



(12)

## CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2011 01263**

(22) Data de depozit: **29.11.2011**

(41) Data publicării cererii:  
**30.08.2013** BOPI nr. **8/2013**

(71) Solicitant:  
• **INSTITUTUL NAȚIONAL DE  
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU  
CHIMIE ȘI PETROCHIMIE - ICECHIM,  
SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR.202,  
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO**

(72) Inventatori:  
• **DIMONIE OLGA DOINA AFINA,  
ALEEA BAI A DE ARIEȘ NR.2, BL.7, AP.2,  
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;**  
• **TRANDAFIR INNA GEORGETA,  
STR. PAMFIL NĂSTASE NR. 53, BL. 29,  
AP. 14, SECTORUL 2, BUCUREȘTI, B, RO;**  
• **NICOLAE CRISTIAN ANDI,  
CALEA CRÂNGAȘI NR. 14, BL. 40, SC. A,  
ET. 5, AP. 17, SECTORUL 6, BUCUREȘTI,  
B, RO;**

• **GABOR AUGUSTA RALUCA,  
SAT FUNDENI, DOBROIEȘTI, IF, RO;**  
• **CONSTANTIN VIRGIL, STR.TULNICI  
NR.10, BL.40, SC.2, ET.2, AP.72,  
SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO;**  
• **PETRACHE MARIUS, STR. LAURILOR  
NR. 2, BL. 35A, SC. C, ET. 4, AP. 59,  
PLOIEȘTI, PH, RO;**  
• **CIMPEAN ANIȘOARA,  
STR. ILEANA COSÂNZEANA NR. 10,  
BL. P7, SC. 3, ET. 3, AP. 78, SECTOR 5,  
BUCUREȘTI, B, RO;**  
• **GĂLĂȚEANU BIANCA, STR. HUEDIN NR.  
11, BL. 11, SC. 2, ET. 2, AP. 79,  
SECTORUL 4, BUCUREȘTI, B, RO;**  
• **COSTACHE MARIETA, STR. TELIȚA  
NR. 12, BL. 56, SC. 4, ET. 1, AP. 46,  
BUCUREȘTI, B, RO**

(54) **COMPOZIȚIE ȘI PROCEDEU PENTRU OBTINEREA UNOR  
HIDROGELURI DESTINATE REGENERĂRII ȚESUTULUI  
ADIPOS**

(57) Rezumat:

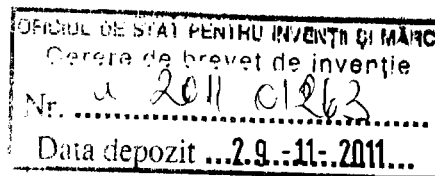
Invenția se referă la o compoziție și la un procedeu de obținere a unor hidrogeluri pe bază de polimeri naturali, destinată regenerării țesutului adipos. Compoziția conform invenției rezultă în urma unei reacții de reticulare ionică a unei soluții 0, 5...2, 5% alginat de sodiu, eventual, în care au fost introduse celule stem, cu soluție de gluconat de sodiu care are o concentrație de 7...11g/l ioni de calciu. Procedeu conform invenției constă în aceea că ionii reticulați vin în contact cu polimerul prin difuzie controlată, ca

urmare a trecerii soluției acestora printr-un mediu cu porozitate controlată, iar reticularea are loc în condiții de incubare la temperatura de 37°C, în atmosferă umedă, cu 5% CO<sub>2</sub>, timp de 3...4 h, după care hidrogelul conținând celule rezultat se spală cu ser fiziologic și se acoperă cu mediu de cultură specific tipului celular utilizat.

Revendicări: 4  
Figuri: 4

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





## COMPOZITIE SI PROCEDEU PENTRU OBTINEREA UNOR HIDROGELURI DESTINATE REGENERARII TESUTULUI ADIPOS

### DESCRIERE

Inventia se refera la o compozitie si la un procedeu de obtinere a unor hidrogeluri destinate regenerarii tesutului adipos.

