



(12) **CERERE DE BREVET DE INVENȚIE**

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

(22) Data de depozit: **29.11.2010**

(41) Data publicării cererii:
29.06.2012 BOPI nr. **6/2012**

(71) Solicitant:
• **UNIVERSITATEA TEHNICĂ "GHEORGHE
ASACHI" DIN IAȘI,**
*BD. PROF. D. MANGERON NR. 67, IAȘI, IS,
RO*

(72) Inventatori:
• **MAIER STELIAN SERGIU,**
*STR.FĂNTĂNILOR NR.37, BL.B2, ET.7,
AP.69, IAȘI, IS, RO;*

• **MAIER VASILICA,** *STR.FĂNTĂNILOR
NR. 37, BL.B2, 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,** *STR. N. IORGA NR. 59B
BL. R1 SC. A ET. 6 AP. 25, IAȘI, IS, RO;*
• **LEFTER CRISTINA MIHAELA,**
*STR. LIBERTĂȚII, BL. 323, SC. D, AP. 1,
VASLUI, VS, RO*

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

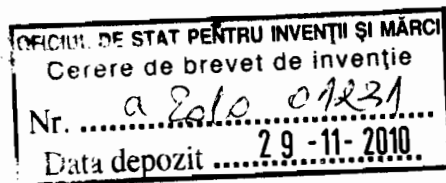
(57) Rezumat:

Prezenta invenție se referă la o compoziție vitrigelifiabilă și la un procedeu de obținere a unor vitrigeluri cu aplicații biomedicale. Compoziția cuprinde amestecuri fizice de aterocolagen și polizaharide bioactive, și specii polipeptidice și polizaharidice lipsite de activitate biologică, dar cu rol de adjuvanți, excipienți, agenți de șarjare și agenți porogeni erodabili. Procedeu de obținere a vitrigelurilor cuprinde trei etape, respectiv: geli-

fierea, vitrifierea și rehidratarea controlată, care se derulează în condiții sterile și nedeurante pentru componentele proteice, rezultând vitrigeluri libere de substrat sau aderente la un suport, a căror suprafață este apoi postprocesată prin erodare chimică sau enzimatică, și este sterilizată.

Revendicări: 21

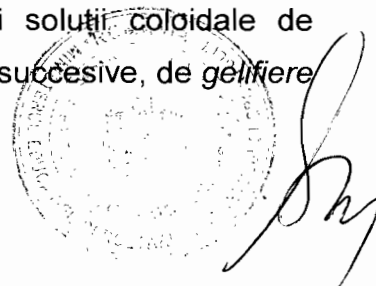




Compoziții vitrigelifiabile și procedeu pentru obținerea vitrigelurilor cu aplicații biomedicale

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

Termenul de vitrigel a fost introdus pentru a defini substraturile proteice planare, cu caracteristici similare gelurilor semirigide și cu rezistențe fizico-mecanice suficiente pentru a permite manipularea lor în tehnicile de cultură celulară bidimensională pe ambele suprafețe exterioare (Takezawa T., Ozaki K., Nitani A., Takabayashi C., Shimo-Oka T., *Cell Transplantation*, vol. 13, 2004, p. 463-473). Metodologia generică de obținere a vitrigelurilor colagenice implică transformarea unei soluții coloidale de collagen nativ într-un film semirigid hidratat, parcurgând trei etape succesive, de gelifiere

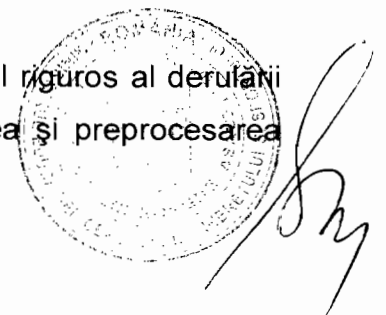


prin microfibrilare, de *vitriifiere* prin deshidratare controlată și respectiv de *rehidratare limitată* în soluții apoase cu compoziții similare fluidelor organismului uman, sau în soluții coloidale aglomerate macromoleculare, cu compoziții similare fazei fluide din matricea extracelulară a țesuturilor conjunctive (Wang P.-C., Takezawa T., *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 99 (6), 2005, p. 529-540).

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

Formele colagenice clasice utilizate pentru obținerea vitrigelurilor cu aplicații biomedicale sunt soluțiile coloidale de colagen fibrilar tip I (denumite generic soluri colagenice), obținute prin solubilizare nedenaturantă, în soluții saline sau acide. Respectiv solurile 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 interacții 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 care reduce mult aplicabilitatea la scară semi-industrială a tehnicilor de obținere a vitrigelurilor.

Problema pe care o rezolvă invenția este legată de controlul riguros al derulării etapei de vitriifiere, asigurat pe două căi, respectiv prin formularea și preprocesarea



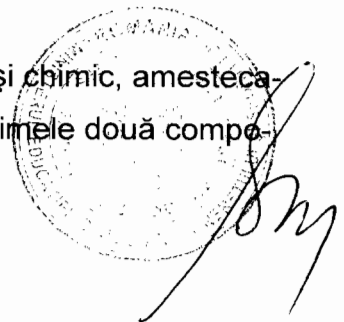
fizico-chimică și fizico-mecanică a compozițiilor și structurilor supuse deshidratării și prin reglarea corelată a parametrilor agentului de uscare, fapt care evită deficiențele tehnicilor de vitrifiere raportate până în acest moment. Compozițiile formulate includ atelocolagen hipoimunogen de înaltă puritate, o formă colagenică mai ieftină și accesibilă în cantități mult mai ridicate, ceea ce 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 biochimice, farmaceutice și chimice, utile în construirea microfibrilară și în inducerea unor efecte biomedicale și cosmetice nuanțate, mult extinse comparativ cu cele asigurate de către vitrigelurile clasic obținute. De asemenea, invenția soluționează problema suplimentar indusă prin formulare, aceea a eliminării sau inactivării speciilor chimice cu rol de adjuvant al 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 subetape de postprocesare specifice, incluse în etapa de rehidratare controlată.

