



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2010 01273**

(22) Data de depozit: **06.12.2010**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30.12.2013** BOPI nr. **12/2013**

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

(73) Titular:
• **UNIVERSITATEA TEHNICĂ DIN
CLUJ-NAPOCA, STR.MEMORANDUMULUI
NR.28, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO**

(72) Inventatori:
• **POPA CĂTĂLIN, STR.DONATH NR.113,
AP.19, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;**
• **CONT LIANA, ALEEA BUCURA NR.3,
CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;**
• **DINDELEGAN GEORGE, STR.MOȚILOR
NR.1, AP.7, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;**
• **SIMON VIORICA, STR.HOREA NR.4,
AP.22, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;**

• **BRIE IOANA, STR.PADIȘ NR.3, SC.1,
ET.2, AP.7, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;**
• **PAVEL CODRUȚA,
STR.ALEXANDRU BOHAȚIEL NR.16,
CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;**
• **CÂNDEA VIOREL, STR.CÂMPULUI
NR.178, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO**

(74) Mandatar:
**CABINET DE PROPRIETATE
INDUSTRIALĂ CIUPAN CORNEL,
STR. MESTECENILOR NR. 6, BL. 9E, AP. 2,
CLUJ NAPOCA, JUDEȚUL CLUJ**

(56) Documente din stadiul tehnicii:
**US 2003 137083 A1; US 2004 013873 A1;
US 2004 076661 A1**

(54) **PROCEDEU DE OBTINERE A STRUCTURILOR DE
SUSȚINERE CELULARĂ ȘI MATERIALE COMPOZITE
DESTINATE INGINERIEI ȚESUTURILOR**



1 Inventția se referă la un material compozit pe bază de polidioxanonă și acid polilactic
2 pentru realizarea structurilor de susținere celulară, la un procedeu de obținere a materialului
3 compozit și la o instalație pentru aplicarea procedurii.

4 Inventția are ca domeniu de aplicare ingineria țesuturilor, definită prin utilizarea mate-
5 rialelor biodegradabile sintetice sau naturale, implantate cu celule vii dacă este necesar,
6 pentru regenerarea formei și/sau funcției unui țesut distrus sau bolnav sau a unui organ al
7 unui pacient uman (**R. Lanza, R. Langer, J. Vacanti, Principles of tissue engineering, Elsevier Academic Press, third edition, 2007, ISBN 978-0-12-370615-7, 16, 324 - 333**).
8 Procedeu și materialele compozite produse conform invenției se referă la structuri din
9 polimeri biodegradabili, care vor fi utilizate ca suport pentru creșterea celulară - structuri de
10 susținere celulară (*Scaffold- engl.*).

11 Confecționarea structurilor de susținere celulară este prima etapă tehnologică în
12 ingineria țesuturilor. Acestea se obțin în special din polimeri bioresorbabili și se utilizează
13 pentru asistarea formării *in vitro* de țesut artificial pornind, în general, de la celulele pacientului.

14 Structurile de susținere celulară trebuie să prezinte o serie de caracteristici esențiale,
15 atât la nivelul materialului din care sunt confecționate, pentru realizarea unei atașări cât mai
16 eficiente a celulelor și pentru o bioeroziune controlată, cât și la nivelul designului, pentru a
17 se asigura morfologia și proprietățile mecanice necesare. Astfel, porozitatea trebuie să fie
18 cât mai mare, având rolul de a asigura respirația și alimentarea cu nutrienți a celulelor. Cea
19 mai eficientă metodă este utilizarea de textile nețesute, care ating porozități peste 80%. De
20 asemenea, fibrele din materialul textil trebuie să fie de dimensiuni mici (până la ordinul micro-
21 nilor), astfel încât bioerodarea să fie rapidă iar atașarea celulelor să fie eficientă. **R. Lanza,**
22 **R. Langer, J. Vicanti, Principles of tissue engineering, Elsevier Academic Press, third**
23 **edition, 2007, ISBN 978-0-12-370615-7, 16, 324 - 333 precizează că, prin macro și**
24 **microstructura lor, structurile de susținere celulară trebuie să asigure, în funcție de tipul de**
25 **aplicații: comunicarea celulă-celulă și maximizarea alimentării celulelor cu nutrienți, factori**
26 **de creștere și agenți farmaceutici activi; încetinirea activității celulare (de exemplu în**
27 **adeziunea indusă chirurgical); ghidarea țesutului (sporind răspunsul celulei individuale țintă**
28 **și inhibând răspunsul altor celule); sporirea atașamentului celular și activarea celulelor din**
29 **stratul următor (de exemplu atașarea și proliferarea fibroblastelor și producerea de matrice**
30 **extracelulară pentru repararea dermei); întârzierea răspunsului biologic (de exemplu blo-**
31 **carea anticorpilor împotriva celulelor homografe și xenografe utilizate în terapiile de înlocuire**
32 **a organelor).**

33 Polimerii biodegradabili utilizați trebuie să îndeplinească o serie de cerințe: disponibi-
34 litate, prelucrabilitate, proprietăți mecanice minime, toxicitate redusă sau neglijabilă pentru
35 produse de degradare atât local, cât și sistemic, **R. D. Buddy, A.S. Hoffman, F.J. Schoen,**
36 **J.E. Lemons, Biomaterials Science - An introduction to Materials in Medicine, Edorsed**
37 **by the Society for Biomaterials, Academic Press 1996,66-72.**

38 Polimerii biodegradabili utilizați pentru *scaffolds* se clasifică în:

39 1. Polimeri naturali: colagen tip I, structuri colagenice de tip mătase, glicosamino-
40 glicani, citosan, polihidroxiacalanți etc.;

41 2. Polimeri sintetici: acizi poliglicolici, acizi polilactici, polidioxanonă, policaprocaltună,
42 poli-ortoesterii, poliuretani, polianhidride, polifosfați, poli (amino acizi), pseudo-poli(amino
43 acizi) etc.

