dacă soluțiile de atelocolagen se supun microfibrilării, acestea se aduc mai
întâi la pH de $3,5 \pm 0,1$, se supun ultrasonării timp de 10 min, în baie de ultrasonare cu
31 frecvența de 42 kHz, la o intensitate acustică de $0,4 \dots 0,8 \text{ W/cm}^2$, se termostatează la
 $8 \pm 2^\circ\text{C}$, iar apoi, sub agitare energetică, li se adaugă lent soluție saturată de NaCl în canti-
33 tatea necesară pentru a asigura în soluția de atelocolagen o concentrație de 1,3 moli/L NaCl.
În paralel cu dozarea NaCl, temperatura soluției de atelocolagen se crește cu o pantă de
35 $0,2 \dots 0,5^\circ\text{C/min}$, până la valoarea de $28 \pm 2^\circ\text{C}$. Dozarea soluției saturate de NaCl și încălzirea
soluției de atelocolagen se corelează, astfel încât ultima treime a volumului soluției de sare
37 să se adauge după ce temperatura a atins valoarea finală. În continuare, în vederea matu-
rării agregatelor supramoleculare, suspensia formată se aduce și se menține la $25 \pm 1^\circ\text{C}$ timp
39 de 6...12 h, sub agitare lentă. La final, suspensia se ultrasonează de trei ori câte 15 min, pe
baie de ultrasonare răcită cu gheață, la frecvența de 42 kHz și la o intensitate acustică de
41 $0,4 \dots 0,8 \text{ W/cm}^2$, intercalând câte 45 min ședere statică. În vederea separării fracției solide,
suspensia se împarte în flacoane cu volumul de 250 mL și se supune centrifugării la
43 4000...9000 g, timp de 20...40 min, la final reținându-se sedimentul.

45 **1.1.B.** Dacă se întrevede agregarea supramoleculară a atelocolagenului sub formă
de tactoizi, soluțiile se termostatează la 4°C , după care li se adaugă lent, sub agitare
eficientă, o soluție ce conține 0,1 M Na_2HPO_4 și 0,5 M Na_2SO_4 , până când nu se mai înre-
47 gistrează variații de pH . Precipitatul floconos rezultat se lasă să sedimenteze, iar apoi se
separă centrifugal, în condițiile descrise în paragraful 1.1.A. Sedimentul se resuspendă apoi
49 într-o soluție de NH_4OH cu pH -ul inițial de 9,2, corectând în permanență valoarea pH -ului,

RO 127487 B1

pe întreaga durată a resuspendării, la 9,2 unități. În continuare, sub agitare energetică, pentru fiecare 100 mL soluție coloidală obținută după resuspendare se adaugă, în porții mici, 0,18...0,22 g $\text{CaCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ sub formă solidă, fin măcinată, astfel încât concentrația sării de calciu să atingă 0,8...0,95 mM. Apoi, sistemul coloidal se lasă spre maturare timp de 6...18 h, la 4°C, sub agitare prin unduire. Suspensia de atelocolagenat de calciu rezultată se diluează apoi 1:3 cu soluție de NH_4OH având pH-ul de 9,2, sub agitare lentă, prin unduire, după care se decantează, iar sedimentul floconos se separă centrifugal, la 1000...3000 g, timp de 10...40 min, în condiții de termostatare la $8 \pm 2^\circ\text{C}$. Sedimentul se resuspendă în 1000% v/m soluție de NH_4OH având pH-ul de 9,2, se decantează și se centrifughează în aceleași condiții. Pentru eliminarea avansată a ionilor de calciu nelegați, resuspendarea, decantarea și centrifugarea se repetă de încă trei ori. În continuare, sedimentul rezultat după ultima separare centrifugală se resuspendă în apă sterilă, liberă de pirogeni, iar soluției obținute i se ajustează pH-ul la 6,8. Pentru a preveni agregarea prin microfibrilare în cursul tratamentelor ulterioare (în detrimentul obținerii de agregate tactoidale), în soluție se adaugă uree recristalizată în condiții sterile, în cantitatea necesară pentru atingerea concentrației de 0,3 M. Sistemul coloidal rezultat se supune ultrasonării, de trei ori câte 15 min, pe baie de ultrasonare răcită cu gheață, la frecvența de 42 kHz și la o intensitate acustică de 0,4...0,8 W/cm^2 , intercalând câte 45 min ședere statică. Apoi, soluției coloidale termostatate la 4°C i se adaugă, sub agitare viguroasă, o soluție de transglutaminază (EC 2.3.2.13), anterior preparată în tampon HEPES la pH de 6,8, cu adaos de 10 mM 1,4-bis-sulfanilbutan-2,3-diol (CAS 16096-97-2), astfel încât concentrația enzimei în soluția de atelocolagen să atingă 200...400 unități enzimatică per gramul de atelocolagen. Activitatea enzimatică a soluției de transglutaminază se determină utilizând kit-ul CS1070, livrat de Sigma-Aldrich. În continuare, sub agitare energetică, temperatura sistemului coloidal se aduce la $20 \pm 0,5^\circ\text{C}$, cu o pantă de $0,5^\circ\text{C}/\text{min}$, și se menține la această temperatură timp de 30...45 min, supraveghind evoluția gelifierii. Gelul lax obținut se răcește, sub agitare, până la $5 \pm 1^\circ\text{C}$, iar apoi se supune ultrasonării de trei ori câte 15 min, pe baie de ultrasonare răcită cu gheață, la frecvența de 42 kHz și la o intensitate acustică de 0,4...0,8 W/cm^2 , intercalând câte 45 min ședere statică. În continuare, pentru inhibarea transglutaminazei, peste sistemul coloidal rezultat se adaugă Na_4EDTA (CAS 8013-51-2) și iodacetamidă (CAS 144-48-9), în cantitățile necesare pentru a asigura concentrațiile de 2,5 și, respectiv, 0,12 mM. Ultrasonarea se repetă, la aceiași parametri, până la fluidificarea și omogenizarea sistemului coloidal. După o maturare statică, timp de 4...12 h, la 4°C, sistemul coloidal se diluează de cinci ori, sub agitare eficientă, cu o soluție sterilă ce conține 136 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 0,42 mM NaH_2PO_4 , 12 mM NaHCO_3 , 5,5 mM glucoză, 10 mM Triton X 100, 25 mM 1,2-etandiol, 5% glicerină pură, 0,75 g/l doxiciclină hclat, 5 mM HEPES, iar lichidul rezultat se supune separării centrifugale, timp de 30...60 min, la 1500...3000 g, reținând sedimentul. Acesta din urmă se resuspendă într-un volum de 10...15 ori mai mare de soluție având compoziția mai sus precizată, răcită la 4°C, după care se separă centrifugal în aceleași condiții. Resuspendarea și centrifugarea se repetă de 3...5 ori, pentru eliminarea urmelor de enzimă și de inhibitori ai acesteia. Sedimentul final va conține agregate tactoidale de atelocolagen, alături de cantități reziduale de forme atelocolagenice microfibrilare.