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

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

- o componentă biologică activă scleroproteică, respectiv atelocolagenul hipoimunogen sau alte forme colagenice native sau cvasi-native, unimerice, aduse în soluție coloidală stabilă;
- o componentă biologică activă polizaharidică, din clasa glicoz-amino-glicanilor și / sau a glicoproteinelor, capabilă de asociere și de structurare cu componenta proteică și aptă a reține, în vitrigelul final, cantități controlabile de apă și electroliți mic moleculari anorganici și / sau organici;
- o componentă lipsită de activitate biologică în aplicațiile finale ale vitrigelurilor, cu rol de excipient, de agent de șarjare, sau de porogen macromolecular solubil, 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 chimice polipeptidice și / sau polizaharidice uzuale;

componente capabile a interacționa doar fizic între ele, nu și chimic, amestecate în proporții variabile, respectând regula sumei unitare; primele două compo-

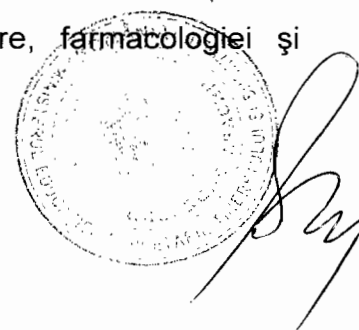


nente pot fi supuse structurării sau costructurării supramoleculare, individual sau în amestec binar, înaintea includerii în amestecul ternar;

(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, plastifiantilor 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, 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, capitolele 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, capitolul 13). Oportunitatea încorporării în amestecuri a speciilor chimice mic moleculare, precum și natura acestora, se decid funcție de caracteristicile funcționale impuse vitrigelului vizat, pe baza principiilor ingineriei tisulare, farmacologiei și cosmetologiei, după caz.



O variantă particulară de formulare a amestecurilor implică utilizarea agenților reticulanți biocompatibili, pentru pregelifierea componentei (atelo)colagenice și / sau pentru structurarea acesteia cu componenta polizaharidică biologic activă. În acest sens, drept reticulanți se pot utiliza fie agenți ce induc punți covalente de lungime zero, care implică doar grupările funcționale ale componentelor citate, fie specii ce generează punți cu lungime diferită de zero, care interpun tronsoane catenare între grupările funcționale interconectate. Condițiile impuse reticulanților 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 reticulanți 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 de conjugare a proteinelor cu diverse specii de interes biochimic (Wong S. S., *Chemistry of Protein Conjugation and Cross Linking*, CRC Press Inc., 1993, capitolele 3, 4, 5, 6), ori cu polimeri de sinteză (Niemeyer C. M., *Bioconjugation Protocols. Strategies and Methods*, Methods in Molecular Biology vol. 283, Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, 2004, capitolul 4). Componenta colagenică pregelifiată, rezultată în urma proceselor de reticulare, o poate înlocui pe cea microfibrilată, atunci când integritatea domeniilor triplu helicale nu este esențială în aplicațiile vitrigelurilor. În aceste cazuri, colagenul sau atelocolagenul poate fi înlocuit, total sau parțial, cu gelatine înalt moleculare, de preferință obținute prin tratament acid, pentru a avea un pH izoelectric minimal deplasat către plaja acidă.

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

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



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

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

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

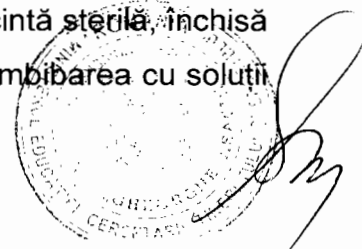
(v) – vitrifierea stratului de blend fluid, prin eliminarea progresivă a apei din volumul său pe calea vaporizării lente, sub acțiunea unui agent fizic de uscare; deshidratarea se realizează în patru etape ce diferă între ele funcție de parametrii agentului de uscare; într-o primă etapă stratul de blend 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



28

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 ± 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 (Izmeritel'naya Tekhnika)*, 6, 1974, p. 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 $92 \div 95$ % 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);

(vi) – maturarea filmului vitrifiat, prin menținere timp de mai multe zile în incintă sterilă, sub vid moderat, la temperatura ambientă sau la frigider, în prezența unor pastile de „spirt solid” sau a unei compoziții gelifiate conținând alcool etilic, preparată conform exemplului 1 din brevetul US 2,613,142 / 1948, sau exemplului 4 din brevetul US 4,971,597 / 1990;

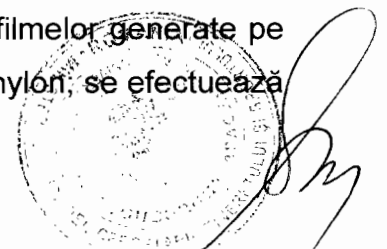
(vii) – rehidratarea controlată a stratului sau stivei vitrificate, prin redobândirea lentă a umidității în atmosferă controlată, urmată de îmbibarea și / sau umflarea limitată cu soluții apoase ale unor specii chimice mic-moleculare de interes biochimic, farmacologic sau cosmetic; se efectuează în două etape, conduse astfel încât stratul sau stiva vitrifiată să redobândească lent și progresiv apa de hidratare, apa capilară și apa de imbibiție necesare atingerii caracteristicilor de vitrigel; prima etapă se derulează în incinte climatizate, cu recircularea internă a aerului, în condiții sterile, la trei trepte de umiditate relativă crescătoare a aerului și la temperaturile cele mai joase care reușesc să evite atingerea punctului de rouă (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: Psychrometry, Evaporative Cooling, and Solids Drying, McGraw-Hill Co. Inc., New York, 2008; Wagner W., Kretzschmar H. J., *International Steam Tables. Properties of 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 picurarea simultană în mai multe puncte a unei soluții apoase ce conține compușii mic-moleculari necesari a fi introduși în vitrigel, funcție de gama de aplicații vizate; dacă 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 compuşii mic-moleculari, controlând gradul de umflare prin măsurarea creşterii grosimii;

(viii) – posttratarea filmelor de vitrigel în scopul conferirii unor caracteristici morfo-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 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 formulat; eluarea se realizează prin prelingerea soluțiilor de posttratare pe suprafețele vitrigelului plasat pe un suport plan, înclinat, prevăzut la partea superioară cu un deversor 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 $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, care asigură o umiditate relativă de $33 \pm 1 \%$; excesul de soluție de posttratare „uzată” se colectează la baza planului înclinat, într-un recipient în care s-a introdus $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ sau $CaCl_2$ sub formă solidă; durata eluării se stabilește funcție de natura și de cinetica proceselor de atac (bio)chimic și de erodare avute în vedere la posttratare, precum și de porfuzimea 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 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 saturarea cu vapori a atmosferei din incintă; posttratarea se poate efectua și în scopul contactării prelungite a filmului de vitrigel cu soluții apoase ale unor antibiotice și antifungice, inclusiv cu compoziții active împotriva micoplasmelor libere sau intracelulare, de tipul Plasmocin (produs de InvivoGen); un astfel de tratament poate, de asemenea, încheia etapa de posttratare;

(ix) – maturarea vitrigelului obținut, în două etape, la două umidități relative descrescânde ale aerului, în vederea formării unei cruste ușor deshidratate la nivelul suprafețelor libere; prima etapă implică menținerea în incintă sterilă, la temperatura ambiantă, în prezența unei soluții saturate de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, care asigură o umiditate relativă de $33 \pm 1 \%$; a doua etapă se derulează la aceiași parametri, dar în prezența unei soluții de 60% H_2SO_4 analitic pur, care asigură o umiditate relativă de $16 \pm 1 \%$; 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 lor 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 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 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.