Hidrogelurile se pot prepara pe baza de polimeri naturali si / sau sintetici. Hidrogelurile derivate din polimeri naturali au fost frecvent utilizati in medicina reparatorie datorita proprietatilor lor similare cu cele ale ECM natural [1,2 ]

Hidrogelurie pe baza de compusi macromoleculari (naturali si sintetici) poseda o serie de proprietati care fac posibila utilizarea ca suporturi in ingineria tesuturilor. Proprietatile se refera la: continutul ridicat de apa, similar tesuturilor, capacitatea de a incapsula in mod omogen celule, un eficient transfer de masa si o minima actiune invaziva. Hidrogelurile inalt hidratate pot mima foarte bine proprietatile fizice si chimice ale matricei extracelulare (ECM). Proprietatile fizice ale multor tipuri de hidrogeluri sunt usor de manipulat [1 - 3]. Din motivele enumerate mai sus rezulta ca hidrogelurile reprezinta un mediu ideal pentru suportul, proliferarea si diferentierea [3, 4, 5].

Biomaterialele naturale manifesta o excelenta bioactivitate datorita prezentei in structura lor a componentilor ECM. Cu toate acestea hidrogelurile provenite din polimeri naturali sufera o rapida degradare dupa contactul cu mediul sau cu fluidele corpului. Din aceste motive, o strategie care pare foarte atractiva este incorporarea speciilor bioactive ( ex. celule, factori de crestere, peptide sau proteine) intr-un matrial sintetic, rezultand un hidrogel suport biomimetic avand functii bioactive pentru un raspuns celular optim. Polimerii naturali reprezentativi sunt: colagenul, gelatina, chitosanul, acidul hialuronic, agaroză, alginatul, fibrina, poli-L - lizina.

Polimerii sintetici sunt atractivi pentru obtinerea hidrogelurilor destinate ingineriei reparative a tesuturilor, datorita proprietatilor lor fizice si chimice , care in mod specific sunt mult mai controlabile si mai reproductibile decat cele ale polimerilor naturali. Comparate cu hidrogelurile polimerilor naturali, hidrogelurile polimerilor sintetici, ofera un control mai bun asupra arhitecturii matricei si compozitiei chimice, dar in acelasi timp au o mai mica eficacitate biologica.

In scopul realizarii de hidrogeluri **se cunoaste o compozitie si un procedeu** conform caruia se obtine un hidrogel care este pe baza de carboximetil celuloza sodica si care este destinat eliberarii controlate de indometacin [6 ].

In scopul realizarii de hidrogeluri se mai cunoaste o compozitie conform careia hidrogelul este de tip compozit pe baza de colagen, copolymer pe baza de anhidrida maleica / stiren sau acetat de vinil sau acrilonitril sau metacrilat sau acid acrylic etc [7]. Aceasta compozitie prezinta dezavantajul ca nu este destinat regenerarii tesutului adipos.



În scopul obținerii de hidrogeluri se mai cunoaște un procedeu pe baza de celuloza și xantan [8]. Acest procedeu prezintă dezavantajul că este destinat utilizării în domeniul farmaceutic (eliberare controlată de medicamente) și medical fără a se revendica un domeniu.

Se mai cunoaște o compoziție conform căreia se obține un material nanostructurat pe baza de nanoparticule magnetice și hidrogel pe baza de chitosan și acid hialuronic [9]. Compoziția prezintă dezavantajul că nu se folosește pentru regenerarea țesutului adipos.

Se mai cunoaște un hidrogel care se folosește pentru tratarea rănilor și care se bazează pe o compoziție formată dintr-un alcool polyvalent, un polimer natural ales dintre collagen, gelatin, pectin, un copolymer sintetic și agenți de reticulare de tipul chelaților metalici [10]. Dezavantajul acestui hidrogel este că nu se folosește la regenerarea țesutului adipos.

**Problema tehnică** pe care o rezolvă invenția constă în realizarea unor hidrogeluri pe baza de polimeri naturali care sunt destinate regenerării țesutului adipos.

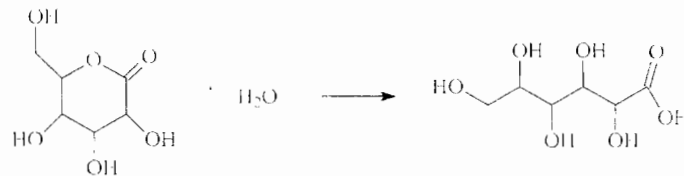
Hidrogelurile realizabile conform invenției înlătură dezavantajele procedeeilor cunoscute prin aceea că se obțin prin reticularea unei soluții de (0,5 – 3) % alginate de sodium în apă cu un exces de gluconat de sodium iar reticulantul vine în contact cu polimerul din soluție prin difuzie.