1.1.C. Dacă se urmărește obținerea de hidrogeluri laxe, reticulate covalent, soluțiile de atelocolagen se supun mai întâi degazării eficiente sub vid moderat ($0,03...0,05 \text{ kgf}/\text{cm}^2$), timp de 16...24 h, la $5 \pm 2^\circ\text{C}$, apoi se congelează la $-20...-40^\circ\text{C}$ și se supun liofilizării. Liofilizatul se îmbibă și apoi se solvă în 200...500% v/m soluție alcalină cu pH de $10 \pm 0,3$, ce conține 0,064 M NaHCO_3 și 0,036 M Na_2CO_3 . După completa dizolvare, soluția coloidală obținută se supune ultrasonării de trei ori câte 15 min, pe baie de ultrasonare răcită cu gheață, la frecvența de 42 kHz și la o intensitate acustică de 0,4...0,8 W/cm^2 , intercalând câte 45 min ședere statică, iar apoi se filtrează peste membrane cu porozitatea de 0,4 μm .

RO 127487 B1

1 După răcirea la $10 \pm 2^\circ\text{C}$, în soluția coloidală se dizolvă, sub agitare energetică, 3...8% v/v
3 1,4-butandiol-diglicidil-eter (CAS 2425-79-8). Pentru energizarea reacțiilor de reticulare,
5 temperatura soluției se ridică la 20...25°C, cu o pantă de 0,5°C/min, sub agitare lentă,
7 urmărind evoluția viscozității și intervenind cu perioade de agitare energetică atunci când
9 aceasta tinde să crească prea rapid. După atingerea temperaturii prescrise, perioadele
11 alternante de agitare lentă și agitare energetică se extind pe durata a încă 3...9 h. Dacă este
13 prea rapidă creșterea viscozității, soluția alcalină cu pH de $10 \pm 0,3$ se înlocuiește cu o
15 soluție al cărei pH se ajustează între 8,5 și 9,0, obținută pornind de la o soluție 0,025 M
17 $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$. La final, temperatura hidrogelului lax obținut se coboară la $5 \pm 2^\circ\text{C}$, iar
19 apoi hidrogelul se supune centrifugării timp de 30...60 min, la 1500...3000 g, reținând
21 sedimentul. Separarea centrifugală a sedimentului se repetă de încă două ori, la aceiași
parametri, în condiții de termostatare la $5 \pm 2^\circ\text{C}$, îndepărtând de fiecare dată lichidul rezultat
în urma sinerezei forțate. Dacă se impune o concentrare suplimentară a hidrogelului, acesta
se depune, în condiții sterile, în tăvi scunde, din polipropilenă, care se supun apoi vibrării
mecanice cu amplitudini de 0,3...1,2 mm, la frecvența de 50 Hz. Printr-un colț ușor înclinat
al tăvilor, lichidul eliberat prin sinereză se drenează periodic. O sinereză mai energetică se
poate induce în întreaga masă a hidrogelului prin ultrasonare, dar în acest caz apare riscul
supraîncălzirii zonale, mai ales la interfața cu elementele vibrante, fapt care poate conduce
la denaturarea termică a atelocolagenului. După încheierea concentrării suplimentare,
hidrogelul se supune unei separări centrifugale finale, în aceleași condiții ca și anterioarele,
reținând sedimentul.

23 **1.1.D.** Formele de agregare supramoleculară a atelocolagenului, obținute conform
25 descrierilor din paragrafele 1.1.A (microfibrile), 1.1.B (tactoizi) sau 1.1.C (domenii lax geli-
27 fiate), aflate în stare păstoasă, așa cum au rezultat după separarea centrifugală finală, se
29 amestecă apoi fizic cu speciile polizaharidice biologic active aflate în stare solidă sau pre-
31 gelifiată, urmând procedurile descrise în cele ce urmează. Drept componentă polizaharidică
33 biologic activă se pot utiliza: hialuronanul cu orice masă moleculară (ca acid liber, CAS 9004-
35 61-9, sau sub forma sărurilor de sodiu ori de potasiu ale acestuia, CAS 9067-32-7, respectiv,
37 CAS 31799-91-4), oricare dintre glicoz-amino-glicanii acizi specifici țesuturilor conjunctive
39 (de preferință condroitin sulfatul extras din cartilaj de rechin, CAS 9007-28-7), ori heparina
41 (sub formă de sare de sodiu, CAS 9041-08-1). Amestecarea agregatelor atelocolagenice cu
43 speciile polizaharidice biologic active se realizează în două etape, respectiv, contactarea
45 statică prelungită și omogenizarea în regim de agitare și/sau curgere. În prima etapă, lucrând
47 în condiții sterile, forma atelocolagenică păstoasă se depune în strat subțire în tăvi scunde
49 din polipropilenă, iar deasupra se presară uniform, prin cernere, polizaharidul în stare solidă.
Imediat după aceea se adaugă un nou strat de formă atelocolagenică păstoasă. Etajarea se
poate repeta de un număr oarecare de ori, ultimul strat fiind unul din forma atelocolagenică.
Polizaharidul se poate depune și sub formă pregelifiată, de asemenea, stratificat. Tăvile cu
straturile celor două componente biologic active se mențin la $5 \pm 2^\circ\text{C}$, timp de 6...36 h, inter-
calând periodic timpi de vibrație mecanică la frecvența de 50 Hz, cu amplitudini de 0,5...3 mm
și drenând lichidul separat. În cea de-a doua etapă, omogenizarea compoziției păstoase
rezultate se realizează prin malaxare, prin calandrare sau prin extrudare, în funcție de
viscozitatea atinsă și de forma sub care s-a depus componenta polizaharidică. La finalul
omogenizării se aplică o maturare statică sau sub agitare lentă, prin rostogolire, timp de
6...18 h, la $5 \pm 2^\circ\text{C}$, în condiții sterile. Cea de-a treia componentă a amestecului ternar,
alcătuită din forme colagenice și/sau polizaharide lipsite de activitate biologică, se amestecă
în compoziția anterior obținută, urmând aceeași metodologie de stratificare, în aceleași etape
și în aceleași condiții. Compoziția componentei biologic inactive se preformulează și poate
conține gelatine, hidrolizate de colagen, alte forme scleroproteice, toate adăugate sub formă

RO 127487 B1

solidă în etapa de contactare statică prelungită. De asemenea, poate conține dextrină 1
(CAS 9004-53-9), dextrans (9004-54-0), chitozan modificat chimic, sau orice alt polizaharid 3
gelifiabil biocompatibil (gellan, pullulan etc.), adăugate sub formă solidă sau pregelificată. În 3
urma amestecării celei de-a treia componente, se obține o compoziție păstoasă brută, 5
formulată ca și amestec fizic ternar. Tipul speciilor (bio)chimice și rapoartele de amestecare 5
în cadrul fiecărei componente, precum și în cadrul amestecului ternar final se stabilesc prin 7
algoritmi specifici experimentelor cu factori corelați. 7