44 Acești polimeri se degradează prin acțiune enzimatică, transformându-se din
45 insolubili în solubili în apă, după unul dintre mecanismele I, II, III, prezentate de **R. D. Buddy,**
46 **A. S. Hoffman, F. J. Schoen, J. E. Lemons, Biomaterials Science - An introduction to**

Materials in Medicine, Edorsed by the Society for Biomaterials, Academic Press 1996, 66-72.	1
Reacțiile chimice pot determina ruperea legăturilor dintre lanțurile polimerice (Mecanism I), scindări ale lanțurilor laterale formându-se grupări polare sau grupări polarizate (Mecanism II), sau rupei ale legăturilor dintre unitățile polimerice repetitive (Mecanism III).	3
Factorii principali care determină viteza de bioerodare sunt: stabilitatea chimică a catenei principale, hidrofobicitatea, morfologia polimerului, greutatea moleculară inițială a polimerului, procesul de fabricație, prezența catalizatorilor, aditivilor sau plastifiantilor. Deși susceptibilitatea catenei principale este factorul cel mai important, combinația celorlalte caracteristici contribuie esențial la viteza de bioerodare. Morfologia polimerilor influențează și ea viteza de bioerodare. Acidul polilactic L și acidul polilactic D, L se degradează diferit. Deși au același lanț principal și același grad de hidrofobicitate, dispozitivele elaborate din acidul polilactic L tind să se degradeze mai lent decât cele elaborate din acidul polilactic D, L. Bioerodarea acidului polilactic L este mai lentă din cauza semicristalinității acestui polimer stereoregular, în timp ce acidul lactic D, L, optic inactiv (racemic), este amorf. Procesul de fabricație determină într-o oarecare măsură și profilul eroziunii. De exemplu, Mathiowitz și coautorii (R. D. Buddy, A. S. Hoffman, F. J. Schoen, J. E. Lemons, Biomaterials Science - An introduction to Materials in Medicine, Edorsed by the Society for Biomaterials, Academic Press 1996, 66-72) au demonstrat că microsferile produse prin încapsularea topiturii erau foarte compacte și slab erodate, în timp ce aceiași polimeri elaborați ca microsferă prin evaporarea solventului erau foarte poroși (deci mai permeabili la apă) și erodați mai rapid.	5
Polimerii naturali utilizați în prezent pentru <i>scaffolds</i> sunt:	7
<u>1. Colagenul de tip I</u>	9
Colagenul este elementul principal al țesutului conectiv natural, proteină animală însumând aproximativ 30 % din proteinele corpului uman (P. Golg, Exploiting Spider's Silk, Materials Today, Research News, 2002, 9(6), 41-47 , R. Lanza, R. Langer, J. Vicanti, Principles of tissue engineering, Elsevier Academic Press, third edition, 2007, ISBN 978-0-12-370615-7, 16, 324 - 333). Se găsește în orice țesut care necesită rezistență și flexibilitate (exemplu piele, os). S-au identificat 14 tipuri de colagen dar colagenul tip I este predominant. Din cauză că este atât de abundent (peste 90% din toate proteinele fibroase) și datorită proprietăților sale biologice și fizice, colagenul de tip I s-a utilizat foarte des în elaborarea materialelor biomedicale. Structura sa este compusă din: glicol - într-o cantitate mică, acesta fiind singurul amino acid care are loc în interiorul spiralei, prolină și hidroxiprolină (J. A. Kluge, O. Rabotyagova, G. G. Leisk, David. L. Kaplan., Spider silks and their applications, Trends in Biotechnology, Cell Press, 26(5), 224-251).	11
<u>2. Pânza de păianjen</u>	13
Pânza de păianjen este un material natural fibros, utilizat frecvent datorită rezilienței, proprietăților mecanice excelente, rezistenței la torsiune. Spre deosebire de alte fibre de mătase obținute de la alte insecte, cum ar fi de la viermii de mătase, sau față de polimerii sintetici, prezintă rezistență mecanică ridicată și modul de elasticitate ridicat. Cu toate că produsele obținute din acest material nu se comercializează datorită slabei productivități, ele sunt folosite la fabricarea tendoanelor artificiale și pentru suturile chirurgicale nonalergene (J. A. Kluge, O. Rabotyagova, G. G. Leisk, David. L. Kaplan., Spider silks and their applications, Trends in Biotechnology, Cell Press, 26(5), 224-251). Comportamentul pânzei de păianjen este similar cu cel al materialelor cu memoria formei, cum ar fi al aliajului Ni-Ti (Nitinol). Acest aliaj produce o curba de încărcare - descărcare asemănătoare cu cea a pânzei de păianjen. Singura diferență este că pânza de păianjen revine singură la forma	15

inițială, în timp ce aliajul își recapătă forma doar prin încălzire (P. Golg, **Exploiting Spider's Silk, Materials Today, Research News, 2002, 9(6), 41-47**). Apa influențează în mare măsură proprietățile mecanice ale pânzelor de păianjen. În contact cu apa, unele fibre de pânză de păianjen se contractă, ajungând la jumătate din lungimea lor și își dublează diametrul, fenomen numit „super contracție” (C. Veparia, D. L. Kaplana, **Silk as a biomaterial, Elsevier, 2007, 32, 991-1007**). Acest fenomen implică absorbția solventului de către mătase, deci scăderea rigidității.

