



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2012 00997**

(22) Data de depozit: **11/12/2012**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30/08/2018** BOPI nr. **8/2018**

(41) Data publicării cererii:
30/06/2014 BOPI nr. **6/2014**

(73) Titular:
• **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.SERG.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, COMUNA DOBROEȘTI, IF,
RO;**
• **PETRACHE MARIUS, STR.LAURILOR
NR.2, BL.35 A, SC.C, ET.4, AP.59,
PLOIEȘTI, PH, RO;**
• **ANTON LILIANA RODICA ELENA,
BD.RÂMNICU SĂRAT NR.29, BL.11 A1,
SC.B, ET.6, AP.72, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **DINESCU SORINA, BD. 1 DECEMBRIE
1918, NR. 45, BL. J41, AP. 81, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **COSTACHE MARIETA, STR.TELIȚA
NR.12, BL.56, SC.4, ET.1, AP.46,
SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO**

(56) Documente din stadiul tehnicii:
RO 122181 B1; RO 123143 B1

(54) **COMPOZIȚIE ȘI PROCEDEU PENTRU OBTINEREA
UNOR HIDROGELURI pH ȘI TERMOSENZITIVE DESTINATE
INGINERIEI TISULARE**



RO 129557 B1

1 Invenția se referă la un procedeu pentru obținerea unor hidrogeluri destinate ingineriei tisulare, inclusiv de tip regenerativ, și la o compoziție obținută prin acest procedeu.

3 În scopul realizării unor hidrogeluri, se cunoaște din **RO 123275 B1**, un procedeu de realizare a unei compoziții de hidrogel care se poate utiliza în domeniul farmaceutic, cosmetic și alimentar. Compoziția respectivă este constituită dintr-un amestec format din 5 60...95% xantan și 5...40% lignină din plante sau rășină lignin-epoxidică, reticulat cu epiclorhidrină. 7 Procedeu constă în reticularea, în mediul apos, cu pH bazic, a unui amestec format din xantan și lignină sau rășină lignin-epoxidică cu epiclorhidrină, la o temperatură de 80°C, 9 timp de 8 h, cu obținerea unui gel supraabsorbant. Compoziția și procedeu conform invenției prezintă dezavantajul că hidrogelurile rezultate nu sunt de tip pH și termosensitive și nu se 11 folosesc în ingineria tisulară.

13 În domeniu se mai cunoaște un procedeu de obținere a unui hidrogel care rezultă dintr-o compoziție formată din indometacin, hidroxid de sodiu, carboximetilceluloza sodică, glicerina, alcool izopropilic, propilenglicol, alcool etilic și apă distilată, din **RO 122393 B1**. 15 Procedeu de obținere a acestui hidrogel are următoarele etape de lucru: solubilizarea indometacinului în soluție de hidroxid de sodiu 10%, într-un amestec de alcooli. Compoziția și 17 procedeu conform invenției prezintă dezavantajul că hidrogelurile rezultate nu sunt de tip pH și termosensitive și nu se folosesc în ingineria tisulară.

19 În domeniu se mai cunoaște din **RO 122181 B1**, o compoziție care este realizată din carbocromer, colagen, elastină alfa sau k sub formă de peptide solubile, glicozaminoglicani 21 selectați dintre condroitin sulfat, dermatan sulfat sau acid hialuronic, extract alcoolice de *Equisetum arvense*, extract alcoolice de *Achillea millefolium*, nipagin, nipasol, apă distilată. 23 Compoziția și procedeu descrise prezintă dezavantajul că hidrogelurile rezultate nu sunt de tip pH și termosensitive.

25 De asemenea, brevetul **RO 112991 B1** prezintă o compoziție alcătuită dintr-un medicament, un aditiv care asigură penetrarea apei în preparat (polietilen glicol) și polimer pentru 27 formarea hidrogelului (polietilen oxid). Hidrogelul rezultat se folosește pentru eliberarea controlată de medicamente. Compoziția și procedeu conform invenției prezintă dezavantajul 29 că hidrogelurile rezultate nu sunt de tip pH și termosensitive și nu se folosesc în ingineria tisulară.