Exemplul 1.2. Formularea amestecurilor de adjuvanți și excipienți

Se efectuează în paralel cu formularea amestecului ternar, în funcție de destinația 9
finală a vitrigelurilor și de necesarul de asigurare a stabilității în timp a componentelor 9
individuale ale amestecului ternar, precum și ale acestuia în ansamblul său. Între adjuvanți 11
se regăsesc: factori de creștere celulară, proteine serice, săruri organice, tensioactivi 13
biocompatibili nederaturanți, compuși încapsulați în lipozomi, antibiotice cu spectru larg, 13
active inclusiv împotriva micoplasmelor. Excipienții uzuali sunt: polietilen glicolii cu mase 15
moleculare medii și mici, gelatinele umflate în uree și diafiltrate peste membrane cu MWCO 15
30 kDa, glicerina, componenți anorganici și organici ai sistemelor tampon active în domeniul 17
neutru sau slab alcalin. Toate speciile (bio)chimice cu rol de adjuvanți și excipienți se 17
utilizează în forme farmaceutic pure și, eventual, sub formă de soluții sterilizate prin 19
ultrafiltrare. Contactarea și amestecarea adjuvanților și a excipienților se efectuează în ordine 19
logică și în condiții care să asigure menținerea eficacității lor. Mai întâi, excipienții se aduc 21
în soluție apoasă, iar aceasta se concentrează prin ultrafiltrare. Apoi, pe aceeași instalație 21
trecută în regim de diafiltrare, se realizează tamponarea soluției de excipienți, trecând prin 23
lichid un număr de 3...5 volume din soluția tampon sterilă, fără a modifica volumul supus 23
diafiltrării. Apoi, în soluția de excipienți tamponată, se adaugă, sub agitare eficientă, mai întâi 25
antibioticele și, în continuare, în ordine, tensioactivii, eventualele lipide și compuși 25
încapsulați, sărurile organice, proteinele serice și modulatorii ciclului de viață celular. 27
Amestecul final al adjuvanților și excipienților se degazează prin menținere sub vid moderat, 27
în condiții sterile, iar apoi se stochează în flacoane închise ermetic, la $5 \pm 2^\circ\text{C}$. 27

Exemplul 1.3. Realizarea blendurilor fluide

Constă în amestecarea, prin injectare concomitentă, la debite proporționale, a 29
amestecului ternar și a celui de adjuvanți și excipienți. Blendul fluid brut rezultat se răcește 31
la $5 \pm 2^\circ\text{C}$, iar apoi se extrude prin orificii inelare, în regim de recirculare la aceeași tem- 31
peratură. În continuare, blendul se supune vibrării mecanice sau ultrasonării, pentru elimi- 33
narea apei prin sinereză, urmată de ampastare prin malaxare sub eforturi mecanice mici sau 33
moderate, care să nu încălzească excesiv pasta. Cantitățile de lichid separate în cursul 35
vibrării/ultrasonării și malaxării se îndepărtează. Ciclul extrudare - vibrație/ultrasonare - 35
malaxare se repetă de circa 5...9 ori, până la perfectă omogenizare, și până când cantitatea 37
de apă eliminată prin sinereză scade semnificativ. La final, pasta rezultată se supune 37
centrifugării timp de 15...45 min, la 1500...4000 g, în regim termostatat la $5 \pm 2^\circ\text{C}$, 39
îndepărtând supernatantul lichid rezultat. Se obține astfel un blend fluid, cu caracteristicile 39
unui hidrogel, dar și ale unei paste vâscoase, omogenă, neaderentă la pereții vaselor în care 41
se află, care nu spumează și nu separă sub agitare. În toate volumele de lichid separate prin 41
sinereză sau prin centrifugare se dozează analitic speciile mic moleculare din clasa 43
adjuvanților (mai ales a modulatorilor ciclurilor celulare și a proteinelor serice), pentru 43
întocmirea bilanțurilor de reținere a acestora în blendul fluid. 45

RO 127487 B1

1 **Exemplul 2. Depunerea straturilor de blend pe suport**

3 În vederea vitrifierii, blendul fluid se depune prin raclare pe suporturi temporare sau
5 permanente, anterior pregătite pentru a dobândi un grad controlat de repelență în raport cu
7 compoziția fluidă, astfel încât vitrigelul să poată fi desprins de pe suport, după obținerea sa,
ori în cursul utilizării sale. Gradul de repelență al suportului se reglează prin nivelul de
hidrofobicitate al suprafeței sale, respectiv, prin balanța hidrofil-hidrofob a compoziției cu
care se tratează suportul.

9 **Exemplul 2.1. Pregătirea suporturilor temporare**

11 Suporturile temporare utilizate sunt de tipul casetelor tip vigneta, de formă dreptun-
ghiulară, deschise la unul dintre capetele scurte, și prevăzute cu un deversor înclinat la
13 capătul opus. Marginile casetei au o înălțime de 2...5 mm. De-a lungul laturilor lungi, la o
distanță de 5 mm de marginea casetei, spre interior, sunt prevăzute canale longitudinale cu
15 adâncimea de 0,5...1,0 mm, necesare în faza de secționare și desprindere a vitrigelului de
pe suportul temporar. Materialul din care este construită caseta poate fi polimetacrilatul de
17 metil, polipropilena sau teflonul. Dacă fața vitrigelului care s-a aflat în contact cu suportul
temporar trebuie să fie lucioasă, pe fundul casetei se depune o folie din Mylar. La interiorul
19 casetei se depun, prin pulverizare sau prin turnare, și se formează apoi prin uscare, filme din
polimeri, din tensioactivi cu mase moleculare mari sau din bloc-copolimeri, care, per
ansamblu, să asigure o ușoară predominanță a caracterului hidrofob al filmelor.

21 **2.1.A.** Filmele polimere se formează pornind de la soluții concentrate ale
polivinilpirolidonei (CAS 9003-39-8) din sorturile K60 (160 kDa, soluție 45% în apă) sau K90
(360 kDa, pulbere solubilă în alcool și în apă fierbinte), utilizate individual sau în amestec.
23 De preferință, sorturile K60 și K90 se utilizează în amestec 1:1...5:1 m/m, aduse în soluție
ce are 35...65% SU utilizând alcool etilic p.a. Soluția se depune în caseta suport prin turnare,
25 urmată de omogenizarea grosimii stratului prin vibrare mecanică (amplitudine 0,2...0,5 mm,
frecvența 50 Hz); în vederea formării filmului polimer, suportul se menține sub vid moderat
27 (300...600 mm coloană Hg), la temperatura de 35...55°C.