3. Glicozaminoglicanii

Cuprind dizaharide liniare, cu acid uronic (glucouronic) și o hexozamină. Cel mai des folosit, acidul hialuronic, este o polizaharidă anionică având unități de glucozamine și acid glicolic. Acidul hialuronic poate fi izolat din surse naturale (coaja de cocos) sau prin fermentarea microbială. Este folosit ca biomaterial, datorită faptului că nu este antigenic, nu provoacă inflamații și nici reacții de corp străin. Materialul are însă și dezavantaje, cum ar fi: rezistență scăzută în timp și proprietăți mecanice slabe. Glicozaminoglicanii sunt acizi, astfel sunt încărcăți negativ, atrăgând ioni pozitivi, în special Na⁺, care din punct de vedere osmotic atrag apa conducând la transformarea moleculei într-un gel. Glicozaminoglicanii ca condroitinul, dermatanul sau heparanul pot fi sintetizați intracelular, sulfatați, secretați și, de regulă, sunt legați covalent în proetoglicani. Sunt cu mult mai mici decât acizii hialuronici (http://www.steve.gb.com/science/extracellular_matrix.html, mai 2010).

4. Chitosanul

Acesta este o polizaharidă biosintetică derivată din chitină. Viteza de biodegradare a polimerului se determină în funcție de cantitatea reziduală de acetyl, parametru ușor de modificat. Gelurile, pulbera, filmele și fibrele de chitosan au fost elaborate și testate pentru diverse aplicații cum ar fi: încapsulări, membrane, materiale pentru lentilele de contact, substraturi pentru creșterea și atașarea de celule (<http://nano.ece.uiuc.edu/research/nanofab.html>, mai 2010).

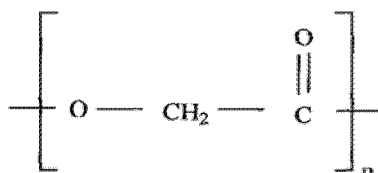
Dintre polimerii sintetici utilizați pentru scaffolds se pot enumera:

1. Hidroxiacizii α

Hidroxiacizii obținuți natural, cum ar fi cel glicolic, lactic și caprolactona, au fost utilizați pentru a sintetiza o serie de polimeri biodegradabili utili diferitelor aplicații medicale. Degradarea inițială apare până când masa moleculară ajunge la 5000 Da. Degradarea finală și resorbția polihidroxiacizilor implică activitatea celulelor inflamatorii (macrofage, limfocite, neutrofile). Polihidroxiacizii au proprietăți mecanice slabe și condiții de procesare modeste. Cu toate acestea, acești termoplaști pot fi prelucrați în filme, tuburi, matrice, utilizând metode cum ar fi: turnare, extrudare, spin casting, solvent casting etc.

1.1 Acidul poliglicolic (PGA)

PGA are cea mai simplă structură dintre hidroxiacizii α .



Acidul poliglicolic

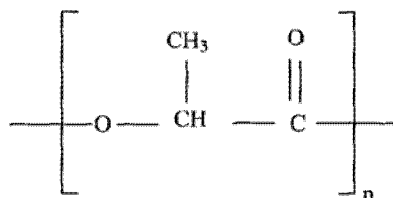
Acidul poliglicolic are o structură înalt cristalină, punct de topire ridicat și solubilitate scăzută în solvenți organici. Datorită naturii sale hidrofile, PGA tinde să își piardă destul de rapid rezistența mecanică, de obicei după o perioadă de la 2 la 4 săptămâni post implantare.

RO 127534 B1

Pentru a putea adapta proprietățile materialului mai multor aplicații, s-au combinat copolimerii PGA cu acizi mai hidrofobi, cum ar fi PLA.

1.2 Acidul polilactic (PLA)

Datorită prezenței unei grupări metil adiționale în PLA, acesta este mai hidrofob decât PGA.



Acidul polilactic

Absorbția apei de către filmele subțiri este limitată la 2%, astfel rezultând o viteză de hidroliză mai scăzută decât cea a PGA. În plus, PLA este mult mai solubil în solvenți organici decât PGA, facilitând prelucrarea. Există în două forme stereoizomerice care dau naștere la 4 polimeri diferiți, dintre care D-PLA și L-PLA sunt cele două tipuri de polimeri stereoregulari. Polimerii derivați din monomerii optic activi D și L sunt materiale semicristaline, pe când cei optici inactivi D și L - PLA sunt întotdeauna amorfii. De obicei, L-PLA este mai des folosit, deoarece hidroliză L - PLA produce acid lactic L (+), care este stereoizomerul acidului lactic obținut pe cale naturală. L - PLA este un polimer amorf, preferat în cazurile în care se cere rezistență mecanică, de exemplu, suturile și dispozitivele ortopedice. PLLA (acidul-poli-L-lactic) rezultă din polimerizarea acidului L-lactic. Cristalinitatea este de 37% iar temperatura de topire este $T_t=173-178^{\circ}\text{C}$. Poate fi procesat ca fibră sau ca film.

2. Polidioxanona (PDO)

Polidioxanona este un polieter-ester, fiind sintetizat prin polimerizarea p-dioxanonei cu un ciclu deschis. Datorită degradării monomerilor cu toxicitate mică in vivo, PDS este foarte folosit în domeniul medical și farmaceutic. Are un modul de elasticitate mai mic decât PLA și PGA, fiind primul polimer degradabil folosit pentru suturi monofilament.

3. Polifosfați

Polifosfații conțin un lanț anorganic azot - fosfor. **R. Lanza, R. Langer, J. Vicanti, Principles of tissue engineering, Elsevier Academic Press, third edition, 2007, ISBN 978-0-12-370615-7, 16, 324 - 333** precizează că Singht et al (2006) a modificat proprietățile specifice ale polifosfaților, cum ar fi: viteza de degradare la temperatura de tranziție vitrosă, umectarea suprafeței, rezistența la tracțiune și modulul de elasticitate, pentru ca acești polimeri să poată fi folosiți în diverse aplicații medicale. Cei mai studiați polifosfați sunt cei hidrofobi, cu o slabă interacțiune cu țesutul, asemănătoare cu cea a teflonului.