31 De asemenea, în domeniu se mai cunoaște, din **RO 123143 B1**, o compoziție care este constituită dintr-un amestec de monomeri conținând un ester hidrofil al acidului (met) 33 acrilic, un alchil (met) acrilat în care grupa alchil conține cel puțin 4 atomi de carbon, un monomer de reticulare și un diluat înlocuibil cu apă, duce la formarea gelului fasonat, după 35 care diluantul este înlocuit cu apă. Compoziția și procedeu conform invenției prezintă dezavantajul că hidrogelurile rezultate nu sunt de tip pH și termosensitive și nu se folosesc în 37 ingineria tisulară. Procedeu se bazează pe amestecarea unui alomorf de celuloză cu xantan, nemodificate sau dizolvate în prealabil la temperaturi scăzute de până la -30°C, adăugarea 39 unei soluții de NaOH și epiclorhidrină, sub agitare continuă, cu obținerea unei paste care se depune între două plăcuțe de sticlă și care se usucă la 80°C, timp de 6 h, urmată de spălarea 41 hidrogelurilor obținute, cu apă distilată, apoi cu acetonă, după care, în final, se usucă în etuva de vid, la temperatura camerei. Compoziția și procedeu descris prezintă dezavantajul 43 că hidrogelurile rezultate nu sunt de tip pH și termosensitive și nu se folosesc în ingineria tisulară.

45 În scopul realizării de hidrogeluri se mai cunoaște un procedeu din care rezultă hidrogeluri reticulate care se folosesc pentru tratarea rănilor dintr-o compoziție formată dintr-un 47 alcool polivalent sau amestecuri de alcooli, gelatină, pectină colagen sau amestecurile lor sau amestec de gelatină - alginat de sodiu și acid acrilic, acid metacrilic sau alți acizi și

RO 129557 B1

agenți de reticulare de tipul chelaților. Compoziția și procedeul conform invenției prezintă dezavantajul că hidrogelurile rezultate nu sunt de tip pH și termosensitive și nu se folosesc în ingineria tisulară. 1
3

De asemenea, în **RO 112883 B1** este descrisă o compoziție formată dintr-un hidrolizat de colagen, un copolimer de anhidridă maleică și un alt comonomer ales între stiren, acetat de vinil, metil metacrilat, acid acrilic etc., glicerină, apă. Acest hidrogel este destinat pentru realizarea unor suprafețe vegetale naturale, pe terenuri aride și din zone deșertice, temporare sau permanente. Compoziția și procedeul conform invenției prezintă dezavantajul că hidrogelurile rezultate nu sunt de tip pH și termosensitive și au alte aplicații decât cele medicale. 5
7
9

Chitosanul este o biopoliaminozaharidă liniară și este al doilea cel mai răspândit biopolimer după celuloză. Are o structură cationică, rezultă din deacetilarea parțială a chitinei și conține unități de glucozamină și N-acetilglucozamină. Această structură este similară glicozaminoglicanilor naturali (GAG) și, din acest motiv, polimerul are o bioactivitate extrem de ridicată. Chitosanul poate fi metabolizat de enzimele umane, cum este "lisozima". Datorită biocompatibilității, biodegradabilității, caracterului său imunogen scăzut și naturii sale cationice, chitosanul a fost investigat pentru mai multe aplicații în domeniul ingineriei țesuturilor. Se cunosc polimeri care, în soluții apoase, suportă tranziții de fază induse de valoarea temperaturii sau de valoarea pH -lui. O astfel de tranziție este schimbarea bruscă de solubilitate ca răspuns la creșterea temperaturii mediului. La această temperatură, procesul de hidratare al polimerului, prin formarea legăturilor de hidrogel între apă și polimer, devine nefavorabil în comparație cu interacțiunile polimer-polimer, apă-apă. O tranziție bruscă are loc când macromoleculele solvate din soluția apoasă se deshidratează rapid și de aceea se transformă în structuri mai hidrofobe, care se separă sub formă de gel. 11
13
15
17
19
21
23