29 **2.1.B.** Filmele din tensioactivi se formează pornind de la amestecuri de Span și
Tween (tensioactivi neionogeni biocompatibili, derivați de la sorbitan), capabile să confere
soluției în care sunt aduse HLB-uri din plaja 2,0...6,5. Tensioactivii preferabil a fi utilizați sunt
31 Span 85 (sorbitan trioleat, CAS 26266-58-0, HLB 1,8), Span 80 (sorbitan monooleat, CAS
1338-43-8, HLB 4,3), Tween 20 (poli-oximetilen-20-monooleat, CAS 9005-64-5,
33 CCM 0,06 mM în apă, HLB 16,7), Tween 80 (poli-oximetilen-20-monooleat, CAS 9005-65-6,
CCM 0,012 mM în apă, HLB 15). În funcție de rapoartele de amestecare ale acestor
35 tensioactivi se pot obține valori precis calculabile ale HLB-ului amestecurilor. Amestecurile
preferabil a fi utilizate sunt cele care corespund rapoartelor masice procentuale de: 92%
37 Span 85 și 8% Span 80 (care conferă filmului un HLB de 2,0), 88% Span 80 și 12% Span
85 (pentru HLB 4,0) și 83% Span 80 și 17% Tween 80 (pentru HLB 6,0). Se evită
39 amestecurile în care tensioactivii cu HLB ridicat apar în proporții mai mari de 20...25%,
pentru a preîntâmpina migrarea acestora în blendul depus, ce urmează a fi supus vitrifierii.
41 Tensioactivii selectați se încălzesc individual la 45...75°C și apoi se amestecă în proporțiile
necesare, prin agitare lentă. Dacă amestecul tinde să devină prea vâscos la temperatura
43 ambiantă, neputând fi pulverizat, acesta se reîncălzește și i se adaugă apă deionizată sterilă,
încălzită la aceeași temperatură ca și amestecul, în proporție de 5...15% v/v. În cazuri
45 extreme, apa poate fi înlocuită cu o soluție de alcool etilic 75%, dozată în aceleași proporții.
Amestecul fluid se depune în caseta suport prin pulverizare repetată, intercalând perioade
47 de uscare sub vid moderat (300...600 mm coloană Hg), la temperatura de 35...55°C.

RO 127487 B1

2.1.C. Filmele din bloc-copolimeri cu proprietăți tensioactive, de tipul poloxamerilor, se formează pornind de la soluții ale acestora în alcool etilic 98%, cu concentrații la limita saturației (în preajma concentrației critice micelare, CCM). Soluțiile se prepară individual și se amestecă în proporțiile necesare pentru a asigura HLB-uri ale amestecului în plaja 2,0...8,0. După amestecare, soluțiile alcoolice se pot supune concentrării, prin evaporare controlată, până la viscozitățile necesare formării filmelor prin turnare. Poloxamerii preferabil a fi utilizați aparțin gamei Pluronic (CAS 9003-11-6), respectiv, Pluronic L121 (4,4 kDa; HLB 1; CCM 1 μM în apă), Pluronic L101 (3,8 kDa; HLB 1,1; CCM 2,1 μM în apă), Pluronic L61 (2 kDa; HLB 3; CCM 0,11 mM în apă), Pluronic L92 (3,65 kDa; HLB 6; CCM 0,088 mM în apă), Pluronic P84 (4,2 kDa; HLB 14; CCM 0,071 mM în apă), Pluronic F87 (7,7 kDa; HLB 24; CCM 0,091 mM în apă), Pluronic F68 (8,4 kDa; HLB 29; CCM 0,48 mM în apă). Exemple de amestecuri fezabile sunt cele care conțin 80% Pluronic L121 și 20% Pluronic L92 (pentru HLB 2,0), 91% Pluronic L61 și 9% Pluronic P84 (pentru HLB 4,0), 94,2% Pluronic L61 și 5,8% Pluronic F68 (pentru HLB 4,5). Sunt recomandabile acele amestecuri care sunt formate utilizând poloxamerii cu cea mai mare masă moleculară.

Depunerea filmelor din poloxameri în casete se efectuează în două etape. Mai întâi se depune prin pulverizare, într-un singur strat, soluția poloxamerului hidrofil (cu HLB mai mare). După zvântarea acestui prim strat în curent de aer, se depune, prin turnare în unul sau mai multe straturi, amestecul de poloxameri cu HLB-ul necesar interfațării cu blendul fluid formulat. La final se aplică o uscare sub vid moderat (300...600 mm coloană Hg), la temperatura de 35...55°C.

Exemplul 2.2. Pregătirea suporturilor permanente

Suporturile permanente, de tipul sitelor din fir de poliamidă sau de nylon, cu ochiuri având dimensiunea de 103 până la 381 μm, se supun mai întâi sterilizării prin expunere în atmosferă de oxid de etilenă, sau cel puțin dezinfecției prin spălare în soluție 1,5% Triton X 100, clătire până la eliminarea spumării, uscare și apoi imersare în alcool etilic 85%, timp de 12...18 h, urmată de uscare în curent de aer steril. După sterilizare, suportul permanent se întinde și se fixează pe o placă din teflon, sterilă și ea. Apoi, prin pulverizare, se depune un prim strat de soluție alcoolică saturată a unui poloxamer hidrofil, cum sunt cei de tipul Pluronic P84 (4,2 kDa; HLB 14; CCM 0,071 mM în apă), Pluronic F87 (7,7 kDa; HLB 24; CCM 0,091 mM în apă), Pluronic F68 (8,4 kDa; HLB 29; CCM 0,48 mM în apă). După zvântarea primului strat, se continuă depunând, prin turnare și raclare, o soluție alcoolică a unui amestec de poloxameri care vor asigura suprafeței suportului un HLB cuprins între 3 și 15, în funcție de gradul de aderență impus între compoziția vitrifiată și suport, respectiv, între vitrigelul final și suport. Drept componente hidrofobe ale amestecului se pot utiliza Pluronic L121 (4,4 kDa; HLB 1; CCM 1 μM în apă), Pluronic L101 (3,8 kDa; HLB 1,1; CCM 2,1 μM în apă), Pluronic L61 (2 kDa; HLB 3; CCM 0,11 mM în apă), Pluronic L92 (3,65 kDa; HLB 6; CCM 0,088 mM în apă). Suportul permanent astfel tratat se supune, la final, zvântării și uscării în curent de aer steril, cu temperatura de 25...45°C, suflat paralel cu suprafața suportului. Grosimea stratului de interfațare între suportul permanent și blendul fluid, rezultat în urma uscării soluției alcoolice cu HLB impus, trebuie să fie cea minim capabilă să învelească firele sitei, fără însă a obtura complet porozitatea acesteia.

Exemplul 2.3. Tratarea preliminară a suporturilor temporare și permanente

După uscarea compozițiilor de tratare a suporturilor, suprafața acestora din urmă, pe care se va depune blendul fluid, se supune unui tratament preliminar de reglare a gradului de hidratare și de sterilizare suplimentară. Pentru început, suporturile se introduc și se mențin 30...90 min într-o incintă sterilă, a cărei atmosferă este saturată cu vapori de apă, în care se depășește punctul de rouă, astfel încât pe suprafața lor să condenseze un film de apă.

RO 127487 B1

1 În continuare, pe suprafața suporturilor se preling, în ordine succesivă, următoarele soluții:
3 (i) soluția hidroalcoolică a unui agent antifungic, de exemplu, Amfotericina B (CAS 1397-
5 89-3), (ii) soluția hidroalcoolică a unui antibiotic de uz general, de exemplu, Gentamicina
7 (CAS 1403-66-3), (iii) soluția unui antibiotic înalt eficient, de exemplu, Cefotaxim (CAS
64485-93-4). Durata tratamentelor prin prelingere depinde de HLB-ul compozițiilor filmelor
de interfațare între suport și blendul fluid, fiind de 5...120 min. Soluțiile de antifungic și
antibiotice se pot recircula. La final, suporturile se supun zvântării în curent de aer steril.