Procedeele 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 morfo-structurale și de reactivitate fizico-chimică ale vitrigelurilor adaptate aplicațiilor din ingineria tisulară, 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;

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

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

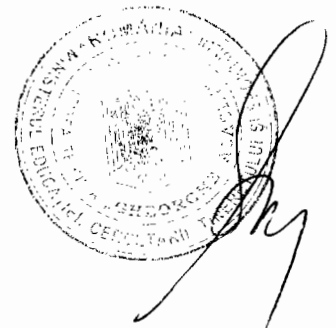
- generează filme vitrigelifiate cu grosimi controlabile în plaja zecilor sau sutelor de microni, unitare sau cu caracteristicile unor compozite laminare stratificate;

- 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 celulare, a speciilor farmaceutice ori a vectorilor cosmetologici;

- generează filme vitrigelifiate cu porozitate superficială și de profunzime indusă pe 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 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 compozit stratificat, prin aplicarea de procese fizico-chimice de reticulare controlată pe cale hidro-termică, termică, chimică ori fotochimică.

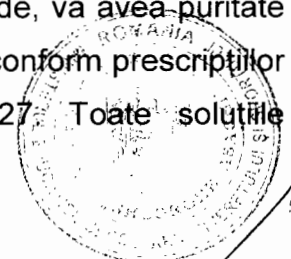


În continuare se prezintă exemple de formulare a compozițiilor vitrigelifiabile și de aplicare a procedului de vitrigelifiere a acestora, conform invenției. Descrierile ce urmează au titlu exemplificativ din următoarele puncte de vedere:

- 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 mic-moleculari 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;
- echipamentele, instalațiile și dispozitivele utilizate pentru procesarea compozițiilor vitrigelifiabile și pentru formarea straturilor de vitrigel, în oricare dintre etapele de obținere a vitrigelurilor;
- 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;
- natura speciilor chimice adjuvante și a suporturilor implicate în formularea compozițiilor vitrigelifiabile și în obținerea vitrigelurilor;
- modul de pregătire în vederea stocării și modul de stocare a vitrigelurilor obținute conform invenției;
- denumirile atribuite etapelor, operațiilor și proceselor descrise în invenție.

Exemplul 1. Formularea compozițiilor vitrigelifiabile

Face parte integrantă din procedeu de obținere a vitrigelurilor, reprezentând prima etapă a acestuia, ce se încheie cu obținerea blendului fluid. Toate operațiile pe care le 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 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 de pirogeni, preparată și testată conform prescripțiilor Farmacopeei Europene, ediția a 7-a, monografia 01/2009:1927. Toate soluțiile



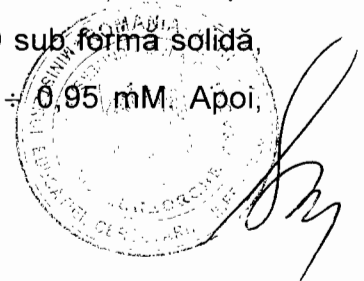
compușilor mic moleculari se supun, imediat după preparare, filtrării prin membrane cu porozitatea echivalentă de $0,22 \mu\text{m}$, în vederea sterilizării.

Exemplul 1.1. Formularea amestecurilor fizice ternare

Se pornește de la soluții de atelocolagen hipoimunogen de înaltă puritate, de tip I, 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 tactoidale, ori hidrogeluri reticulate lax, pe cale chimică, în toate cele trei cazuri obținându-se sisteme polidisperse la limita gelifierii.

1.1.A. Dacă soluțiile de atelocolagen se supun microfibrilării, acestea se aduc mai întâi la $\text{pH } 3,5 \pm 0,1$, se supun ultrasonării timp de 10 minute, în baie de ultrasonare cu frecvența de 42 kHz, la o intensitate acustică de $0,4 \div 0,8 \text{ W/cm}^2$, se termostatează la $8 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, iar apoi, sub agitare energetică, li se adaugă lent soluție saturată de NaCl în cantitatea 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 $0,2 \div 0,5 \text{ }^\circ\text{C/min}$, până la valoarea de $28 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$. Dozarea soluției saturate de NaCl și încălzirea soluției de atelocolagen se corelează, astfel încât ultima treime a volumului soluției de sare să se adauge după ce temperatura a atins valoarea finală. În continuare, în vederea maturării agregatelor supramoleculare, suspensia formată se aduce și se menține la $25 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ timp de $6 \div 12$ ore, sub agitare lentă. La final, suspensia se ultrasonează de trei ori câte 15 minute, pe baie de ultrasonare răcită cu gheață, la frecvența de 42 kHz și la o intensitate acustică de $0,4 \div 0,8 \text{ W/cm}^2$, intercalând câte 45 minute ședere statică. În vederea separării fracției solide, suspensia se împarte în flacoane cu volumul de 250 mL și se supune centrifugării la $4.000 \div 9.000 \text{ g}$, timp de $20 \div 40$ minute, la final reținându-se sedimentul.

1.1.B. Dacă se întrevede agregarea supramoleculară a atelocolagenului sub formă de tactoizi, soluțiile se termostatează la $4 \text{ }^\circ\text{C}$, după care li se adaugă lent, sub agitare eficientă, o soluție ce conține $0,1 \text{ M Na}_2\text{HPO}_4$ și $0,5 \text{ M Na}_2\text{SO}_4$, până când nu se mai înregistrează 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 într-o soluție de NH_4OH cu pH-ul inițial de 9,2, corectând în permanență valoarea pH-ului, 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, $0,18 \div 0,22 \text{ g CaCl}_2 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$ sub formă solidă, fin măcinată, astfel încât concentrația sării de calciu să atingă $0,8 \div 0,95 \text{ mM}$. Apoi,