Compoziție și procedeu pentru realizarea unor hidrogeluri destinate regenerării țesutului adipos **prezintă următoarele avantaje:**

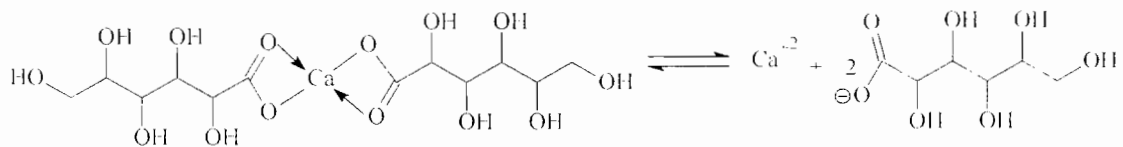
- Hidrogelurile au fost astfel concepute încât timpul de reticulare să nu fie mai mic decât cel necesar înglobării celulelor;
- Hidrogelurile au proprietăți de utilizare (modulul dinamo – mecanic de stocare, modulul dinamo – mecanic de pierdere, consistența, ..... ) adecvate utilizării pentru regenerarea țesutului adipos;
- Dimensiunea ochiurilor care definesc celula elementară a hidrogelurilor este de 100 – 600 μm și de aceea permit creșterea și proliferarea celulară;
- Hidrogelurile au consistență care permite manipulare în timpul testelor in vitro, circulația nutrienților la celule și care asigură celulelor spațiu suficient de proliferare;
- Hidrogelurile au moduli elastici de la 600 Pa la 8000 kPa și moduli de pierdere de la 100 Pa la 1000 Pa.
- Hidrogelurile sunt biocompatibile, lipsite de toxicitate, modelabile pe baza unor proceduri diverse, în multe tipuri de structuri reticulate, ușor accesibile, și au un preț de cost mai scăzut decât hidrogelurile realizate din cei mai mulți polimeri biodegradabili naturali;
- Hidrogelurile au aspect corespunzător dacă se realizează în condiții de temperatură și agitare prestabilite prin brevet;
- Hidrogelurile au proprietăți elastice și consistență necesară scoaterii cu ușurință din godeurile placilor utilizate pentru testări in vitro;
- Hidrogelurile nu sunt citotoxice, au timp de gelificare de 30 min. – 72 ore, au un conținut de apă de 98 %, sunt stabile în timp, în condiții de solicitare dinamică, la temperatura testării in vitro de 37 °C cca. 21 zile;
- Hidrogelurile au morfologie uniformă și proprietăți foarte bune de transport masă și se pot steriliza prin filtrare și/sau cu radiații UV și se folosesc cu succes la proliferarea celulelor stem provenite din țesutul adipos; Gelificarea hidrogelului se produce în prezența cationilor bivalenți de Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Sr<sup>2+</sup>, Ba<sup>2+</sup> care interacționează cu grupurile carboxyl ale unităților de acid glucuronic formând punți ionice.



Gelurile de alginat folosite pentru încapsulări se realizează în mod obișnuit prin picurarea unei soluții de alginat într-o baie cu soluție de  $\text{CaCl}_2$ . Principalul dezavantaj al acestui sistem este viteză foarte mare a reacției de gelificare care din aceasta cauza devine, practic, imposibil de controlat. Rezultă un gel cu structură neuniformă, rigidă, și dificil de modelat. Scaderea vitezei de reacție în limite dorite, se poate realiza prin controlul concentrației de ioni de Ca. Ideea de baza este înlocuirea  $\text{CaCl}_2$ , total disociată în mediu apos, cu o alta combinație de Ca care disociază parțial (gluconatul de Ca). Practic se pornește de la glucono delta lactona și carbonat de calciu (insolubil în apă) în condițiile de lucru (temperatura camerei, mediu apos) glucono lactona hidrolizează încet la acid gluconic.



Acidul gluconic reacționează cu carbonatul de calciu formând gluconatul de calciu. Gluconatul de calciu are structura unui complex chelat parțial disociat la echilibru.



Echilibrul este lent și mult deplasat spre stanga (forma nedisociată).

#### Exemplul 1

Într-o placă biologică cu 24 de godeuri, se introduce în fiecare godeu câte 1 ml soluție 1% alginat de sodiu în apă mili-Q. Alginatul de sodiu este provenit din alge brune și are masa moleculară medie. Pe suprafața soluției de alginat de sodiu din fiecare godeu se așază câte o rondelă de hartie de filtru banda albastră, umectată cu soluție de gluconat de calciu 95g / 1000 ml uz farmaceutic ZENTIVA. Peste hartie se adaugă 1 ml soluție gluconat de calciu. Placa biologică se introduce în etuva la temperatura de 37 °C timp 2 ore. Hidrogelul rezultat are proprietăți conforme cu tabelul 1.