Exemplul 2.4. Formarea straturilor de blend pe suport

9 Blendul fluid rezultat în urma formulării se depune pe suportul temporar sau
11 permanent, prin turnare și raclare. În cazul suporturilor temporare, casetele se umplu uniform
13 până la o înălțime stabilită experimental, în funcție de grosimea finală impusă vitrigelului. În
15 cazul suporturilor permanente, pe suprafața sitelor se plasează baghete delimitatoare, fixate
17 la capete de placa din teflon, care suplinesc marginile casetelor, în vederea depunerii
19 uniforme a straturilor de blend fluid. După depunerea blendului, casetele sau plăcile din
21 teflon se supun vibrării mecanice, la frecvența de 50 Hz, cu o amplitudine de 0,2...0,5 mm,
23 timp de 10...30 min, drenând eventualul lichid rezultat. Apoi stratul de blend se supune
degazării progresive, în condiții sterile, prin menținerea sub vid moderat, timp de 3...12 h,
începând cu o presiune reziduală de 300 mm coloană Hg, și încheind la 120...180 mm
coloană Hg. Pe durata perioadei de degazare se intercalează 2...6 perioade de revenire la
presiunea atmosferică, a câte 1...6 min fiecare, pentru a induce relaxarea mecanică a
eventualelor denivelări rezultate în cursul expunerii la vid. În mod opțional, la final, straturile
de blend se maturează static, la $5 \pm 2^\circ\text{C}$, timp de 12...18 h, într-o incintă cu atmosferă
condiționată, în care umiditatea relativă se reglează la 65%.

Exemplul 3. Vitrifierea directă a straturilor de blend

25 Se realizează în condiții sterile, în patru etape, primele două la umidități ridicate, a
27 treia sub vid, iar a patra utilizând un flux de aer cu umiditate relativă scăzută. Prima etapă
29 implică maturarea straturilor de blend fluid, timp de 24...48 h, în incinte cu umiditatea relativă
a aerului de $93 \pm 1\%$, asigurată prin prezența unei soluții saturate de KNO_3 . Cea de-a doua
31 etapă se conduce la umiditate relativă a aerului de $75 \pm 2\%$, asigurată prin prezența în
33 incinte a unei soluții saturate de NaOH, pe o durată de 48...96 h. Incintele se aduc și se
35 mențin sub vid moderat, respectiv, la o presiune reziduală de 200...350 mm coloană Hg. În
intervalul de timp al celei de-a doua etape se intercalează 6...12 perioade de revenire la
37 presiunea atmosferică, a câte 1...6 min fiecare. A treia etapă se derulează sub vid moderat,
la o presiune reziduală de 30...150 mm coloană Hg, corectată periodic, timp de 72...144 h,
39 la $15...23^\circ\text{C}$, în prezența unui desicant solid, fin măcinat. Drept desicant se preferă silicagelul
sau CaCl_2 , dar se poate utiliza și NaOH solid. Atunci când cantitatea de desicant necesară
41 în incintă este prea mare, acesta se schimbă periodic și, dacă este posibil, se supune uscării
în vederea refolosirii. În cea de-a patra etapă se utilizează, drept agent de uscare, aerul
43 steril, recirculat cu un debit de 0,3...0,9 L/min, peste site moleculare de tip 4A, pentru a fi
adus la o umiditate reziduală de 200...350 ppm. Durata celei de-a patra etape se stabilește
45 experimental, în funcție de caracteristicile blendului supus vitrifierii. Aceasta este de ordinul
zilelor și se poate segmenta, intercalând perioade de expunere la vid moderat. La finele
acestor din urmă perioade, probe din compoziția în curs de vitrifiere se pot supune
caracterizării fizico-chimice, pentru estimarea stării atinse.

Exemplul 4. Vitrifierea indirectă a straturilor de blend

47 Implică, mai întâi, transformarea straturilor de blend fluid, formulate conform
49 exemplului 1, în criogeluri, apoi rehidratarea controlată a acestora din urmă, continuată cu
presarea individuală sau în stivă a criogelurilor rehidratate, și încheiată cu vitrifierea
propriu-zisă. Toate operațiile enumerate se efectuează în condiții sterile. Se începe prin
maturarea blendului porționat și depus în tăvi din polipropilenă, timp de 12...18 h, la $2...10^\circ\text{C}$.

RO 127487 B1

Transformarea în criogel se realizează în două etape, mai întâi prin congelarea rapidă a straturilor de blend la $-20...-45^{\circ}\text{C}$, urmată de liofilizare la temperatura ambiantă, sub vid avansat, la o presiune reziduală de $0,01...0,03$ milibari. Dacă se vizează realizarea de stive din mai multe straturi de criogel, respectivele straturi se supun unei scămoșări superficiale, prin periere ușoară, pe ambele suprafețe plate. Rehidratarea controlată a criogelurilor extrase din tăvi se efectuează, la rândul său, în trei etape, pe o durată cumulată de $72...96$ h, în incinte condiționate din punctul de vedere al umidității relative și temperaturii. Respectivii parametri de lucru se reglează la următoarele valori: $12...18\%$ și $40...45^{\circ}\text{C}$ în prima etapă, $30...35\%$ și $22...28^{\circ}\text{C}$ în a doua etapă, $60...65\%$ și $15...18^{\circ}\text{C}$ în cea de-a treia etapă. Pentru criogelurile provenite din blenduri în care componentele au suferit reticulări covalente, se aplică o supraumidificare realizată prin menținerea lor, timp de $6...18$ h, în incinte cu umiditatea de $92...95\%$, asigurată în prezența unei soluții saturate de KNO_3 . În continuare, criogelurile se îmbibă cu soluții tampon HEPES, ce conțin compușii (bio)chimici adjuvanți citați în exemplul 1.2, sau orice alte specii active de interes biochimic, biomedical, farmaceutic sau dermato-cosmetic. Îmbibarea se realizează prin pulverizare fină deasupra criogelurilor rehidratate, în mai multe etape, intercalate cu perioade de zvântare în flux de aer steril. Straturile de criogel îmbibate se supun apoi, individual sau în stive, presării între două plăci din teflon sterilizate, sub sarcini de $3...12$ kgf/cm², timp de $16...36$ h, la $4...10^{\circ}\text{C}$, cu sau fără limitarea mecanică a grosimii, drenând continuu lichidul rezultat. La final, după îndepărtarea sarcinii mecanice, peliculele rezultate se maturează timp de $8...16$ h, la $5 \pm 2^{\circ}\text{C}$. În continuare, peliculelor li se aplică ultimele trei etape de vitrifiere, descrise în exemplul 3. Conform acestui exemplu, după vitrifiere, se obțin filme vitrificate libere de suport.