4. Poliaminoacizii

Deoarece proteinele sunt compuse din aminoacizi, mulți cercetători au încercat să elaboreze polimeri sintetici derivați din aminoacizi pentru a servi ca modele în studii structurale, biologice și imunologice, cât și în aplicații biomedicale. Cum acești polimeri eliberează pe cale naturală amino acizi ca primi produși ai desfacerii scheletului polimeric, degradarea lor prezintă un nivel scăzut de toxicitate sistemică. Poliaminoacizii au fost investigați ca materiale pentru suturi, ca substituiți de piele prin tehnicile ingineriei țesuturilor și ca sisteme de dozare a medicamentelor. Secvențe scurte de aminoacizi, cum ar fi RGD și RGDS, promotorii adeziunii celulelor, au fost cuplați cu alți polimeri biodegradabili pentru a îmbunătăți creșterea celulelor în ingineria țesuturilor (**R. Lanza, R. Langer, J. Vacanti,**

1 **Principles of tissue engineering, Elsevier Academic Press, third edition, 2007, ISBN**
2 **978-0-12-370615-7, 16, 324 - 333).**

3 În concluzie, materialele biodegradabile, la modul general, trebuie să îndeplinească
4 condiții mult mai riguroase în ceea ce privește biocompatibilitatea decât materialele bioinerte.
5 Față de acestea, pentru materialele biodegradabile trebuie luată în considerare toxicitatea
6 provenită din degradarea produșilor și reacția metabolismului de după degradare. Astfel,
7 doar trei polimeri sintetici biodegradabili au fost aprobați de către FDA (Food and Drug
8 Administration, S.U.A.) pentru a fi utilizați în medicina umană: PLA, PGA, PDO.

9 Materialele compozite produse conform prezentului brevet sunt alcătuite din PLA și
10 PDO și pot fi dezvoltate și pentru PGA și PDO, respectiv copolimeri ai PLA și PGA.

11 Structurile de susținere celulară se pot fabrica printr-una dintre metodele (R. Lanza,
12 R. Langer, J. Vacanti, **Principles of tissue engineering, Elsevier Academic Press, third**
13 **edition, 2007, ISBN 978-0-12-370615-7, 16, 324 - 333, O. H. Kwon, I. S. Lee., Y. G. Ko,**
14 **W. Meng, K. H. Jung, I. K. Kang, Y. Ito, Electrospinning of microbial polyester for cell**
15 **culture, Insitute of Physics Publishing, Biomedical Materials, 2007, 2, 52-58, A. Yamada,**
16 **F. Niikura., K. Ikuta, A three-dimensional microfabrication system for biodegradable**
17 **polymers with high resolution and biocompatibility, Iop Publishing, Institute of**
18 **Physics Publishing, 2008, 18, 1-9, I. S. Park, S. H. Kim, J. W. Han, Y. G. Ko, E. Chung,**
19 **S Hyun. Kim, Optimization of Scaffold for a Successful Hydrogel-seeding Method for**
20 **Vascular Tissue Engineering, Trans Tech Publications, 2007, 342-343, 333-336):**

- 21 1. Legarea Fibrelor
- 22 2. „Electrospinning”
- 23 3. Turnarea solventului și solubilizarea particulelor
- 24 4. Formare prin turnare
- 25 5. Laminarea membranelor
- 26 6. Extrudare
- 27 7. Criodesicare
- 28 8. Separare de faze
- 29 9. Emulsia amestecului de fază (High Internal Phase Emulsion)
- 30 10. Formarea spumei cu gaz (spumarea gazului)
- 31 11. Elaborarea de compozit polimer-ceramic
- 32 12. Fabricarea rapidă a prototipurilor pentru formele solide libere
- 33 13. Autoasamblarea peptidelor
- 34 14. Polimerizare *in situ*.

35 *Electrospinning* este o metodă modernă pentru a elabora structuri de susținere poroase
36 din nano sau micro fibre biocompatibile și implică rotirea în câmp electrostatic a fibrelor, metoda
37 fiind derivată din pulverizarea electrostatică a acoperirilor polimerice. Prin *electrospinning* se
38 elaborează structuri de susținere cu porozitate ridicată din fibre neșesute și fibre ultrafine. Mulți
39 polimeri biocompatibili, cum ar fi PGA, PLGA și PCL, pot fi fabricați prin *electrospinning* (elec-
40 trofilare) în structuri de nanofibre de susținere cu porozități de peste 90% (Yashimoto et al.,
41 2003, R. Lanza, R. Langer, J. Vicanti, **Principles of tissue engineering, Elsevier Academic**
42 **Press, third edition, 2007, ISBN 978-0-12-370615-7, 16, 324 - 333). Soluția polimerică este**
43 **introdusă într-o seringă și injectată printr-un tub metalic capilar la o viteză constantă, cu ajutorul**
44 **unei pompe pentru seringi. Tubului capilar i se aplică un câmp de înaltă tensiune, polarizând**
45 **polimerul și direcționându-l spre suprafața de colectare împământată (O. H. Kwon, I. S. Lee.,**
46 **Y. G. Ko, W. Meng, K. H. Jung, I. K. Kang, Y. Ito, Electrospinning of microbial polyester**
47 **for cell culture, Insitute of Physics Publishing, Biomedical Materials, 2007, 2, 52-58).**

RO 127534 B1

Odată cu dispunerea acestor fibre fine pe suprafața plană, solventul este evaporat, lăsând o structură poroasă nețesută. Grosimea fibrei, diametrul structurii de susținere și diametrul mediu al porilor sunt controlate prin: solventului ales, concentrația polimerului, viteza de injectare, intensitatea curentului, diametrul tubului capilar, materialul de colectare de pe placă, distanța dintre vasul capilar și placa de colectare.