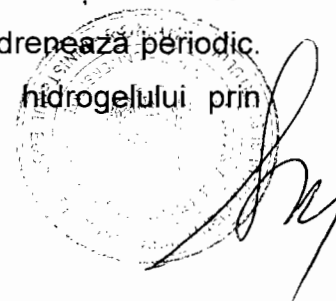


sistemul coloidal se lasă spre maturare, timp de $6 \div 18$ ore, la $4 \text{ }^\circ\text{C}$, sub agitare prin unduire. Suspensia de atelocolagenat de calciu rezultată se diluează apoi $1 : 3$ cu soluție de NH_4OH având pH-ul de 9,2, sub agitare lentă, prin unduire, după care se decantează, iar sedimentul floconos se separă centrifugal, la $1.000 \div 3.000 \text{ g}$, timp de $10 \div 40$ minute, în condiții de termostatare la $8 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$. Sedimentul se resuspendă în $1000 \text{ } \%$ 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 $0,3 \text{ M}$. Sistemul coloidal rezultat se supune ultrasonării, de trei ori câte 15 minute, pe baie de ultrasonare răcită cu gheață, la frecvența de 42 kHz și la o intensitate acustică de $0,4 \div 0,8 \text{ W/cm}^2$, intercalând câte 45 minute ședere statică. Apoi, soluției coloidale termostatate la $4 \text{ }^\circ\text{C}$, i se adaugă, sub agitare viguroasă, o soluție de transglutaminază (EC 2.3.2.13), anterior preparată în tampon HEPES la pH 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 $200 \div 400$ unități enzimatică per gramul de atelocolagen. Activitatea enzimatică a soluției de transglutaminază se determină utilizând kit-ul CS1070, produs de Sigma-Aldrich. În continuare, sub agitare energetică, temperatura sistemului coloidal se aduce la $20 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$, cu o pantă de $0,5 \text{ }^\circ\text{C} / \text{minut}$ și se menține la această temperatură timp de $30 \div 45$ minute, supraveghind evoluția gelifierii. Gelul lax obținut se răcește, sub agitare, până la $5 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$, iar apoi se supune ultrasonării de trei ori câte 15 minute, pe baie de ultrasonare răcită cu gheață, la frecvența de 42 kHz și la o intensitate acustică de $0,4 \div 0,8 \text{ W/cm}^2$, intercalând câte 45 minute 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 $0,12 \text{ mM}$. Ultrasonarea se repetă, la aceiași parametri, până la fluidificarea și omogenizarea sistemului coloidal. După o maturare statică, timp de $4 \div 12$ ore, la $4 \text{ }^\circ\text{C}$, sistemul coloidal se diluează de cinci ori, sub agitare eficientă, cu o soluție sterilă ce conține 136 mM NaCl , $2,7 \text{ mM KCl}$, $0,42 \text{ mM NaH}_2\text{PO}_4$, 12 mM NaHCO_3 , $5,5 \text{ mM}$ glucoză, 10 mM Triton X 100, 25 mM 1,2-etandiol, $5 \text{ } \%$ glicerină pură,



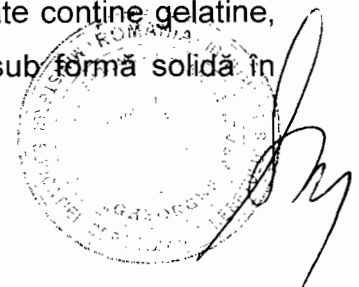
0,75 g/L doxicilină hclat, 5 mM HEPES, iar lichidul rezultat se supune separării centrifugale, timp de 30 ÷ 60 minute, la 1500 ÷ 3000 g, reținând sedimentul. Acesta din urmă se resuspendă într-un volum de 10 ÷ 15 ori mai mare de soluție având compoziția mai sus precizată, răcită la 4 °C, după care se 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 kgf/cm²), timp de 16 ÷ 24 ore, la 5 ± 2 °C, apoi se congelează la - 20 ÷ - 40 °C și se supun liofilizării. Liofilizatului se îmbibă și apoi se solvă în 200 ÷ 500 % v/m soluție alcalină cu pH 10 ± 0,3, ce conține 0,064 M NaHCO₃ și 0,036 M Na₂CO₃. După completa dizolvare, soluția coloidală obținută se supune ultrasonării de trei ori câte 15 minute, pe baie de ultrasonare răcită cu gheață, la frecvența de 42 kHz și la o intensitate acustică de 0,4 ÷ 0,8 W/cm², intercalând câte 45 minute ședere statică, iar apoi se filtrează peste membrane cu porozitatea de 0,4 μm. După răcirea la 10 ± 2 °C, în soluția coloidală se dizolvă, sub agitare energetică, 3 ÷ 8 % v/v 1,4-butandiol-diglicidil-eter (CAS 2425-79-8). Pentru energizarea reacțiilor de reticulare, temperatura soluției se ridică la 20 ÷ 25 °C, cu o pantă de 0,5 °C / minut, sub agitare lentă, urmărind evoluția vâscozității și intervenind cu perioade de agitare energetică atunci când aceasta tinde să crească prea rapid. După atingerea temperaturii prescrise, perioadele alternante de agitare lentă și agitare energetică se extind pe durata a încă 3 ÷ 9 ore. Dacă creșterea vâscozității este prea rapidă, soluția alcalină cu pH 10 ± 0,3 se înlocuiește cu o soluție al cărei pH se ajustează între 8,5 și 9,0, obținută pornind de la o soluție 0,025 M Na₂B₄O₇ · 10 H₂O. La final, temperatura hidrogelului lax obținut se coboară la 5 ± 2 °C, iar apoi hidrogelul se supune centrifugării, timp de 30 ÷ 60 minute, la 1500 ÷ 3000 g, reținând sedimentul. Separarea centrifugală a sedimentului se repetă de încă două ori, la aceiași parametri, în condiții de termostatare la 5 ± 2 °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 0,5 ÷ 3 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.

1.1.D. Formele de agregare supramoleculară a atelocolagenului, obținute conform descrierilor din paragrafele 1.1.A (microfibrile), 1.1.B (tactoizi) sau 1.1.C (domenii lax gelificate), aflate în stare păstoasă, așa cum au rezultat după separarea centrifugală finală, se amestecă apoi fizic, cu speciile polizaharidice biologic active aflate în stare solidă sau pregelificată, urmând procedurile descrise în cele ce urmează. Drept componentă polizaharidică biologic activă se pot utiliza: hialuronanul cu orice masă moleculară (liber de ioni, CAS 9004-61-9, sau sub forma sărurilor de sodiu ori de potasiu ale acestuia, CAS 9067-32-7, respectiv CAS 31799-91-4), oricare dintre glicoz-amino-glicanii acizi specifici țesuturilor conjunctive (de preferință condroitin sulfatul extras din cartilaj de rechin, CAS 9007-28-7), heparina (sub formă de sare de sodiu, CAS 9041-08-1). Amestecarea agregatelor atelocolagenice cu speciile polizaharidice biologic active se realizează în două etape, respectiv contactarea statică prelungită și omogenizarea în regim de agitare și / sau curgere. În prima etapă, lucrând în condiții sterile, forma atelocolagenică păstoasă se depune în strat subțire în tăvi scunde 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 pregelificată, de asemenea stratificat. Tăvile cu straturile celor două componente biologic active se mențin la 5 ± 2 °C, timp de $6 \div 36$ ore, intercalând periodic timpi de vibrație mecanică la frecvența de 50 Hz, cu amplitudini de $0,5 \div 3$ mm și drenând lichidul separat. În cea de-a doua etapă, omogenizarea compoziției păstoase rezultate se realizează prin malaxare, prin calandrare sau prin extrudare, funcție de vâscozitatea 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 $6 \div 18$ ore, la 5 ± 2 °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. Ea poate conține gelatine, hidrolizate de colagen, alte forme scleroproteice, toate adăugate sub formă solidă în