Exemplul 5. *Maturarea filmelor vitrificate*

Se realizează prin menținerea acestora timp de $10...30$ zile în condiții sterile, sub vid moderat, la o presiune reziduală de $200...350$ mm coloană Hg, la temperaturi de $2...10^{\circ}\text{C}$, în prezența unor geluri care emană mici cantități de vapori de alcool etilic.

Exemplul 6. *Rehidratarea controlată a filmelor vitrificate*

Se efectuează lent, în una sau două etape, în funcție de interesul de a introduce în vitrigelul în curs de formare diverse specii (bio)chimice, farmaceutice etc. În prima etapă, filmele vitrificate se mențin în incinte sterile, condiționate succesiv la trei niveluri din punctul de vedere al umidității relative și al temperaturii, pe durate cumulate de $24...96$ h. Cele trei perechi de valori ale parametrilor de condiționare sunt: (i) $25...40\%$ și $4...8^{\circ}\text{C}$, (ii) $50...65\%$ și $15...18^{\circ}\text{C}$, (iii) $80...95\%$ și $22...25^{\circ}\text{C}$. În cea de-a doua etapă, aplicabilă în special filmelor vitrificate obținute din blenduri în care se regăsesc componente reticulate, la suprafața filmelor se pulverizează soluții tampon HEPES în care s-au dozat compușii de interes biochimic, biomedical, farmaceutic sau cosmetic. La finalul rehidratării, vitrigelurile rezultate se supun unei maturări de $12...48$ h, la $5 \pm 2^{\circ}\text{C}$, în condiții sterile.

Exemplul 7. *Post-tratarea vitrigelurilor*

Se aplică vitrigelurilor cu suport temporar, formate în casete, celor cu suport permanent, plasate pe suprafața plăcilor de teflon, și celor libere de suport, toate montate în poziție oblică, sub unghiuri de $12...30^{\circ}$, în incinte sterile etanșe, la temperatura ambiantă, în prezența unei soluții saturate de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, care asigură o umiditate relativă de $33 \pm 1\%$. Constă în eluarea suprafețelor vitrigelurilor cu soluții de posttratare ce se preling peste un deversor plasat la partea superioară a planului înclinat. Cantitățile de soluții ce au străbătut suprafețele vitrigelurilor sunt colectate la baza planului înclinat, în vase ce conțin $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ sau CaCl_2 sub formă solidă. În compoziția soluțiilor de posttratare se includ specii chimice și/sau enzimatică capabile să „erodeze” superficial sau profund componentele lipsite de activitate biologică din alcătuirea vitrigelului, precum și specii farmaceutice.

RO 127487 B1

1 Drept exemplu, dextrina se poate „eroda” utilizând izo-amilaza (EC 3.2.1.68), care atacă
preponderent catenele polizaharidice ramificate, și doar limitat pe cele liniare, specifice
3 glicoz-amino-glicanilor. În soluțiile de posttratate se introduc și antibiotice active împotriva
micoplasmelor, cum este produsul Plasmocin (în cantitate de 1,0÷1,6 mL/L). După
5 încheierea eluării, vitrigelurile se maturează prin condiționare, în incinte sterile etanșe, la
două umidități relative descrescând, mai întâi la $33 \pm 1\%$, în prezența unei soluții saturate
7 de $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, iar apoi la $16 \pm 1\%$, în prezența unei soluții de 60% H_2SO_4 p.a., pe o
durată cumulată de 24...72 h.

9 **Exemplul 8. Maturarea finală a vitrigelurilor**

Se aplică tuturor celor trei tipuri de vitrigeluri, respectiv, desprinse de pe suportul
11 temporar, atașate suportului permanent și libere de suport. În cazul vitrigelurilor desprinse
de pe suportul temporar și al celor libere de suport, acestea se decupează mai întâi la
13 geometria și dimensiunile dorite, iar apoi se introduc, individual sau stivuite alternant, între
folii din Mylar sterilizate și tratate împotriva micoplasmelor. Ansamblul se presează apoi ușor
15 între plăci din teflon sterile, și se menține 6...18 h într-o incintă cu recirculare forțată a
aerului, la o umiditate relativă de 30% și la o temperatură de $5 \pm 1^\circ\text{C}$. În cazul vitrigelurilor
17 atașate suportului permanent, acestea se decupează mai întâi la geometria și dimensiunile
dorite, iar apoi, pe conturul marginilor, la o distanță de 2...5 mm spre interior, se practică
19 incizii ale filmului, fără a afecta însă suportul purtător. Apoi piesele decupate se plasează pe
plăci din teflon sterile, curbate cu o săgeată egală cu a cincea parte din cea mai mare
21 dimensiune a pieselor, acoperindu-se cu folii din Mylar sterilizate și tratate împotriva
micoplasmelor, și presându-se ușor pe conturul curbat. Maturarea finală se efectuează în
23 aceleași condiții ca și în cazul vitrigelurilor desprinse de pe suportul permanent, sau libere
de suport. La final, marginile secționate ale vitrigelurilor se îndepărtează mecanic.

25 **Exemplul 9. Ambalarea și stocarea vitrigelurilor**

Piesele din vitrigel rezultate după maturarea finală se includ între folii sau în plicuri
27 din Mylar, sterilizate și tratate împotriva micoplasmelor, apoi se închid ermetic sub vid, în
pungi din polietilenă sterilizate prin iradiere. Loturi de câte 10...100 de astfel de pungi se
29 introduc și se închid ermetic în casete din polietilenă sterilizate, în care se adaugă mici
cantități din soluții ale unor agenți antifungici și antibacterieni. În această stare, vitrigelurile
31 se pot păstra 9...18 luni, la frigider, fără a-și pierde caracteristicile dobândite. Pentru
extinderea duratei de stocare la 27...54 luni, casetele din polietilenă ce conțin filmele de
33 vitrigel se pot supune congelării rapide la -80°C . După decongelarea în două etape, mai întâi
până la -20°C și apoi până la 4°C , caracteristicile vitrigelurilor astfel stocate se înrăutățesc,
35 ele putând fi utilizate doar drept vectori farmaceutici sau cosmetici, dar nu în aplicații ale
ingineriei tisulare.