Metoda de producere de structuri fibroase prin *electrospinning* face obiectul unor brevete de invenție, cu referire la aplicații diverse, **US 7264762**, sau medicale. Sunt brevete structuri compozite tridimensionale din amestecuri de fibre de grosimi diferite și aplicații medicale generale, **US 2004/0076661 A1**, din componenți amestecați în stare dizolvată (PLGA și proteine naturale), **US 20060263417 A1** sau din fibre poroase având pori canelari, **US 20040013873**. În literatura de brevete din domeniu, apar multe alte metode de producere a structurilor de susținere celulară, cu destinații medicale diferite. **US 6596296** propune dozarea controlată de medicament pe fibre țesute, nețesute sau împletite. Orientarea fibrelor se poate realiza printr-un proces de dizolvare - precipitare, într-o matrice cu porozitatea obținută prin spumare, **US 20050240281, A1**. Porozitatea matricei (colagen) se poate obține și prin turnare pe o structură realizată în prealabil (din tendon ne-imunogenic), **US 20090075382, A1**. Problema structurilor 3D propriu-zise este abordată fie prin construcție pe un sistem de inele, **US 5560730**, fie prin utilizarea de straturi multiple suprapuse, cu roluri diferite - unul bioinert, unul biodegradabil și unul de acroșaj -pentru aplicații în vindecarea asistată a rănilor, **PCT/US2001/040094**.

Este cunoscut un procedeu [**US 2003137083 A1**] de obținere a fibrelor polimerice conductoare de *electrospinning* dintr-un amestec de polimeri. Fibrele de polimeri sunt constituite polietilenoxid, polianilină și poliacrilonitril. Procedeu utilizează o instalație alcătuită dintr-un generator de înaltă tensiune care se aplică între fluidul de polimeri și un colector metalic plat, realizat dintr-o placă de cupru. Materialul din care se realizează fibrele este amestecat într-un recipient de forma unei seringi, iar tensiunea electrică se aplică printr-un conductor de cupru. Un jet de material polimeric este directionat de la recipient la colector datorită diferenței de potențial.

Dezavantajul acestui procedeu constă în dificultatea realizării unor structuri precise, de calitate constantă, datorită dificultăților de dirijare și orientare a jetului pe colectorul metalic.

US 2004013873 A1 prezintă un procedeu de obținere prin *electrospinning* de fibre poroase cu diametrul de la 20 la 4000 nm, cu pori în formă de canale care se extind spre axa fibrelor. Procedeu de obținere a fibrelor utilizează o soluție ce conține cel puțin un polimer solubil în apă și un polimer insolubil în apă. Prin electrospinning, într-un câmp electric de 105 V/m, se transferă 3...20% din soluția cu polimeri într-un solvent sau amestec de solvenți organici volatili.

US 2004076661 A1 prezintă o metodă de obținere prin *electrospinning* de articole fibroase biodegradabile și/sau bioabsorbabile cu utilizări medicale. Metoda vizează reducerea adeziunilor între țesut și materialul fibros prin utilizarea unei membrane formată din straturi de material compozit din fibre biodegradabile și/sau bioabsorbabile. Fibrele conțin cel puțin un agent medicamentos care determină vindecarea țesutului printr-o absorbție controlată.

Dezavantajul acestor procedee constă în dificultatea realizării unor structuri de susținere celulară, având forme plane cu caracteristici geometrice specifice țesuturilor artificiale sau grefelor complexe sau a cu pereți subțiri.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția propusă este de a produce structuri de susținere celulară, realizate din materiale compozite fibroase cu caracteristici adecvate creșterii de țesuturi artificiale, printr-un procedeu rapid, simplu, eficient și care oferă o calitate

RO 127534 B1

1 constantă (repetitivă) a structurilor realizate, structuri care să ofere facilități în privind
creșterea țesuturilor artificiale sau a grefelor complexe, în special a celor cu pereți subțiri.

3 Rezolvarea problemei propuse conduce la o soluție complexă cu referire la
procedeul, instalația și materiale compozite realizate.

5 Materialul compozit pentru realizarea structurilor de susținere celulară destinate ingi-
neriei țesuturilor, obținut prin *electrospinning*, din soluții diluate de polimeri bioresorbabili pe
7 bază de polidioxanona și acid polilactic, conform invenției, este alcătuit dintr-o armătură din
fire de sutură din PDO, în aranjament plan unidirecțional sau multidirecțional, înglobată într-o
9 matrice din microfibre de PLA, sub formă de textil nețesut, depuse prin electrospinning pe
cele două fețe ale armăturii, porozitatea matricei fiind de peste 80%.

11 Procedeul de realizare a structurilor de susținere celulară, destinate ingineriei
țesuturilor, conform invenției, constă în următoarele operații:

13 1. realizarea unei rețele plane, din fire de sutură bioresorbabile, obținută prin ampla-
sarea unidirecțională, bidirecțională sau țesută a firelor, pe un colector din oțel inoxidabil
15 austenitic, având pe margini o rețea de fante care permit confecționarea rețelei;

17 2. fixarea colectorului pe instalația de *electrospinning* și reglarea distanței dintre vârful
acului seringii și colector în funcție de mărimea structurii și caracteristicile urmărite;

19 3. rotirea acestuia cu o turație cuprinsă între 100 și 200 de rotații pe minut;

21 4. reglarea unei tensiuni între acul seringii și colector cuprinsă între 20 și 50 KV și
programarea unui debit al pompei pentru seringi cuprins între 0.05 și 0.1 ml/min;

23 5. realizarea primei etape de *electrospinning* prin injectarea constantă a materialului
până la obținerea structurii dorite;

25 6. oprirea instalației, desprinderea materialului de pe colector și întoarcerea acestuia
cu față în jos;

27 7. realizarea celei de-a doua etape de *electrospinning*;

29 8. oprirea instalației și preluarea materialului compozit de pe colector;

31 9. modelarea materialului compozit pentru a obține o structură forma și dimensiunile
dorite; dacă se dorește realizarea de structuri tubulare, materialul se rulează pe un șablon
cilindric și se lipește cu același polimer din care s-a confecționat matricea.