Tabelul 1

Proprietate, Um Metoda de determinare	Valoare
1. Modul de stocare, kPa, masuratori DMA	5800
2. Modul de pierderi, kPa, masuratori DMA	670
3. Dimensiunea medie a ochiurilor, μm, morfologie SEM	100 - 300
4. Capacitate de gonflare, %	50 %
5. Aspect dezvoltare psittu Chimie și Petrochimie	Cfm. fig. 1



Exemplul 2

Se prepara solutie 1, 5% alginat de sodiu in ser fiziologic de uz medical in care se introduc celule stem derivate din tesutul adipos uman astfel incat sa rezulte o concentratie de  $7 \cdot 10^5$  celule / ml. Alginatul de sodiu este provenit din alge brune si are masa moleculara medie. Intr-o placa biologica se introduce in fiecare din cele 24 de godeuri, 1 ml. solutie de alginat cu celule stem. Pe suprafata solutiei de alginat de sodiu din fiecare godeu se aseaza cate o rondela de hartie de filtru banda albastra, umectata cu solutie de gluconat de calciu 95g / 1000 ml uz farmaceutic ZENTIVA. Peste hartie se adauga 1 ml solutie gluconat de calciu. Placa biologica se introduce in incubator cu 5 % CO<sub>2</sub>, atmosfera umeda, la temperatura de 37 °C, timp 1 ore. Se aspira apoi gluconatul de calciu nereactionat, se spala hidrogelul cu ser fiziologic si se acopera cu mediu de cultura specific tipului celular utilizat. Hidrogelul rezultat are proprietati conforme cu tabelul 2

Tabelul 2

Proprietate, Um	Metoda de determinare	Valoare
1.	Modul de stocare, kPa, masuratori DMA	7800
2.	Modul de pierderi, kPa, masuratori DMA	540
3.	Dimensiunea medie a ochiurilor <sup>8</sup> , μm, morfologie SEM	100 - 500
4.	Capacitate de gonflare, %. [(Masa hidr.gonflat - masa hidrogelul uscat) / masa hidrogonflat] * 100	48
5.	Aspect	Cfm. Fig.2
6.	Capacitate de proliferare celulara.	Cfm.fig.4

<sup>3</sup> Cfm.fig.3



## COMPOZITIE SI PROCEDEU PENTRU OBTINEREA UNOR HIDROGELURI DESTINATE REGENERARII TESUTULUI ADIPOS

### REVENDICARI

1. Compozitie si procedeu pentru obtinerea unor hidrogeluri destinate regenerarii tesutului adipos caracterizata prin aceea ca se prepara solutie de (0.5 – 2, 5)% alginat de sodiu in ser fiziologic sau apa mili – Q, in care se introduc celule stem derivate din tesutul adipos uman astfel incat sa rezulte o concentratie de  $5 * 10^4 - 7 * 10^5$  celule / ml. Se introduce in fiecare din godeurile unei placi biologice cate 1 ml. solutie de alginat cu celule stem in concentratia dorita. Pe suprafata solutiei de alginat de sodiu din fiecare godeu se aseaza cate o rondela de hartie de filtru. Peste hartie se adauga 1 ml solutie gluconat de calciu. Placa biologica se introduce in incubator cu 5 % CO<sub>2</sub>, atmosfera umeda, la temperatura de 37 °C, timp 1 ore dupa care se aspira gluconatul de calciu nereactionat, se spala hidrogelul cu ser fiziologic si se acopera cu mediu de cultura specific tipului celular utilizat. Dupa 21 de zile se estimeaza capacitatea de proliferare celulara.
2. Compozitie conform revendicarii 1 caracterizat prin aceea ca alginatul de sodiu este provenit din alge brune si are masa moleculara medie:
3. Compozitie conform revendicarii 1 caracterizata prin aceea ca hartia de filtru este tip banda albastra:
4. Compozitie conform revendicarii 1 caracterizata prin aceea ca solutie de gluconat de calciu 95g / 1000 ml.