RO 127487 B1

Revendicări

1. Compoziții vitrigelifiabile, destinate obținerii de vitrigeluri cu aplicații biomedicale și farmaco-cosmetice, **caracterizate prin aceea că** sunt amestecuri fizico-chimice alcătuite din trei componente unitare sau reprezentând, la rândul lor, amestecuri de specii (bio)chimice similare, constituite din:
- componenta biologic activă sclerooroteică, o componentă biologic activă polizaharidică și o componentă lipsită de activitate biologică, de natură polipeptidică sau polizaharidică;
 - componenta scleroproteică a amestecurilor, individual sau în asociere cu componenta polizaharidică biologic activă, se regăsește sub formă structurată microfibrilar, tactoidal, sau ca domenii lax reticulate;
 - componentele polipeptidice și polizaharidice lipsite de activitate biologică ale amestecurilor au rol de adjuvanți, excipienți, agenți de șarjare, agenți porogeni erodabili, având un raport de amestecare cuprins în intervalul 3:1:1...5:3:1, cu rol de generare a fazei solide.
2. Compoziții conform revendicării 1, **caracterizate prin aceea că**, drept componentă scleroproteică, se utilizează atelocolagenul fibrilar hipoimunogen.
3. Compoziții conform revendicării 1, **caracterizate prin aceea că**, drept componentă polizaharidică, biologic activă, se utilizează glicoz-amino-glicani, glicoproteine sau polizaharide funcționalizate.
4. Compoziții conform revendicării 1, **caracterizate prin aceea că**, drept componente proteice și polizaharidice lipsite de activitate biologică, se utilizează gelatine, hidrolizate proteice și polizaharide uzuale, de proveniență vegetală, animală sau bacteriană, eventual modificate chimic.
5. Procedeu pentru obținerea vitrigelurilor cu aplicații biomedicale și farmaco-cosmetice, **caracterizat prin aceea că**, pornind de la compoziția definită în revendicarea 1, se obțin vitrigeluri libere sau atașate la un suport temporar, prin parcurgerea următoarelor etape: (i) gelifierea componentelor generatoare ale fazei solide, (ii) vitrifierea compoziției gelifiate, (iii) rehidratarea controlată a straturilor vitrificate, și (iv) maturarea și stocarea în condiții sterile.
6. Procedeu conform revendicării 5, **caracterizat prin aceea că** subetapele etapei de gelifiere sunt următoarele: (i) structurarea componentei scleroproteice sub formă microfibrilară, tactoidală sau ca domenii reticulate lax, (ii) amestecarea fizică și cogelifierea componentelor biologic active, (iii) amestecarea fizică și ampastarea componentelor biologic active cogelifiate cu componentele proteice și polizaharidice lipsite de activitate biologică, (iv) adăugarea amestecurilor formulate, ce conțin speciile de interes biochimic, biomedical, farmaceutic, dermato-cosmetic, (v) omogenizarea finală a amestecului fizic, soldată cu obținerea unui blend fluid, cu caracteristicile unui hidrogel păstos.
7. Procedeu conform revendicării 5, **caracterizat prin aceea că** subetapele etapei de vitrifiere sunt următoarele: (i) pregătirea fizico-chimică a suporturilor temporare sau permanente, (ii) tratarea chimică preliminară a suporturilor temporare sau permanente, (iii) depunerea și formarea straturilor de blend fluid, rezultat conform revendicării 6, (iv) vitrifierea directă sau indirectă a straturilor de blend fluid, cu obținerea de filme vitrificate rigide, (v) maturarea și (vi) post-tratarea filmelor vitrificate.
8. Procedeu conform revendicării 5, **caracterizat prin aceea că** subetapele etapei de rehidratare sunt următoarele: (i) rehidratarea controlată a filmelor vitrificate, în atmosferă condiționată și opțional prin pulverizare, soldată cu obținerea de vitrigeluri, (ii) post-tratarea fizico-chimică a vitrigelurilor, (iii) maturarea finală a vitrigelurilor.

RO 127487 B1

1 9. Procedeu conform revendicărilor 5 și 6, **caracterizat prin aceea că**, în vederea
microfibrilării, soluțiile de atelocolagen se aduc la pH de 3,5, se ultrasonează, se
3 termostatează la $8 \pm 2^\circ C$, apoi li se adaugă soluție 330 g/l NaCl până la concentrația de
1,3 moli/l, concomitent cu creșterea temperaturii cu $0,2 \pm 0,5^\circ C/min$, până la $28 \pm 2^\circ C$, iar la
5 final se maturează timp de 6...12 h, sub agitare lentă și termostatare la $25 \pm 1^\circ C$; suspensia
microfibrilată rezultată se ultrasonează la o intensitate acustică de 0,4...0,8 W/cm², pe baie
7 de apă, la $8 \pm 2^\circ C$, apoi se centrifughează la 4000...9000 g, timp de 20...40 min, la $4 \pm 2^\circ C$,
reținând sedimentul păstos.

9 10. Procedeu conform revendicărilor 5 și 6, **caracterizat prin aceea că**, în vederea
agregării tactoidale, soluția de atelocolagen se aduce la $4^\circ C$, apoi i se adaugă o soluție de
11 0,1 M Na₂HPO₄ și 0,5 M Na₂SO₄, până la stabilizarea pH -ului, iar precipitatul se separă
centrifugal și se resuspendă în soluție de NH₄OH, menținând pH -ul la 9,2: în soluția coloidală
13 rezultată se adaugă 0,18...0,22 g CaCl₂ per 100 ml, sub formă solidă, iar suspensia rezultată
se maturează 6...18 h la $4^\circ C$, după care se diluează 1:3 cu soluție de NH₄OH la pH de 9,2,
15 se decantează, iar sedimentul floconos se separă centrifugal la 1000...3000 g, timp de
10...40 min, la $8 \pm 2^\circ C$; sedimentul se resuspendă de trei ori în 1000% v/m soluție de NH₄OH
17 cu pH -ul de 9,2, apoi în apă deionizată sterilă, soluția aducându-se la pH de 6,8; după
termostatarea la $4^\circ C$, se adaugă o soluție de transglutaminază anterior preparată în tampon
19 HEPES la pH de 6,8, în cantitate echivalentă cu 200...400 unități enzimatică per gramul de
atelocolagen, iar apoi amestecul se încălzește cu $0,5^\circ C/min$ până la $20 \pm 0,5^\circ C$; după
21 30...45 min, gelul lax obținut se răcește la $5 \pm 1^\circ C$, se ultrasonează pe baie de apă rece, i
se adaugă 2,5 și, respectiv, 0,12 mM Na₄ EDTA și iodacetamidă, apoi se ultrasonează până
23 la fluidificare; suspensia rezultată se maturează 4...12 h, la $4^\circ C$, se diluează de cinci ori cu
o soluție sterilă ce conține 136 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 0,42 mM NaH₂PO₄, 12 mM NaHCO₃,
25 5,5 mM glucoză, 10 mM Triton X 100, 25 mM 1,2-etandiol, 5% glicerină pură, 0,75 g/L
doxiciclină hclat, 5 mM HEPES, iar lichidul rezultat se separă centrifugal, 30...60 min, la
27 1500...3000 g; sedimentul rezultat se resuspendă de 3...5 ori în aceeași soluție sterilă, și se
separă centrifugal; la final se reține sedimentul.

29 11. Procedeu conform revendicărilor 5 și 6, **caracterizat prin aceea că**, în vederea
reticulării laxe, soluția de atelocolagen se liofilizează, iar liofilizatului se solvă în soluție
31 0,064 M NaHCO₃ și 0,036 M Na₂CO₃ cu pH de $10 \pm 0,3$; soluția rezultată se ultrasonează,
se filtrează, se aduce la $10 \pm 2^\circ C$, apoi i se adaugă 3...8% v/v agent de reticulare
33 bifuncțional, și se încălzește la 20...25°C; hidrogelul lax obținut se răcește la $5 \pm 2^\circ C$, iar apoi
se centrifughează timp de 30...60 min, la 1500...3000 g, reținând sedimentul; acesta se
35 supune apoi sinerezei prin vibrație mecanică la frecvența de 50 Hz și cu amplitudinea de
0,3...1,2 mm, în vederea concentrării suplimentare.