33 Instalația de realizare a structurilor de susținere celulară, destinate ingineriei țesutu-
rilor, conform invenției, se compune dintr-un dispozitiv de depunere prin rotație (*spin-coater*),
pe axul căruia se așază un colector din oțel inoxidabil, dintr-o pompă pentru seringi cu care
se injectează soluția din care se realizează materialul compozit și dintr-un generator de
35 înaltă tensiune. Borna „+” a generatorului se leagă la acul seringii cu o bucsă de cupru iar
colectorul este legat la masă prin intermediul unei role de cupru apăsată cu un arc.

37 Se prezintă un exemplu de realizare a invenției, în legătură cu fig. 1...9, care
reprezintă:

39 - fig. 1, schema instalației de *electrospinning*;

- fig. 2, colectorul cu forma pătrată;

41 - fig. 3, detaliu A din fig. 2;

- fig. 4, colectorul cu forma octogonală;

43 - fig. 5, detaliu B din fig. 4;

- fig. 6, material compozit cu fire unidirecționale;

45 - fig. 7, material compozit cu fire bidirecționale;

- fig. 8, structura matricei PLA;

- fig. 9, tub realizat din compozit bidirecțional.

RO 127534 B1

Instalația de <i>electrospinning</i> se compune dintr-un <i>spin-coater</i> 1, pe care se așază un	1
colector 2, dintr-o pompa pentru seringi 3 cu o seringă 4 și dintr-un generator 5, de înaltă	
tensiune. Colectorul 2 se fixează pe axul dispozitivului de rotație, cu ajutorul unei pompe de	3
vid 6 și al unor garnituri 7.	
Colectorul 2 se leagă la masă 8 cu o rolă 9.	5
Borna „+” a generatorului se leagă la acul 10 al seringii 4 prin intermediul unei role	
de cupru 11.	7
Debitul programat la pompa pentru seringi 4 este între 0.05 și 0.1 ml/min. Turația	
axului poate fi crescută cu accelerație programată, fixându-se între 100 și 200 rot/min, timpul	9
de rotație fiind între 90 și 800 s.	
Distanța H dintre vârful acului 10 și colectorul 2 este reglabilă, între 5 și 8 cm, dar pe	11
baza acestei soluții tehnice, pot fi construite și alte variante tipodimensionale.	
Într-un exemplu de realizare, colectorul 2, confecționat din tablă de oțel inoxidabil	13
austenitic, are o formă pătrată (fig. 2). Pe margini prezintă o rețea de fante de 0.5 mm gro-	
sime și 1 mm adâncime, aflate la distanțe „D” între 1 și 2 mm. Pe aceste fante se constru-	15
iește un aranjament unidirecțional sau bidirecțional (două direcții perpendiculare) de fire de	
sătură bioresorbabile. În cazul aranjamentelor bidirecționale, firele nu sunt țesute, ci simplu	17
așezate. Fixarea lor se realizează prin lipire cu matricea, după <i>electrospinning</i> . Firele de	
sătură bioresorbabile pot fi naturale (de tip colagenic) sau sintetice (polidioxanona sau	19
poliesteri), cu diametre între 0.02 și 0.1 mm (dimensiuni USP între 10 și 5).	
În alte exemple de realizare, colectorul 2 poate avea forma unui octogon (fig. 4) sau	21
a unui cerc. Colectorul de formă octogonală oferă avantaje privind aranjarea sa pe platoul	
rotativ. Toate cele opt muchii ale colectorului prezintă decupări triunghiulare, realizate cu pas	23
constant, pe toată lungimea lor. Muchiile notate cu V prezintă niște fante triunghiulare cu	
unghiul la vârf de 60° și la unghi de 30 față de axa y-y. Fantele de pe fețele V, destinate	25
realizării unui aranjament de fire paralele cu axa y-y, sunt amplasate una față de alta la	
distanța D, cuprinsă între 1 și 2 mm. Fantele de pe fețele H, destinate realizării unui aranja-	27
ment de fire paralele cu axa x-x, sunt realizate în mod similar cu cele de pe fețele V. Toate	
fantele sunt prevăzute cu raze de racordare R cu valoarea de 0.2...0.3 mm și au adâncimea	29
de 1 mm față de latura octogonului.	
În seringă se introduc soluții diluate de polimeri bioresorbabili sintetici (de exemplu	31
7% PLA în cloroform). Prin <i>electrospinning</i> , se obțin microfibre, sub formă de textil nețesut,	
care se depun pe structura din fire de sutură. După încheierea primei etape de <i>electrospinning</i> ,	33
compozitul rezultat este desprins de pe colector și întors cu fața în jos. Urmează o a doua	
etapă de <i>electrospinning</i> , rezultând un compozit cu două straturi de microfibre sub formă de	35
textil nețesut, între care este fixat aranjamentul de fire de sutură.	
În cazul în care se dorește realizarea de structuri tubulare, compozitele produse după	37
procesul descris anterior se rulează pe un șablon cilindric și se lipesc cu același polimer din	
care s-a confecționat matricea, în stare dizolvată. Prin orientarea axei de rulare față de	39
direcția (direcțiile) firelor de armare, se poate controla comportamentul mecanic al tuburilor	
compozite.	41
Se prezintă un exemplu de compozit PLA - PDO obținut prin metoda propusă. Firele	
din PDO au fost cu diametrul de 0.1 mm și plasate pe colector în aranjament unidirecțional	43
(fig. 6) sau bidirecțional (fig. 7), ambele cu distanță D = 1 mm. Soluția de PLA a avut concen-	
trația de 7%. Parametrii de lucru au fost: tensiune - 30 kV, debit - 0,04 ml/min, timp - 700 s.	45
Amândouă probele prezentate au fost realizate cu depunere pe ambele fețe, în urma	
înțoarcerii pe colector. Firele sunt bine ancorate de matrice. Structura acesteia este alcătuită	47