# COMPOZITIE SI PROCEDEU PENTRU OBTINEREA UNOR HIDROGELURI DESTINATE REGENERARII TESUTULUI ADIPOS

## FIGURI

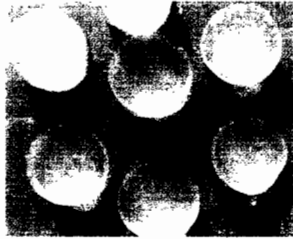


Fig.nr.1

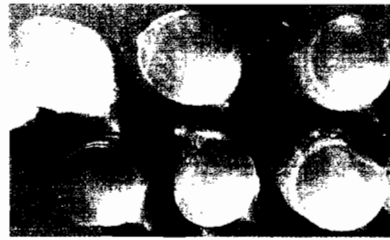


Fig.nr.2

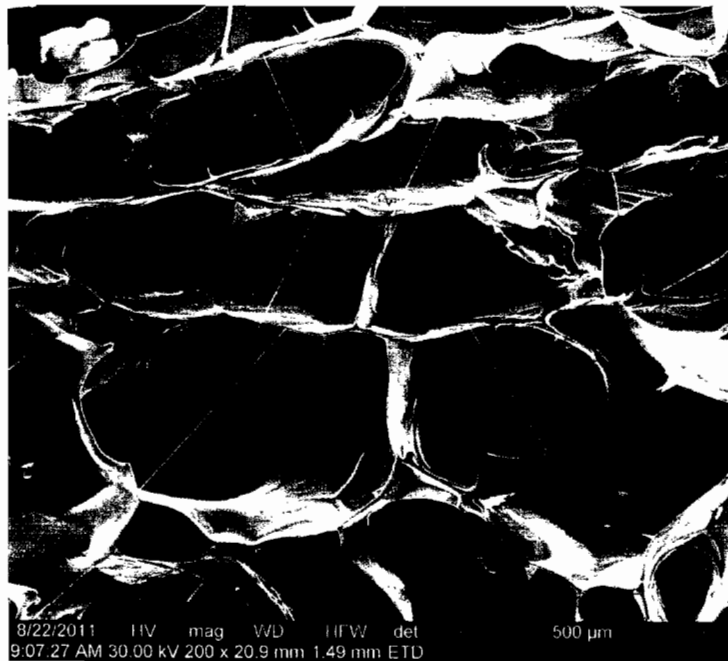


Fig.3



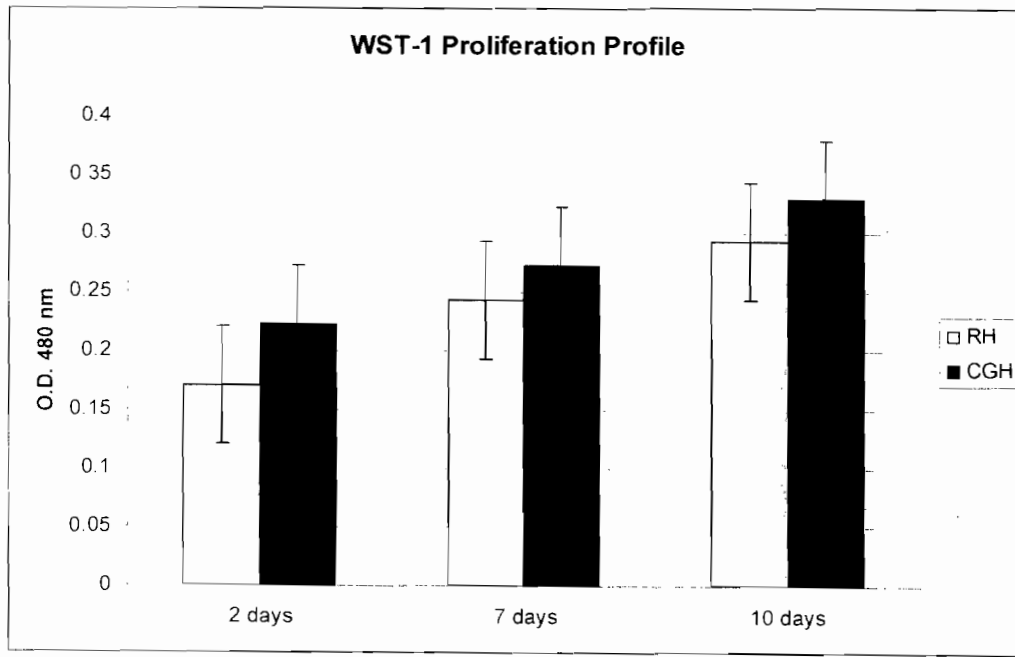


Fig.4