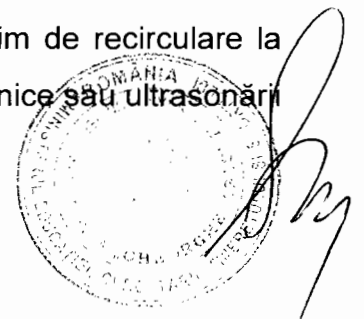
etapa de contactare statică prelungită. De asemenea, poate conține dextrină (CAS 9004-53-9), dextrans (9004-54-0), chitozan modificat chimic, sau orice alt polizaharid gelifiabil biocompatibil, adăugate sub formă solidă sau pregelificată. În urma amestecării celei de-a treia componente, se obține o compoziție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

Exemplul 1.2. Formularea amestecurilor de adjuvanți și excipienți

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

Exemplul 1.3. Realizarea blendurilor fluide

Constă în amestecarea prin injectare concomitentă, la debite proporționale, a amestecului ternar și a celui de adjuvanți și excipienți. Blendul fluid brut rezultat se răcește la 5 ± 2 °C, iar apoi se extrude prin orificii inelare, în regim de recirculare la aceeași temperatură. În continuare, blendul se supune vibrării mecanice sau ultrasunării



pentru eliminarea apei prin sinereză, urmată de ampastare prin malaxare sub eforturi mecanice mici sau moderate, care să nu încălzească excesiv pasta. Cantitățile de lichid separate în cursul vibrării / ultrasonării și malaxării se îndepărtează. Ciclul extrudere – vibrare / ultrasonare – malaxare se repetă de circa 5 ÷ 9 ori, până la perfecta omogenizare și până când cantitatea de apă eliminată prin sinereză scade semnificativ. La final, pasta rezultată se supune centrifugării timp de 15 ÷ 45 minute, la 1500 ÷ 4000 g, în regim termostatat la 5 ± 2 °C, îndepărtând supernatantul lichid rezultat. Se obține astfel un blend fluid, cu caracteristicile unui hidrogel dar și ale unei paste vâscoase, omogenă, neaderentă la pereții vaselor în care se află, care nu spumează și nu separă sub agitare. În toate volumele de lichid separate prin sinereză sau prin centrifugare se dozează analitic speciile mic moleculare din clasa adjuvanților (mai ales a modulatorilor ciclurilor celulare și a proteinelor serice), pentru întocmirea bilanțurilor de reținere a acestora în blendul fluid.

Exemplul 2. Depunerea straturilor de blend pe suport

În vederea vitrifierii, blendul fluid se depune prin raclare pe suporturi temporare sau permanente, anterior pregătite pentru a dobândi un grad controlat de repelență în raport cu compoziția fluidă, astfel încât vitrigelul să poată fi desprins de pe suport, după obținerea sa, sau 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.

Exemplul 2.1. Pregătirea suporturilor temporare

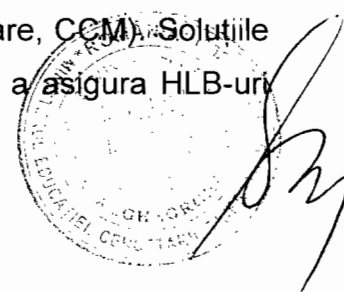
Suporturile temporare utilizate sunt de tipul casetelor tip vigneta, de formă dreptunghiulară, deschise la unul din capetele scurte și prevăzute cu un deversor înclinat la capătul opus. Marginile casetei au o înălțime de 2 ÷ 5 mm. De-a lungul laturilor lungi, la o distanță de 5 mm de marginea casetei, înspre interior, sunt prevăzute canale longitudinale cu 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 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 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.



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. 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, urmată de omogenizarea grosimii stratului prin vibrație mecanică (amplitudine 0,2 ÷ 0,5 mm, frecvența 50 Hz). În vederea formării filmului polimer, suportul se menține sub vid moderat (300 ÷ 600 mm coloană Hg), la temperatura de 35 ÷ 55 °C.

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 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-monolaurat, CAS 9005-64-5, CCM 0,06 mM în apă, HLB 16,7), Tween 80 (poli-oximetilen-20-monoleat, CAS 9005-65-6, CCM 0,012 mM în apă, HLB 15). Funcție de rapoartele de amestecare ale acestor 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 % 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 amestecurile în care tensioactivii cu HLB ridicat apar în proporții mai mari decât 20 ÷ 25 %, pentru a preîntâmpina migrarea acestora în blendul depus, ce urmează a fi supus vitrifierii. 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 vâcos la temperatura 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 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 de uscare sub vid moderat (300 ÷ 600 mm coloană Hg), la temperatura de 35 ÷ 55 °C.

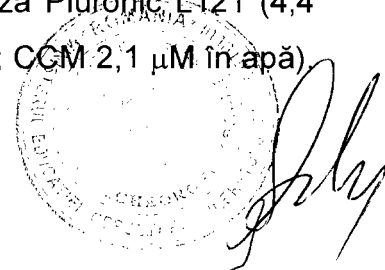
2.1.C. Filmele din bloc-copolimeri cu proprietăți tensioactive, de tipul poloxamerilor, se formează pornind de la soluții ale acestora în alcool etilic 98 %, cu concentrații la limita saturației (în preajma concentrației critice micelare, CCM). Soluțiile se prepară individual și se amestecă în proporțiile 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 vâscozitățile 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 ore, 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, 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)



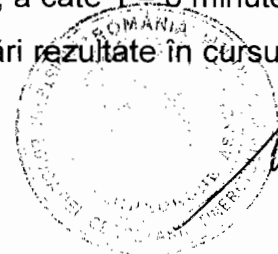
Pluronic L61 (2 kDa; HLB 3; CCM 0,11 mM în apă), Pluronic L92 (3,65 kDa; HLB 6; CCM 0,088 mM în apă). Suportul permanent astfel tratat se supune, la final, zvântării și uscării în curent de aer steril, cu temperatura de $25 \div 45$ °C, suflat paralel cu suprafața suportului. Grosimea stratului de interfațare 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 $30 \div 90$ minute 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. În continuare, pe suprafața suporturilor se preling, în ordine succesivă, următoarele soluții: (i) soluția hidroalcoolică a unui agent antifungic, de exemplu Amfotericina B (CAS 1397-89-3), (ii) soluția hidroalcoolică a unui antibiotic de uz general, de exemplu Gentamicina (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 $5 \div 120$ minute. 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*

