



(12) **CERERE DE BREVET DE INVENȚIE**

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

(22) Data de depozit: **11.12.2012**

(41) Data publicării cererii:
30.06.2014 BOPI nr. **6/2014**

(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;**
• **PETRACHE MARIUS, STR. LAURILOR
NR. 2, BL. 35A, SC. C, ET. 4, AP. 59,
PLOIEȘTI, PH, RO;**
• **ANTON LILIANA RODICA ELENA,
BD. RÂMNICU SĂRAT NR. 29, BL. 11A1,
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,
BUCUREȘTI, B, RO**

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

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu pentru obținerea unor hidrogeluri utilizate în ingineria tisulară. Procedeu conform invenției constă în realizarea unor soluții de concentrație prestabilă, prin solubilizarea chitosanului în soluții apoase acide, centrifugarea soluțiilor rezultate, neutralizarea până la un pH fiziologic, cu complecși polioliici eventual dizolvați în apă bidistilată sau săruri tampon, eventual asociați cu săruri care se regăsesc în mediile de cultură celulară, dezaerarea prin ultrasonare

a amestecului de reacție, pipetarea acestuia în godeurile unor plăci biologice, și reticularea în condiții fiziologice, spălarea și liofilizarea hidrogelurilor sub formă de disc astfel realizate având pori de 50...100 μm și o porozitate de 84...87%.

Revendicări: 5
Figuri: 2

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).



OFICIUL DE STAT PENTRU INVENTII SI MARCI
Cerere de brevet de invenție
Nr. a 212 00 997
Data depozit 11-12-2012

24

COMPOZITIE SI PROCEDEU PENTRU OBTINEREA UNOR HIDROGELURI pH si TERMOSENZITIVE DESTINATE INGINERIEI TISULARE

DESCRIERE

Inventia se refera la o compozitie si la un procedeu pentru obtinerea unor hidrogeluri destinate ingineriei tisulare inclusive de tip regenerative.

In scopul realizarii unor hidrogeluri se cunoaste un procedeu de realizare a unei compozitii de hidrogel[1] care se poate utiliza in domeniul farmaceutic, cosmetic si alimentar. Compozitia conform inventiei este constituita dintr-un amestec format din 60 – 95 % xantan si 5 – 40 % lignina din plante sau rasina lignin – epoxidica reticulat cu epiclorhidrina. Procedeu conform inventiei consta in reticularea, in mediul apos, cu pH bazic, a unui amestec format din xantan si lignina sau rasina lignin – epoxidica cu epiclorhidrina, la o temperatura de 80 °C, timp de 8 ore, cu obtinerea unui gel supraabsorbant. Compozitia si procedeu conform inventiei prezinta dezavantajul ca hidrogelurile rezultate nu sunt de tip pH si termosenzitive si nu se folosesc in ingineria tisulara.

In scopul realizarii unor hidrogeluri se mai cunoaste un procedeu de obtinere a unui hidrogel care rezulta dintr-o compozitie formata din indometacin, hidroxid de sodiu, carboximetilceluloza sodica, glicerina, alcool izopropilic, propilenglicol, alcool etilic si apa distilata[2]. Procedeu de obtinere a acestui hidrogel are urmatoarele etape de lucru: solubilizarea indometacinului in solutie de hidroxid de sodiu 10 % intr-un amestec de alcooli. Compozitia si procedeu conform inventiei prezinta dezavantajul ca hidrogelurile rezultate nu sunt de tip pH si termosenzitive si nu se folosesc in ingineria tisulara.

In scopul realizarii de hidrogeluri se mai cunoaste o compozitie care este realizata din carbocromer, colagen, elastina alfa sau k sub forma de peptide solubile, glicozaminoglicani selectati dintre condroitin sulfat, dermatan sulfat sau acid hialuronic, extract alcoolice de equisetum arvense, extract alcoolice de alchillea millefolium, nipagin, nipasol, apa distilata [3]. Compozitia si procedeu conform inventiei prezinta dezavantajul ca hidrogelurile rezultate nu sunt de tip pH si termosenzitive.

In scopul realizarii de hidrogeluri se mai cunoaste o compozitie alcatuita dintr-un medicament, un aditiv care asigura penetrarea apei in preparat (polietilen glicol) si polimer pentru formarea hidrogelului (polietilen oxid). Hidrogelul rezultat se foloseste pentru eliberarea controlata de medicamente [4]. Compozitia si procedeu conform inventiei prezinta dezavantajul ca hidrogelurile rezultate nu sunt de tip pH si termosenzitive si nu se folosesc in ingineria tisulara.