RO 127534 B1

1 din fire cu grosime medie de 2.3 μm , cu multiple picături solidificate (fig. 8). Porozitatea ma-
tricei, în cazul probelor prezentate, este de 80.63%. Cu membrana compozită din fig. 7 s-a
3 realizat un tub cu diametrul de 2.5 mm (fig. 9) utilizabil pentru dezvoltarea unităților
organoide intestinale.

5 Prezenta invenție se poate aplica în ingineria țesuturilor, pentru creșterea de țesuturi
artificiale sau grefe complexe, pornind de la celulele pacienților sau de la unități organoide.
7 Metoda propusă de fabricație a structurilor de susținere celulară (*scaffolds*) asigură o reali-
zare mai ușoară și cu rezultate mai repetitive decât majoritatea metodelor utilizate până în
9 prezent. În plus, se pretează la realizarea structurilor tubulare cu pereți subțiri, spre
deosebire de celelalte metode de fabricație de *scaffolds* 3D. Materialele compozite realizate
11 conform invenției își pot păstra rezistența mecanică necesară, chiar dacă procesul de
bioeroziune al matricei este avansat. Această proprietate este necesară în cazul creșterii
13 unităților organoide în *scaffolds* 3D. Metoda de fabricație se poate dezvolta și pentru alte
tipuri de structuri de susținere celulară.

RO 127534 B1

Revendicări

1. Material compozit pentru realizarea structurilor de susținere celulară destinate ingineriei țesuturilor, obținut prin *electrospinning*, din soluții diluate de polimeri bioresorbabili pe bază de polidioxanonă și acid polilactic, **caracterizat prin aceea că** este alcătuit dintr-o armătură din fire de sutură din PDO, în aranjament plan unidirecțional sau multidirecțional, înglobată într-o matrice din microfibre de PLA, sub formă de textil nețesut, depuse prin *electrospinning* pe cele două fețe ale armăturii. 3 5 7
2. Element tubular din material compozit pentru structurile de susținere celulară destinate ingineriei țesuturilor, conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** se obține prin rularea materialului compozit pe un șablon cilindric, urmată de lipirea pe generatoare cu același polimer din care s-au produs microfibrele matricei, în stare dizolvată, caracteristicile mecanice ale elementului tubular fiind controlate prin orientarea axei de rulare față de direcția fibrelor de armare. 9 11 13
3. Procedeu de realizare a materialului compozit pentru obținerea structurilor de susținere celulară destinate ingineriei țesuturilor, conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** presupune următoarea succesiune de operații: 15 17
- realizarea unei rețele plane de armare, de formă unidirecțională, bidirecțională sau țesută, obținută prin trecerea unor fire de sutură bioresorbabile prin fantele de pe laturile colectorului; 19
 - fixarea colectorului pe instalația de *electrospinning* și reglarea distanței dintre vârful acului seringii și colector în funcție de mărimea structurii și caracteristicile urmărite; 21
 - rotirea acestuia cu o turație cuprinsă între 100 și 200 de rotații pe minut; 23
 - reglarea unei tensiuni între acul seringii și colector cuprinsă între 20 și 50 KV și programarea unui debit al pompei pentru seringi cuprins între 0.05 și 0.1 ml/min; 25
 - realizarea primei etape de *electrospinning* prin injectarea constantă a materialului până la obținerea structurii dorite; 27
 - oprirea instalației, desprinderea materialului de pe colector și întoarcerea acestuia cu față în jos; 29
 - realizarea celei de-a doua etape de *electrospinning* până la înglobarea completă a constituentului de armare; 31
 - oprirea instalației și preluarea materialului compozit de pe colector. 33
4. Instalație pentru aplicarea procedurii de realizare a materialului compozit pentru obținerea structurilor compozite de susținere celulară destinate ingineriei țesuturilor, conform revendicării 3, conținând un generator (5) de înaltă tensiune legat la o seringă (4) acționată de o pompă pentru seringi care injectează microfibre pe un colector (2), **caracterizată prin aceea că** borna „+” a generatorului (5) se leagă la acul (10) seringii (4) prin intermediul unei role de cupru (11), iar colectorul (2) este fixat pe axul dispozitivului de rotație, cu ajutorul unei pompe de vid (6) și al unor garnituri (7) și se leagă la masă (8) cu o rolă (9). 35 37 39
5. Instalație pentru aplicarea procedurii de realizare a materialului compozit pentru obținerea structurilor compozite de susținere celulară destinate ingineriei țesuturilor, conform revendicării 4, **caracterizată prin aceea că**, pentru a permite formarea unui aranjament uniform, unidirecțional sau bidirecțional de fire de sutură bioresorbabile, utilizează un colector (2) realizat din oțel inoxidabil austenitic, de formă pătrată, având pe margini o rețea de fante de 0.5 mm grosime și 1 mm adâncime, practicate la un pas „D” cuprins între 1 și 2 mm. 41 43 45