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția este prezentarea unui procedeu pentru realizarea unor hidrogeluri pH și termosensitive, destinate ingineriei tisulare inclusiv de tip regenerativ. 25
27

Procedeu conform invenției înlătură dezavantajele de mai sus prin aceea că chitosanul se solubilizează în soluții apoase acide cu pH de 1...5,86, după care se neutralizează cu cantități prestabilite de complecși polioliici bazici, dizolvați sau nu în apă bidistilată sau soluții tampon, asociați sau nu cu săruri regăsite în mediile de cultură celulară, folosite în cantități care conduc la un pH al soluției polimerice rezultate din intervalul 6,9...7,4 specific creșterii și dezvoltării celulare, suspensiile rezultate sunt menținute în repaus 24 h, timp în care chitosanul se dizolvă complet, obținându-se o soluție slab gălbuie și viscozitate dependentă de concentrația acidului, și se încălzește la 50...70°C, timp de 3...6 h, apoi se centrifughează la 3000 rpm timp de 20 min, la temperatura ambiantă obținându-se o soluție limpede care se neutralizează cu pompexi polioli bazici asociați cu cantități prestabilite de săruri, astfel încât pH -ul soluției este 6,9...7,4, specific creșterii și dezvoltării celulare, la temperaturi de 0...4°C, urmată de dezaerare prin ultrasonare, timp de 15...30 min, la o temperatură în intervalul 0...4°C; amestecul rezultat se pipetează în godeurile unei plăci biologice și se introduce în incubator la 37°C, timp de 3...30 h, iar discurile astfel obținute se spală cu apă deionizată timp de 15...30 min, apoi, în vederea liofilizării, sunt înghețate la -20°C, menținându-se timp de 20...24 h, după care se liofilizează în două etape, prima etapă de 4 h la -20°C, iar a doua etapă, timp de 20...24 h, la -40°C, obținându-se discuri de hidrogel cu un grad de hidratare și o porozitate dorite. 29
31
33
35
37
39
41
43
45

Prin aplicarea invenției se obțin următoarele avantaje:

- hidrogelurile nu sunt citotoxice și au proprietăți mecanice care permit utilizarea în ingineria tisulară în domenii care necesită consistența variabilă, de la situația în care hidrogelurile nu sunt miscibile cu mediul de cultură, până la cea în care acestea se pot manipula manual. Acest domeniu de valori pentru consistență asigură o bună circulație a nutrienților, către celule, și a produșilor secretați de celule care trebuie eliminați; 47
49
51

RO 129557 B1

1 - consistența hidrogelurilor poate fi reglată în funcție de caracteristicile impuse de
domeniul ingineriei tisulare în care se folosește fiecare tip, în baza raportului dintre sarea
3 neutralizantă a polimerului protonat și cantitatea de polimer din soluție. Se realizează astfel
hidrogeluri pentru diverse tipuri de aplicații;

5 - microarhitectura porilor hidrogelurilor este de tip interconectat, cu pori sferici și
dimensiuni relativ apropiate ceea ce conferă un caracter omogen morfologiei acestor
7 suporturi 3-D.