Blendul fluid rezultat în urma formulării, se depune pe suportul temporar sau permanent, prin turnare și raclare. În cazul suporturilor temporare casetele se umplu uniform până la o înălțime stabilită experimental, funcție de grosimea finală impusă vitrigelului. În cazul suporturilor permanente, pe suprafața sitelor se plasează baghete delimitatoare, fixate la capete de placa din teflon, care suplinesc marginile casetelor, în vederea depunerii uniforme a straturilor de blend fluid. După depunerea blendului, casetele sau plăcile din teflon se supun vibrării mecanice, la frecvența de 50 Hz, cu o amplitudine de $0,2 \div 0,5$ mm, timp de $10 \div 30$ minute, drenând eventualul lichid rezultat. Apoi, stratul de blend se supune degazării progresive, în condiții sterile, prin menținerea sub vid moderat, timp de $3 \div 12$ ore, începând cu o presiune reziduală de 300 mm coloană Hg și încheind la $120 \div 180$ mm coloană Hg. Pe durata perioadei de degazare se intercalează $2 \div 6$ perioade de revenire la presiunea atmosferică, a câte $1 \div 6$ minute fiecare, pentru a induce relaxarea mecanică a eventualelor denivelări rezultate în cursul



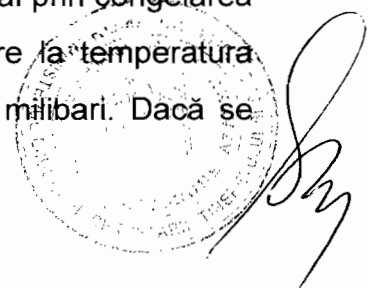
expunerii la vid. În mod opțional, la final, straturile de blend se maturează static, la 5 ± 2 °C, timp de 12 ÷ 18 ore, într-o incintă cu atmosferă condiționată, în care umiditatea relativă se reglează la 65 %.

Exemplul 3. Vitrifierea directă a straturilor de blend

Se realizează în condiții sterile, în patru etape, primele două la umidități ridicate, a treia sub vid, iar a patra utilizând un flux de aer cu umiditate relativă scăzută. Prima etapă implică maturarea straturilor de blend fluid, timp de 24 ÷ 48 ore, în incinte cu umiditatea relativă a aerului de 93 ± 1 %, asigurată prin prezența unei soluții saturate de KNO_3 . Cea de-a doua etapă se conduce la umiditate relativă a aerului de 75 ± 2 %, asigurată prin prezența în incinte a unei soluții saturate de NaOH , pe o durată de 48 ÷ 96 ore. Incintele se aduc și se 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 presiunea atmosferică, a câte 1 ÷ 6 minute 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 ore, la 15 ± 23 °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 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 steril, recirculat cu un debit de 0,3 ÷ 0,9 L / minut, 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 experimental, funcție de caracteristicile blendului supus vitrifierii. Ea 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

Implică, mai întâi, transformarea straturilor de blend fluid, obținute conform 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 ore, la 2 ± 10 °C. Transformarea în criogel se realizează în două etape, mai întâi prin congelarea rapidă a straturilor de blend la -20 ± -45 °C, urmată de liofilizare la temperatura ambiantă, sub vid avansat, la o presiune reziduală de 0,01 ÷ 0,03 milibari. Dacă se



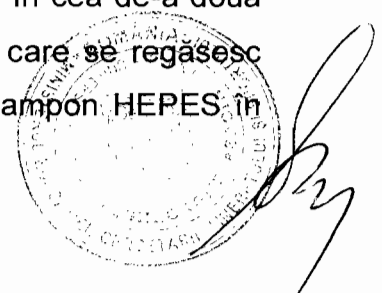
vizează realizarea de stive din mai multe straturi de criogel, respectivele straturi se supun unei scămoșări superficiale, prin periere ușoară, pe ambele suprafețe plate. Rehidratarea controlată a criogelurilor extrase din tăvi se efectuează, la rândul său, în trei etape, pe o durată cumulată de $72 \div 96$ ore, în incinte condiționate din punctul de vedere al umidității relative și temperaturii. Respectivii parametri de lucru se reglează la următoarele valori: $12 \div 18$ % și $40 \div 45$ °C, în prima etapă, $30 \div 35$ % și $22 \div 28$ °C, în a doua etapă, $60 \div 65$ % și $15 \div 18$ °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 $6 \div 18$ ore, în incinte cu umiditatea de $92 \div 95$ %, asigurată în prezența unei soluții saturate de KNO_3 . În continuare, criogelurile se îmbibă cu soluții tampon HEPES, ce conțin compuși (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 $3 \div 12$ kgf / cm², timp de $16 \div 36$ ore, la $4 \div 10$ °C, cu sau fără limitarea mecanică a grosimii, drenând continuu lichidul rezultat. La final, după îndepărtarea sarcinii mecanice, peliculele rezultate se maturează timp de $8 \div 16$ ore, la 5 ± 2 °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 $10 \div 30$ zile, în condiții sterile, sub vid moderat, la o presiune reziduală de $200 \div 350$ mm coloană Hg, la temperaturi de $2 \div 10$ °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, 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 a temperaturii, pe durate cumulate de $24 \div 96$ ore. Cele trei perechi de valori ale parametrilor de condiționare sunt: (i) $25 \div 40$ % și $4 \div 8$ °C, (ii) $50 \div 65$ % și $15 \div 18$ °C, (iii) $80 \div 95$ % și $22 \div 25$ °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



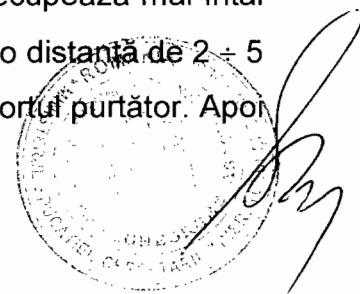
care s-au dozat compușii de interes biochimic, biomedical, farmaceutic sau cosmetic. La finalul rehidratării, vitrigelurile rezultate se supun unei maturări de $12 \div 48$ ore, la 5 ± 2 °C, în condiții sterile.