In scopul realizarii de hidrogeluri se mai cunoaste o compozitie care este constituita dintr-un amestec de monomeri continand un ester hidrofil al acidului (met) acrilic, un alchi (met) acrilat in care grupa alchil contine cel putin 4 atomi de carbon, un monomer de reticulare si un diluat inlocuibil cu apa, duce la formarea gelului fasonat, dupa care diluantul este inlocuit cu apa [5]. Compozitia si procedeu conform inventiei prezinta dezavantajul ca hidrogelurile rezultate nu sunt de tip pH si termosenzitive si nu se folosesc in ingineria tisulara.

In scopul realizarii de hidrogeluri se mai cunoaste un procedeu care se bazeaza pe amestecarea unui alomorf de celuloza cu xantan, nemodificate sau dizolvate in prealabil la temperaturi scazute de pana la -30°C , adaugarea unei solutii de NaOH si epiclorhidrina, sub agitare continua, cu obtinerea unei paste care se depune intre doua placute de sticla si care se usuca la 80°C , timp de 6 ore, urmata de spalarea hidrogelurilor obtinute, cu apa distilata, apoi cu acetona si, in final, se usuca in etuva de vid, la temperatura camerei [6]. Compozitia si procedeul conform inventiei prezinta dezavantajul ca hidrogelurile rezultate nu sunt de tip pH si termosensitive si nu se folosesc in ingineria tisulara.

In scopul realizarii de hidrogeluri se mai cunoaste un procedeu din care rezulta hidrogeluri reticulate care se folosesc pentru tratarea ranilor dintr-o compozitie formata din un alcool polivalent sau amestecuri de alcooli, gelatina, pectina collagen sau amestecurile lor sau amestec gelatina – alginat de sodiu si acid acrilic, acid metacrilic sau alti acizi si agenti de reticulare de tipul chelatilor. Compozitia si procedeul conform inventiei prezinta dezavantajul ca hidrogelurile rezultate nu sunt de tip pH si termosensitive si nu se folosesc in ingineria tisulara.

In scopul realizarii de hidrogeluri se mai cunoaste o compozitie formata dintr-un hidrolizat de collagen, un copolimer de anhidrida maleica si un alt comonomer ales intre stiren, acetat de vinil, metil metacrilat, acid acrilic etc., glicerina, apa. Acest hidrogel este destinat pentru realizarea unor suprafete vegetale naturale, pe terenuri aride si din zone desertice, temporare sau permanente[7]. Compozitia si procedeul conform inventiei prezinta dezavantajul ca hidrogelurile rezultate nu sunt de tip pH si termosensitive si au alte aplicatii decat medicale.

Chitosanul este o biopoliaminozaharida liniara si este al doilea cel mai raspandit biopolymer dupa celuloza. Are o structura cationica, rezulta din deacetilarea partiala a chitinei si contine unitati de glucozamina si N-acetilglucozamina. Aceasta structura este similara glicozaminoglicanilor naturali (GAG) si din acest motiv polimerului are o bioactivitate extrem de ridicata. Chitosanul poate fi metabolizat de enzimele umane cum este "lizoziima". Datorita biocompatibilitatii, biodegradabilitatii, a caracterului imunogen scazut si a naturii sale cationice, chitosanul a fost investigat pentru mai multe aplicatii in domeniul ingineriei tesuturilor. Se cunosc polimeri care in solutii apoase suporta tranzitii de faza induse de valoarea temperaturii sau de valoarea pH-ului. O astfel de tranzitie este schimbarea brusca de solubilitate ca raspuns la cresterea temperaturii mediului. La aceasta temperatura procesul de hidratare al polimerului prin formarea legaturilor de hidrogel intre apa si polimer, devine nefavorabil in comparatie cu interactiunile polimer – polimer, apa – apa. O tranzitie brusca are loc cand macromoleculele solvate din solutia apoasa se deshidrateaza rapid si de aceea se transforma in structuri mai hidrofobe care se separa sub forma de gel.

Problema tehnica pe care o rezolva inventia este aceea ca gaseste o compozitie si un procedeu pentru realizarea unor hidrogeluri pH si termosensitive destinate ingineriei tisulare inclusiv de tip regenerativ care se bazeaza pe controlul balantei hidrofil – hidrofob si a energiei libere de amestecare a unor solutii acide de chitosan care conduc la structuri 3 – D cu morfologii si proprietati de crestere celulara optime pentru ingineria tisulara. Hidrogelurile conform inventiei inlatura dezavantajele procedeelelor cunoscute prin aceea ca se obtin in urma unei tranzitii sol – gel a unor solutii de chitosan protonat care are loc in conditii fiziologice adica 37°C , pH = 6.9 – 7.4 timp de 24 ore. Chitosanul care se poate folosi conform brevetului are grad de deacetilare