RO 127534 B1

1 6. Instalație pentru aplicarea procedurii de realizare a materialului compozit pentru
obținerea structurilor compozite de susținere celulară destinate ingineriei țesuturilor, conform
3 revendicării 4, **caracterizată prin aceea că**, pentru a oferi avantaje privind aranjarea colec-
torului pe platoul rotativ și pentru a permite formarea unor aranjamente uniforme,
5 unidirecțional sau multidirecționale de fire de sutură bioresorbabile, colectorul (2) din oțel
inoxidabil austenitic are formă octogonală, având pe laturi o rețea de fante triunghiulare prac-
7 ticate la un pas „D” cuprins între 1 și 2 mm, fantele având unghiul la vârf de 60°, adâncimea
de 1 mm față de latura octogonului și raze de racordare R cu valoarea de 0.2...0.3 mm, fan-
9 tele de pe laturile (V) fiind practicate la un unghi de 30° față de axa y-y, iar fantele de pe laturile
(H) fiind practicate la un unghi de 30° față de axa x-x.

(51) Int.Cl.
D01D 5/00 (2006.01);
D01F 1/09 (2006.01);
D01H 4/24 (2006.01);
A61K 9/70 (2006.01)

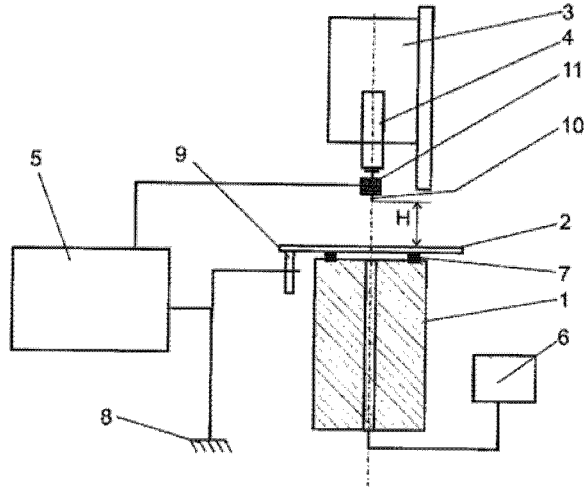


Fig. 1

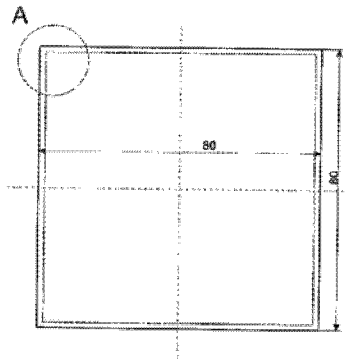


Fig. 2

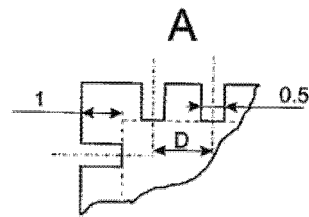


Fig. 3

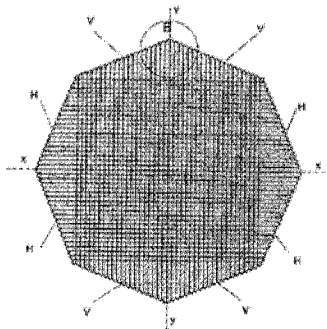


Fig. 4

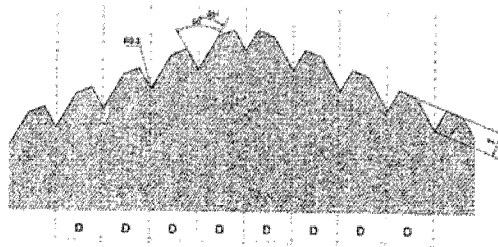


Fig. 5

(51) Int.Cl.

D01D 5/00 (2006.01);

D01F 1/09 (2006.01);

D01H 4/24 (2006.01);

A61K 9/70 (2006.01)



Fig. 6

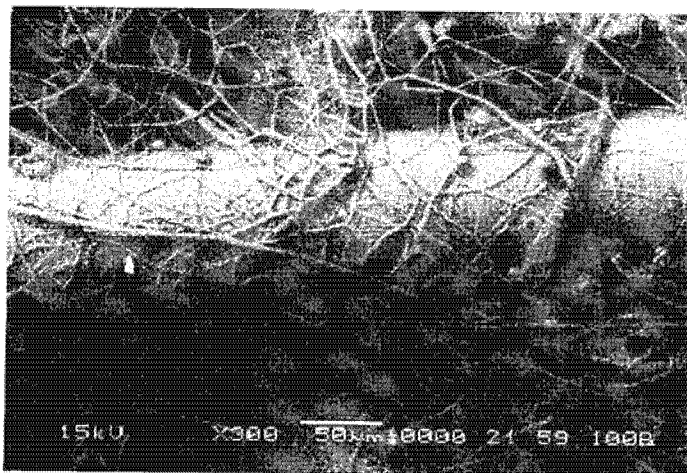


Fig. 7

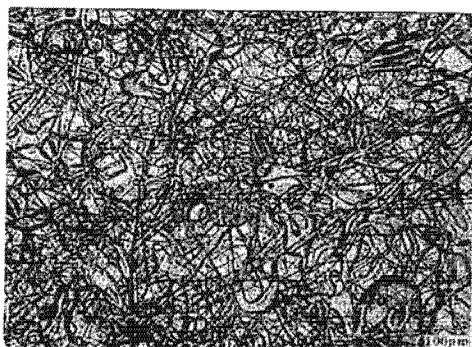


Fig. 8



Fig. 9



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM
Tipărit la: Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci
sub comanda nr. 1163/2013