Exemplul 7. Posttratarea vitrigelurilor

Se aplică vitrigelurilor cu suport temporar, formate în casete, a celor cu suport permanent, plasate pe suprafața plăcilor de teflon, și a celor libere de suport, toate montate la oblică, sub unghiuri de $12 \div 30$ °, în incinte sterile etanșe, la temperatura ambiantă, în prezența unei soluții saturate de $MgCl_2 \cdot 6 H_2O$, care asigură o umiditate relativă de 33 ± 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 $MgCl_2 \cdot 6 H_2O$ 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. 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 glicoz-amino-glicanilor. În soluțiile de posttratare se introduc și antibiotice active împotriva micoplasmelor, cum este produsul Plasmocin (în cantitate de $1, 0 \div 1,6$ mL / L). După încheierea eluării, vitrigelurile se maturează prin condiționare, în incinte sterile etanșe, la două umidități relative descrescânde, mai întâi la 33 ± 1 %, în prezența unei soluții saturate de $MgCl_2 \cdot 6 H_2O$, iar apoi la 16 ± 1 %, în prezența unei soluții de 60 % H_2SO_4 p.a., pe o durată cumulată de $24 \div 72$ ore.

Exemplul 8. Maturarea finală a vitrigelurilor

Se aplică tuturor celor trei tipuri de vitrigeluri, respectiv desprinse de pe suportul temporar, atașate suportului permanent și libere de suport. În cazul vitrigelurilor desprinse de pe suportul temporar și celor libere de suport, acestea se decupează mai întâi la 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 între plăci din teflon sterile și se menține $6 \div 18$ ore într-o incintă cu recirculare forțată a aerului, la o umiditate relativă de 30 % și la o temperatură de 5 ± 1 °C. În cazul vitrigelurilor atașate suportului permanent, acestea se decupează mai întâi la geometria și dimensiunile dorite, iar apoi, pe conturul marginilor, la o distanță de $2 \div 5$ mm spre interior, se practică 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 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 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.

Exemplul 9. Ambalarea și stocarea vitrigelurilor

Piesele din vitrigel rezultate după maturarea finală se includ între folii sau în plicuri 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 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 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 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, ele putând fi utilizate doar drept vectori farmaceutici sau cosmetici, dar nu în aplicații ale ingineriei tisulare.



REVENDICĂRI

1. Compoziții vitrigelifiabile și procedeu pentru obținerea vitrigelurilor cu aplicații biomedicale, **caracterizate prin aceea că:**

- includ amestecuri fizice alcătuite din trei componente, unitare sau reprezentând la rândul lor amestecuri de specii (bio)chimice similare, cu rol de generare a fazei solide, respectiv o componentă biologic activă scleroproteică, o componentă biologic activă polizaharidică și o componentă lipsită de activitate biologică, de natură polipeptidică sau polizaharidică;

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

- componentele proteice și polizaharidice lipsite de activitate biologică au rol de adjuvanți, excipienți, agenți de șarjare, agenți porogeni erodabili;

- furnizează vitrigeluri cu caracteristici reproductibile din punctul de vedere al grosimii, gradului de hidratare, rezistențelor fizico-mecanice și reologice, reactivității, compoziției fazelor solidă și lichidă, stabilității dimensionale și compoziționale;

- furnizează vitrigeluri libere de suport sau atașate unui suport purtător, de tipul sitelor fine, cu fire din polipropilenă sau nylon;

- furnizează vitrigeluri care includ specii (bio)chimice oligomere și mic-moleculare cu roluri de modulatori ale ciclurilor de viață celulară, nutrienți suport pentru celulele specifice țesutului conjunctiv, agenți farmaceutici, agenți dermato-cosmetici etc.;

- vitrigelurile se generează, pornind de la compozițiile formulate, în trei etape principale, respectiv gelifierea componentelor generatoare ale fazei solide, vitrifierea compoziției gelifiate și rehidratarea controlată a straturilor vitrificate;

- vitrigelurile furnizate se stochează în condiții sterile, plasate fiind între folii sau în plicuri din Mylar sterilizate și tratate împotriva micoplasmelor, incluse și închise sub vid în pungi din polietilenă sterilizate, iar acestea din urmă introduse, sub formă de loturi, în casete sterilizate din polietilenă, în care se introduc soluții de antifungice și de antibiotice și care se închid etanș, fiind păstrate la frigider sau fiind supuse congelării;

- vitrigelurile furnizate au aplicații ca substraturi în ingineria tisulară, ca vehiculanți ai speciilor farmaceutice și dermato-cosmetice și drept componente în sisteme pentru vehicularea sau preluarea fluidelor de interes terapeutic în actul medical.



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-glicanii și glicoproteinele.

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 sau animală, eventual modificate chimic.

5. Compoziții conform revendicării 1, **caracterizate prin aceea că** se formulează conform principiilor planificării experimentelor cu factori corelați.

6. Procedeu conform revendicării 1, **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 1, **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 filmelor vitrificate.

8. Procedeu conform revendicării 1, **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) posttratarea fizico-chimică a vitrigelurilor, (iii) maturarea finală a vitrigelurilor.

9. Procedeu conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** toate operațiile pe care le implică subetapele conform revendicărilor 6, 7 și 8 se efectuează în condiții de curățenie și sterilitate de nivel ISO 8, sau mai ridicate, prevăzute în standardul ISO 14644-1 / 1999 și extensiile acestuia, toate speciile (bio)chimice utilizate sunt de puritate farmaceutică sau analitică, toate cantitățile de apă utilizate au puritate



farmaceutică, fiind sterile și libere de pirogeni, corespunzând prescripțiilor monografiei 01/2009:1927 din Farmacopeea Europeană, ediția a 7-a, iar toate soluțiile compușilor oligomeri și mic-moleculari sunt supuse sterilizării suplimentare în momentul utilizării, prin filtrare peste membrane cu porozitate de 0,2 microni.

10. Procedeu conform revendicărilor 1 și 6, **caracterizat prin aceea că** structurarea componentei scleroproteice se realizează prin microfibrilare sub efectul combinat al tăriei ionice și al temperaturii, iar microfibrilele rezultate se individualizează în suspensie prin ultrasonare, separându-se apoi centrifugal sub forma unui hidrogel structurat, păstos.

11. Procedeu conform revendicărilor 1 și 6, **caracterizat prin aceea că** structurarea componentei scleroproteice se realizează prin agregare tactoidală în urma reticulării sub acțiunea transglutaminazei (EC 2..3.2.13), în condiții de blocare fizico-chimică a gelifierii și prin individualizarea tactoizilor în suspensie sub acțiunea ultrasunetelor, urmată de maturarea și separarea centrifugală repetată, în scopul eliminării enzimei și a adjuvanților săi, finalizată prin obținerea unui sediment cu caracteristici similare hidrogelurilor fizice.