Procedeele se bazează pe controlul balanței hidrofil-hidrofob și a energiei libere de
9 amestecare a unor soluții acide de chitosan care conduc la structuri 3-D cu morfologii și pro-
prietăți de creștere celulară optime pentru ingineria tisulară. Hidrogelurile conform invenției
11 înlătură dezavantajele procedeelelor cunoscute prin aceea că se obțin în urma unei tranziții
sol-gel a unor soluții de chitosan protonat ce are loc în condiții fiziologice, adică 37°C,
13 pH = 6,9...7,4, timp de 24 h. Chitosanul care se poate folosi conform brevetului are grad de
deacetilare variabil de 75, 90, 93, iar protonarea se realizează prin dizolvarea acestuia în
15 soluții acide. În acest scop, se adaugă, sub agitare continuă până la dizolvarea completă,
o cantitate prestabilită de polimer, într-o cantitate prestabilită de soluție cu pH acid de
17 1...5,86. Suspensia rezultată prin adăugarea polimerului se lasă în repaus 24 h, timp în care
chitosanul se dizolvă complet cu formarea unei soluții slab gălbuie și cu viscozitatea depen-
19 dentă de concentrația acidului. După solubilizarea polimerului, soluția rezultată se centri-
fughează la 3000 rot/min timp de 20 min, la temperatura mediului ambiant, pentru eliminarea
21 componentelor polimerici sau nepolimerici mic moleculari. Soluțiile acide în care se dizolvă
chitosanul au concentrația de 0,04...0,13 N acid anorganic (HCl) sau organic (Acid acetic),
23 de preferință acid organic. În faza următoare de lucru, soluția polimerică rezultată este
neutralizată cu cantități prestabilite de pomplexi poliolici bazici, asociați sau nu cu cantități
25 prestabilite de săruri care se regăsesc în mediile de cultură celulară, astfel încât pH-ul
soluției să se plaseze în intervalul 6,9...7,4. Neutralizarea se realizează la temperaturi din
27 intervalul 0...4°C, prin adăugare, sub agitare, a complecșilor neutralizanți, dizolvați sau nu
în cantități prestabilite de apă sau soluții tampon. După dizolvarea completă a complecșilor
29 neutralizanți, amestecul rezultat este dezaerat prin ultrasonare, timp de 15...30 min, la tem-
peraturi din intervalul 0...4°C. Amestecul de reactanți astfel preparat se pipetează în
31 godeurile unor plăci biologice, după care acestea se introduc în incubator la 37°C, timp de
3...30 h. Hidrogelurile sub astfel rezultate au formă de disc (fig. 1), iar după obținere se spală
33 cu apă deionizată timp de 15...30 min, după care, în vederea liofilizării, se îngheață la -20°C,
unde se păstrează 20...24 h, apoi se liofilizează în două etape, prima timp de 4 h la -20°C,
35 iar a doua, timp de 20...24 h la -40°C.

În continuare, se prezintă 2 exemple de realizare a invenției:

37 Exemplul 1

Pentru obținerea soluției de chitosan 1,5% în acid acetic 0,05 N se prepară mai întâi
39 soluția de acid acetic 0,05 N prin diluarea acidului acetic glacial cu apa distilată, după care
se cântăresc 1,5 g chitosan cu 75% grade de deacetilare care se adaugă în 100 ml soluție
41 acid acetic 0,05 N sub agitare continuă, până la completa înglobare a chitosanului. Suspen-
sia obținută se lasă în repaus 24 h, timp în care chitosanul se dizolvă complet și se obține
43 o soluție slab gălbuie, vâscoasă, cu pH 5,86 și concentrația de 1,5%, care se centrifughează
pentru îndepărtarea componentelor mic moleculari. Într-un pahar de lucru plasat în baie de
45 gheață se introduce 50 ml soluție de chitosan. Se cântăresc 3,75 g β-glicero-fosfat de sodiu
pentahidrat, care se păstrează pe baie de gheață. Când soluția de chitosan are temperatura
47 cuprinsă între 0...4°C, sub agitare, se adaugă β-glicero-fosfat, în porții mici, fără a se adăuga
o porție dacă precedentă nu s-a dizolvat complet. Rezultă un amestec de reacție cu pH-ul

RO 129557 B1

7,09. În faza următoare, amestecul de reacție se dezaerează prin ultrasonare, menținând vasul cu acest amestec în baie de gheață la temperaturi cuprinse între 0...4°C, timp de 15 min. După dezaerare, hidrogelul se introduce în plăci cu 24 godeuri prin pipetare. Se pipetează câte 2 ml hidrogel în fiecare godeu. Plăcile se introduc în incubator la T = 37°C pentru aproximativ 24 h. După formare, hidrogelul este spălat cu apă bidistilată timp de 15...30 min, apoi înghețat la -18°C, unde se păstrează 24 h. Este liofilizat apoi, în prima fază, timp de 4 h la -20°C, iar în a doua fază, timp de 20...24 h la -40°C. Rezultă hidrogeluri sub formă de disc cu pori de 50...100 μm, grad de hidratare de 83...87%, porozitate de 84...86%, morfologii omogene (fig. 2), 2000...2200 kPa modul de stocare și 55...60 N/m rigiditate.