37 12. Procedeu conform revendicărilor 5 și 6, **caracterizat prin aceea că** formele
pregelificate obținute în conformitate cu revendicările 9, 10, sau 11 se amestecă fizic cu
39 componenta polizaharidică biologic activă, aceasta din urmă sub formă solidă sau pre-
gelificată, iar amestecurile rezultate se concentrează prin sinereză sub efectul vibrațiilor
41 mecanice ori al ultrasunetelor, apoi se supun omogenizării avansate prin malaxare, calan-
drare sau extrudare, se maturează și în continuare se ampastează, pe rând, cu adjuvanții
43 (bio)chimici, cu speciile de interes biochimic, biomedical, farmaceutic, dermato-cosmetic, cu
excipienții și cu agenții de șarjare și progenerii erodabili, iar în continuare compoziția rezultată
45 se omogenizează avansat prin cicluri repetate de extrudare, vibrație/ultrasonare și malaxare,
la final supunându-se separării centrifugale, pentru obținerea unui blend cu caracteristicile
47 unui gel onctuos.

RO 127487 B1

13. Procedeu conform revendicărilor 5 și 7, **caracterizat prin aceea că** suporturile pe care urmează a se vitrifia gelul onctuos obținut în conformitate cu revendicarea 12 se pregătesc prin acoperire cu un film polimer, generat prin uscarea controlată a unor: (i) soluții alcoolice, depuse prin pulverizare sau turnare, ce conțin 35...65% SU un amestec de polimeri hidrofilii și hidrofobi, cei hidrofilii putând fi polivinilpirolidona, polietilenoxidul sau hidroxipropilmetilceluloza, iar cei hidrofobi - acetatul de polivinil, polivinil-stearatul sau polivinil-cinamatul; (ii) amestecuri de Span și Tween capabile să confere soluției în care sunt aduse HLB-uri din plaja 2,0...6,5; (iii) amestecuri de poloxameri din gama Pluronic, în proporțiile necesare pentru a asigura HLB-uri ale amestecului în plaja 2,0...8,0; la final amestecurile depuse pe suporturi se usucă sub vid moderat (300...600 mm coloană Hg), la temperaturi de 35...55°C. 1
14. Procedeu conform revendicărilor 5 și 7, **caracterizat prin aceea că** suporturile pregătite conform revendicării 13 se supun unui tratament combinat de spălare, hidrofilizare superficială și sterilizare, efectuat prin prelingerea succesivă, timp de 5...120 min, a unor soluții hidroalcoolice de antifungici, antibiotice de uz general și antibiotice energice; la final, suporturile se supun zvântării în curent de aer steril. 3 5 7 9 11 13 15
15. Procedeu conform revendicărilor 5 și 7, **caracterizat prin aceea că** gelul onctuos, obținut în conformitate cu revendicarea 12, se depune pe suporturile temporare sau permanente prin turnare și raclare, iar apoi straturile rezultate se supun succesiv deshidratării prin sinereză sub vibrație mecanică, degazării progresive sub vid moderat, timp de 3...12 h, vitrifierii prin deshidratare lentă, în prezența unor desicantți, apoi sub vid și în continuare în curent de aer cald steril, uscat prin recirculare peste site moleculare de tip 4A, iar la final filmele vitrificate se supun maturării timp de 10...30 zile, sub vid (la o presiune reziduală de 200...350 mm coloană Hg și la temperaturi de 2...10°C), în prezența unor geluri care emană mici cantități de alcool etilic. 17 19 21 23
16. Procedeu conform revendicărilor 5 și 7, **caracterizat prin aceea că** gelul onctuos obținut în conformitate cu revendicarea 12 se depune în casete din polipropilenă, apoi se congelează și se liofilizează, după care se condiționează lent la trei umidități crescânde, respectiv: (i) 25...40% și 4...8°C, (ii) 50...65% și 15...18°C, (iii) 80...95% și 22...25°C, apoi straturile microporoase obținute se rehidratează individual sau în stive, se îmbibă opțional cu soluții ale unor specii (bio)chimice, farmaceutice sau cosmetice în tampon HEPES, se supun apoi presării, cu sau fără limitarea mecanică a grosimii, se maturează timp de 12...48 h la 5...2°C, în condiții sterile, iar în continuare se supun vitrifierii prin deshidratare lentă și se maturează, în conformitate cu prescripțiile din revendicarea 15. 25 27 29 31 33
17. Procedeu conform revendicărilor 5, 7 și 8, **caracterizat prin aceea că**, în vederea posttratării și rehidratării controlate, filmele vitrificate obținute în conformitate cu revendicarea 15 sau 16 se supun rehidratării controlate, opțional în două etape, prima prin condiționare în incinte cu umiditatea relativă de $33 \pm 1\%$ și temperatura de $5 \pm 2^\circ\text{C}$, în condiții sterile, iar a doua prin pulverizare cu soluții tampon HEPES având pH-uri în plaja fiziologică, în care s-au dizolvat specii de interes biochimic, biomedical, farmaceutic sau dermato-cosmetic, după care vitrigelurilor astfel obținute li se aplică tratamente superficiale de dizolvare selectivă, de erodare electivă și de sterilizare, realizate prin prelingerea unor soluții ce conțin specii chimice mic-moleculare, enzime și/sau antibiotice, operații efectuate în atmosferă cu umiditate de $33 \pm 1\%$, iar la final vitrigelurile postprocesate se maturează prin condiționarea în două etape, la umidități descrescătoare, de $30 \pm 1\%$ și apoi de $16 \pm 1\%$, pe o durată cumulată de 24...72 h, în curent de aer steril, recirculat cu un debit de 0,3...0,9 L/min. 35 37 39 41 43 45

1 18. Procedeu conform revendicării 5, **caracterizat prin aceea că**, în vederea stocării,
vitrigelurile rehidratate și postprocesate în conformitate cu revendicarea 17 se desprind, dacă
3 este cazul, de pe suportul temporar, se plasează, individual sau alternant, între folii din Mylar
sterilizate și tratate împotriva micoplasmelor, după care se presează și se supun unei
5 maturări finale, sub ușoară presare, la o umiditate relativă coborâtă (9...16%) și la rece
($5 \pm 1^\circ\text{C}$), apoi, dacă este cazul, se ajustează dimensional și se individualizează pe suportul
7 permanent, după care se plasează între folii sau în plicuri din Mylar sterilizat și tratat
împotriva micoplasmelor, închizându-se apoi sub vid, în pungi sterilizate, din materiale
9 polimere, care, la rândul lor, se introduc și se închid ermetic în casete sterile, din materiale
polimere, în prezența unor cantități de soluții ce conțin antifungici și antibiotice de uz general,
11 formă sub care vitrigelurile se pot stoca, fără alterarea caracteristicilor, la frigider, timp de
9...18 luni, durată după care casetele pot fi congelate, în vederea prelungirii duratei de
13 stocare, caz în care din rândul aplicațiilor vitrigelurilor îndelung stocate se elimină cele din
ingineria tisulară.