12. Procedeu conform revendicărilor 1 și 6, **caracterizat prin aceea că** structurarea componentei scleroproteice se realizează prin reticulare sau, opțional, prin coreticulare cu componenta polizaharidică biologic activă, efectuată utilizând agenți chimici de reticulare ce induc punți de lungime zero sau punți catenare, de preferință furnizate de către specii bifuncționale reactive, din clasele diizocianatilor, dicarbonililor, dioxiranilor, oligomerilor acrilici reactivi, aceștia din urmă presintetizați sau sintetizați *in situ*, finalizată prin concentrarea prin sinereză și apoi prin separarea centrifugală a hidrogelului lax, sub forma unui sediment păstos.

13. Procedeu conform revendicărilor 1 și 6, **caracterizat prin aceea că** formele pregelificate obținute în conformitate cu revendicările 10, 11 sau 12, se amestecă fizic cu componenta polizaharidică biologic activă, aceasta din urmă sub formă solidă sau pregelificată, iar amestecurile rezultate se concentrează prin sinereză sub efectul vibrațiilor mecanice ori al ultrasunetelor, apoi se supun omogenizării avansate prin malaxare, calandrare sau extrudare, se maturează și în continuare se ampastează pe rând cu adjuvanții (bio)chimici, cu speciile de interes biochimic, biomedical, farmaceutic, dermato-cosmetic, cu excipienții și cu agenții de șarjare și porogenii erodabili, iar în continuare compoziția rezultată se omogenizează avansat prin cicluri repetate de extrudare, vibrație / ultrasonare și malaxare, la final supunându-se separării centrifugale pentru obținerea unui blend fluid, cu caracteristicile unui gel onctuos.



14. Procedeu conform revendicărilor 1 și 7, **caracterizat prin aceea că** suporturile pe care urmează a se vitrifia blendul fluid obținut în conformitate cu revendicarea 13 se pregătesc prin acoperire cu un film polimer generat prin uscarea controlată a unor soluții alcoolice, depuse prin pulverizare sau turnare, ce conțin un amestec de polimeri hidrofili și hidrofobi, cei hidrofili putând fi polivinilpirolidona, polietilenoxidul sau hidroxipropil-metilceluloza, iar cei hidrofobi acetatul de polivinil, polivinil-stearatul sau polivinil-cinamatul.

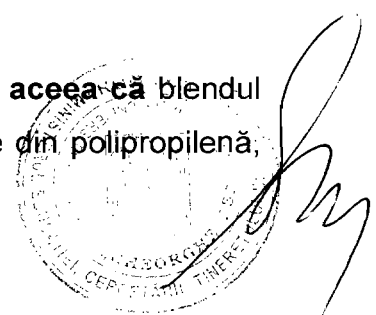
15. Procedeu conform revendicărilor 1 și 7, **caracterizat prin aceea că** suporturile pe care urmează a se vitrifia blendul fluid obținut în conformitate cu revendicarea 13 se pregătesc prin acoperire cu un film hidrofob generat prin uscarea unui amestec de tensioactivi având HLB-uri distonante, selectați, spre exemplu, dintre produsele Span și Tween, pentru ca în amestec să furnizeze HLB-uri în plaja 2,0 ÷ 6,5, amestecul depunându-se pe suporturi prin pulverizare.

16. Procedeu conform revendicărilor 1 și 7, **caracterizat prin aceea că** suporturile pe care urmează a se vitrifia blendul fluid obținut în conformitate cu revendicarea 13 se pregătesc prin acoperire cu un film hidrofob generat prin uscarea soluției alcoolice a unui amestec de poloxameri, selectați, spre exemplu, dintre produsele Pluronic, pentru ca în amestec să furnizeze HLB-uri în plaja 2,0 ÷ 8,0, amestecul depunându-se pe suporturi prin pulverizarea în două etape, mai întâi a unui film de poloxamer hidrofil, iar apoi a amestecului cu HLB impus.

17. Procedeu conform revendicărilor 1 și 7, **caracterizat prin aceea că** suporturile pregătite în conformitate cu revendicările 14, 15 sau 16, se supun unui tratament combinat de spălare, hidrofilizare superficială și sterilizare, efectuat prin prelingerea succesivă a unor soluții hidroalcoolice de antifungici, antibiotice de uz general și antibiotice energice.

18. Procedeu conform revendicărilor 1 și 7, **caracterizat prin aceea că** blendul fluid obținut în conformitate cu revendicarea 13 se depune pe suporturile temporare sau permanente prin turnare și raclare, iar apoi straturile rezultate se supun succesiv deshidratării prin sinereză, degazării sub vid, vitrifierii prin deshidratare lentă, în prezența unor desicanți, apoi sub vid și în continuare în curent de aer cald steril, uscat prin recirculare peste site moleculare, iar la final filmele vitrificate se supun maturării timp de mai multe zile, sub vid, în prezența unor geluri care emană mici cantități de alcool etilic.

19. Procedeu conform revendicărilor 1 și 7, **caracterizat prin aceea că** blendul fluid obținut în conformitate cu revendicarea 13 se depune în casete din polipropilenă,



apoi se congelează și se liofilizează, după care se condiționează lent la trei umidități crescânde, apoi, straturile microporoase obținute, se rehidratează, individual sau în stive, se îmbibă opțional cu soluții ale unor specii (bio)chimice, farmaceutice sau cosmetice, se supun apoi presării, cu sau fără limitarea mecanică a grosimii, se maturează la rece, iar în continuare se supun vitrifierii prin deshidratare lentă și se maturează, în conformitate cu prescripțiile din revendicarea 18.

20. Procedeu conform revendicărilor 1 și 8, **caracterizat prin aceea că** filmele vitrificate obținute în conformitate cu revendicările 18 și 19 se supun rehidratării controlate, opțional în două etape, prima prin condiționare în incinte cu umiditatea și temperatura controlate, iar a doua prin pulverizare cu soluții tampon 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, antibiotice și / sau enzime, operații efectuate în atmosferă cu umiditate controlată, iar la final, vitrigelurile postprocesate se maturează prin condiționarea în două etape, la umidități descrescătoare.

21. Procedeu conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** în vederea stocării, vitrigelurile rehidratate și postprocesate în conformitate cu revendicarea 20 se desprind, dacă 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 maturări finale, sub ușoară presare, la o umiditate relativă coborâtă și la rece, apoi, dacă este cazul, se ajustează dimensional și se individualizează pe suportul 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 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, 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 stocare, caz în care din rândul aplicațiilor vitrigelurilor îndelung stocate se elimină cele din ingineria tisulară.