Exemplul 2

Se obține o soluție de chitosan 2,5% în acid acetic 0,1 N prin prepararea în prima etapă a unei soluții de acid acetic 0,1 N prin diluarea acidului acetic glacial. Se cântăresc apoi 2,5 g chitosan cu 75% grade de deacetilare Sigma, care se adaugă în 100 ml soluție acid acetic 0,1 N sub agitare continuă până la completa înglobare a polimerului. Suspensia obținută se lasă în repaus 24 h, timp în care chitosanul se dizolvă complet și se obține o soluție limpede slab gălbuie, vâscoasă, cu pH-ul 5,2. Se cântăresc 0,105 g β-glicero-fosfat de sodiu pentahidrat Sigma și 0,020 g hidrogenocarbonat de sodiu care se mojarază bine. Într-un pahar de lucru plasat în baie de gheață se introduc 10 ml soluție de chitosan (0,25 g chitosan). β-glicero-fosfatul și hidrogenocarbonatul de sodiu se păstrează pe baie de gheață. Când soluția de chitosan are temperatura cuprinsă între 0...4°C, sub agitare, se adaugă β-glicero-fosfat, în porții mici; nu se adaugă următoarea porție până când precedentă nu este complet dizolvată. Adăugarea β-glicero-fosfatului trebuie să se realizeze în 10...15 min. După completa dizolvare a β-glicero-fosfatului, se adaugă hidrogenocarbonatul de sodiu. După completa dizolvare a hidrogenocarbonatului de sodiu, amestecul de reacție are pH-ul 7,2. Acest amestec se pipetează în godeurile unei plăci prin pipetare, iar plăcile se introduc în etuvă la T = 37°C, unde se păstrează 20...24 h. După formare, hidrogelul este spălat cu apă bidistilată timp de 15...30 min, apoi înghețat la -18°C, unde se păstrează 24 h. Este liofilizat apoi, în prima fază, timp de 4 h la -20°C, iar în a doua fază, timp de 20...24 h la -40°C. Rezultă hidrogeluri sub formă de disc cu pori de 70...100 μm, grad de hidratare de 85...87% și porozitate de 84...87%.

RO 129557 B1

Revendicări

1

3

1. Procedeu pentru obținerea unor hidrogeluri pH și termosensitive, **caracterizat prin aceea că** chitosanul se solubilizează în soluții apoase acide cu pH de 1...5,86, după care se neutralizează cu cantități prestabilite de complecși poliolici bazici, dizolvați sau nu în apă bidistilată sau soluții tampon, asociați sau nu cu săruri regăsite în mediile de cultură celulară, folosite în cantități care conduc la un pH al soluției polimerice rezultate din intervalul 6,9...7,4 specific creșterii și dezvoltării celulare, suspensiile rezultate sunt menținute în repaus 24 h, timp în care chitosanul se dizolvă complet, obținându-se o soluție slab gălbuie, cu o viscozitate dependentă de concentrația acidului, și se încălzește la 50...70°C, timp de 3...6 h, după care se centrifughează la 3000 rpm timp de 20 min, la temperatura ambiantă, obținându-se o soluție limpede care se neutralizează cu pompexi polioli bazici asociați cu cantități prestabilite de săruri, astfel încât pH-ul soluției este 6,9...7,4, specific creșterii și dezvoltării celulare, la temperaturi de 0...4°C, urmată de dezaerare prin ultrasonare, timp de 15...30 min, la o temperatură în intervalul 0...4°C; amestecul rezultat se pipetează în godeurile unei plăci biologice și se introduce în incubator la 37°C, timp de 3...30 h, iar discurile astfel obținute se spală cu apă deionizată timp de 15...30 min, apoi, în vederea liofilizării, sunt înghețate la -20°C, menținându-se timp de 20...24 h, după care se liofilizează în două etape, prima etapă de 4 h la -20°C, iar a doua etapă, timp de 20...24 h la -40°C, obținându-se discuri de hidrogel cu un grad de hidratare și o porozitate dorite.