variabil de 75, 90, 93 iar protonarea se realizeaza prin dizolvarea acestuia in solutii acide. In acest scop se adauga, sub agitare continua pana la completa dizolvare, o cantitate prestabilita de polimer, intr-o cantitate prestabilita de solutie cu pH acid de 1 – 5.86. Suspensia rezultata prin adaugarea polimerului se lasa in repaus 24 ore, timp in care chitosanul se dizolva complet cu formarea unei solutii slab galbui si vascozitatea dependenta de concentratia acidului. Dupa solubilizarea polimerului, solutia rezultata se centrifugheaza la 3000 rotatii / min. timp de 20 min., la temperatura mediului ambiant pentru eliminarea componentilor polimerici sau nepolimerici mic moleculari. Solutiile acide in care se dizolva chitosanul au concentratia de 0.04 – 0.13 N acid anorganic (HCl) sau organici (Acid acetic), de preferinta acid organic. In faza urmatoare de lucru solutia polimerica rezultata este neutralizata cu cantitati prestabilite de pomplexi poliolici bazici, asociati sau nu cu cantitati prestabilite de saruri care se regasesc in mediile de cultura celulara astfel incat pH solutiei sa se plaseze in intervalul 6.9 – 7.4. Neutralizarea se realizeaza la temperaturi din intervalul 0 – 4 °C, prin adaugare, sub agitare, a complexilor neutralizanti, dizolvati sau nu in cantitati prestabilite de apa sau solutii tampon. Dupa completa dizolvare a complexilor neutralizanti amestecul rezultat este dezaerat prin ultrasonare, timp de 15 – 30 min., la temperaturi din intervalul 0 – 4 °C. Amestecul de reactanti astfel preparat se pipeteaza in godeurile unor placi biologice, dupa care acestea se introduc in incubator la 37 °C, timp de 3 – 30 ore. Hidrogelurile sub astfel rezultate au forma de disc (Fig.1) si dupa obtinere se spala cu apa deionizata timp de 15 – 30 min. dupa care in vederea liofilizarii se ingheata la -20 °C unde se pastreaza 20 – 24 ore iar apoi se liofilizeaza in doua etape, prima timp de 4 ore la - 20 °C, iar a doua timp de 20 – 24 ore la - 40 °C.

Compozitia si procedeul pentru realizarea unor hidrogeluri PH si termosensitive destinate ingineriei tisulare inclusiv de tip regenerativ prezinta urmatoarele avantaje:

- Hidrogelurile nu sunt citotoxice si au proprietati mecanice care permit utilizarea in ingineria tisulara in domenii care necesita consistenta variabila, de la situatia in care hidrogelurile nu sunt miscibile cu mediul de cultura pana la cel in care acestea se pot manipula manual. Acest domeniu de valori pentru consistenta asigura o buna circulatie a nutrientilor catre celule si a produsilor secretati de celule care trebuie eliminati;
- Consistentia hidrogelurilor poate fi reglata in functie de caracteristicile impuse de domeniul ingineriei tisulare in care se foloseste fiecare tip in baza raportului dintre sarea neutralizanta a polimerului protonat si cantitatea de polimer din solutie. Se realizeaza astfel hidrogeluri pentru diverse tipuri de aplicatii;
- Microarhitectura porilor hidrogelurilor este de tip interconectat, cu pori sferici si dimensiuni relativ apropiate ceea ce confera un caracter omogen a morfologiei acestor suporturi 3 –D.

Exemplu 1

Pentru obtinerea solutiei de chitosan 1,5 % in acid acetic 0,05 N se prepara mai intai solutia de acid acetic 0,05 N prin diluarea acidului acetic glacial cu apa distilata dupa care se cantaresc 1,5 g chitosan cu 75 % grade de deacetilare care se adauga in 100 ml solutie acid acetic 0,05N sub agitare continua pana la completa inglobare a chitosanului. Suspensia obtinuta se lasa in repaus 24 h timp in care chitosanul se dizolva complet si se obtine o solutie slab galbuie, vascoasa cu pH 5,86 si concentratia de 1,5 % care se centrifugheaza pentru indepartarea componentilor mic moleculari. Intr-un pahar de lucru plasat in baie de gheata se introduce 50 ml solutie de chitosan. Se cantareste 3,75 g β -glicero-fosfat de sodiu pentahidrat care se pastreaza pe baie de gheata. Cand