21

2. Procedeu conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** chitosanul poate avea grad de deacetilare 75...80, 90 sau 93, de preferință 75...80, iar soluțiile polimerice au concentrația de 1...3%, de preferință 1,5...1,75.

23

25

3. Procedeu conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** solubilizarea chitosanului are loc prin protonare, în soluții acide cu concentrația de 0,04...0,12 N, de preferință 0,04...0,06 N, și cu pH 1...5,86, realizate cu acizi anorganici sau organici, de preferință acizi organici.

27

29

4. Procedeu conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că**, în scopul neutralizării soluțiilor de chitosan protonat, pentru realizarea unui pH de 6,9...7,4, se folosesc complecși poliolici bazici de tipul β -glicero-fosfatului, în cantități de 2...10 ori mai mari decât cantitatea de polimer din soluție, care se pot asocia sau nu cu săruri regăsite în mediile de cultură celulară de tipul fosfatului disodic sau bicarbonatului de sodiu, în așa fel încât pH-ul soluției de chitosan să nu iasă din domeniul specific creșterii celulare.

31

33

5. Compoziție de hidrogeluri pH și termosensitive obținută prin procedeul definit în revendicarea 1.

35

(51) Int.Cl.
C08J 3/03 (2006.01),
A61K 31/722 (2006.01)

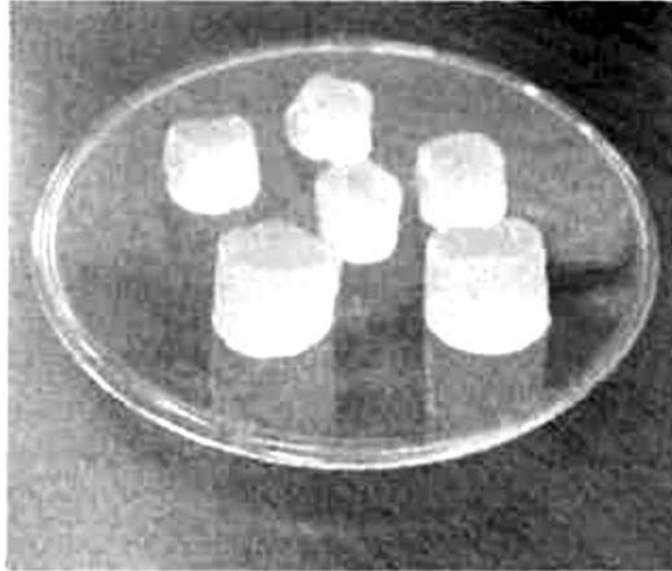


Fig. 1

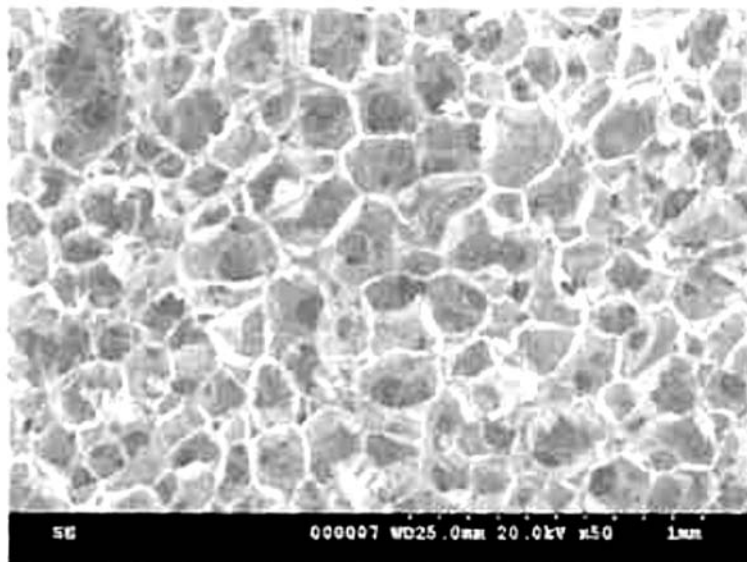


Fig. 2



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM
Tipărit la: Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci
sub comanda nr. 381/2018