solutia de chitosan are temperatura cuprinsa intre 0-4⁰ C, sub agitare, se adauga β -glicero-fosfat, in portii mici, fara a se adauga o portie daca precedenta nu s-a dizolvat complet. Rezulta un amestec de reactie cu pH-ul 7,09. In faza urmatoare amestecul de reactie se deaerareaza prin ultrasonare, mentinand vasul cu acest amestec in baie de gheata la temperaturi cuprinse intre: 0-4⁰ C timp de 15 minute. Dupa deaerare hidrogelul se introduce in placi cu 24 godeuri prin pipetare. Se pipeteaza cate 2 ml hidrogel in fiecare godeu. Placile se introduc in incubator la T =37⁰ C pentru aproximativ 24 ore. Dupa formare hidrogelul este spalcat cu apa bidistilata timp de 15 – 30 min., iar apoi inghetat la -18⁰C unde se pastreaza 24 ore. Este liofilizat apoi in prima faza, timp de 4 ore la - 20⁰C si in a doua faza la timp de 20 – 24 ore la - 40⁰C. Rezulta hidrogeluri sub forma de disc cu pori de 50 – 100 μ m, grad de hidratare de 83 – 87 %, porozitate de 84 – 86 %, morfologii omogene (Fig.2) si 2000 – 2200 kPa modul de stocare si 55 – 60 N/m rigiditate.

Exemplul 2

Se obtine o solutie de chitosan 2,5 % in acid acetic 0,1 N prin prepararea in prima etapa a unei solutia de acid acetic 0,1 N prin diluarea acidului acetic glacial. Se cantaresc apoi 2,5 g chitosan cu 75 % grade de deacetilare Sigma care se adauga in 100 ml solutie acid acetic 0,1 N sub agitare continua pana la completa inglobare a polimerului. Suspensia obtinuta se lasa in repaus 24 h, timp in care chitosanul se dizolva complet si se obtine o solutie limpede slab galbuie, vascoasa cu pH-ul 5.2 Se cantereste 0,105g g β -glicero-fosfat de sodiu pentahidrat Sigma si 0,020 g hidrogenocarbonat de sodiu care se mojarazeaza bine. Intr-un pahar de lucru plasat in baie de gheata se introduce 10 ml solutie de chitosan (0,25g chitosan). β -glicero-fosfatul si hidrogenocarbonat de sodiu se pastreaza pe baie de gheata. Cand solutia de chitosan are temperatura cuprinsa intre 0-4⁰ C, sub agitare, se adauga β -glicero-fosfat, in portii mici nu se adauga urmatoarea portie pana cand precedenta nu este complet dizolvata. Adaugarea β -glicero-fosfatul trebuie sa se realizeze in 10-15 minute. Dupa completa dizolvare a β -glicero-fosfatului se adauga hidrogenocarbonatul de sodiu. Dupa completa dizolvare a hidrogenocarbonatului de sodiu, amestecul de reactie are pH-ul 7.2. Acest amestec se pipeteaza in godeurile unei placi prin pipetare iar placile se introduc in etuva la T =37⁰ C unde se pastreaza 20 – 24 ore. Dupa formare hidrogelul este spalcat cu apa bidistilata timp de 15 – 30 min. iar apoi inghetat la -18⁰C unde se pastreaza 24 ore. Este liofilizat apoi in prima faza, timp de 4 ore la - 20⁰C si in a doua faza la timp de 20 – 24 ore la - 40⁰C. Rezulta hidrogeluri sub forma de disc cu pori de 70 – 100 μ m, grad de hidratare de 85 – 87 %, porozitate de 84 – 87 %, .

COMPOZITIE SI PROCEDEU PENTRU OBTINEREA UNOR HIDROGELURI pH si TERMOSENZITIVE

REVEDICARI

1. Compozitie pentru realizarea unor hidrogeluri pH si termosenzitive destinate ingineriei tisulare inclusiv de tip regenerativ in acord cu care chitosanul se solubilizeaza prin protonare in cantitati prestabilite in solutii acide cu pH de 1 – 5.86 dupa care se neutralizata cu cantitati prestabilite de complexi poliolici bazici, dizolvati sau nu in apa bidistilata sau solutii tampon, asociati sau nu cu saruri regasite in mediile de cultura celulara, folosite in cantitati care conduc la un pH al solutiei polimerice rezultate din intervalul 6.9 – 7.4 specific cresterii si dezvoltarii celulare.
2. Compozitie conform revendicarii 1 caracterizata prin aceea ca chitosanul poate avea grad de deacetilare 75 – 80 , 90 sau 93 de preferinta 75 – 80 iar solutiile polimerice folosite in procedeul conform inventiei au concentratia de 1 – 3 % , de preferinta 1.5 – 1.75;
3. Compozitie conform revendicarii 1 caracterizata prin aceea ca solubilizarea chitosanului are loc prin protonare, in solutii acide cu concentratia de 0.04 N – 0.12 N, de preferinta 0.04 – 0.06 N si cu pH 1 – 5.86, realizate cu acizi anorganici sau organici, de preferinta acizi organici.
4. Compozitie conform revendicarii 1 caracterizata prin aceea ca in scopul neutralizarii solutiilor de chitosan protonat, pentru realizarea unui pH de 6.9 – 7.4, de folosesc complexi poliolici bazici de tipul β glicero fosfatului in cantitati de 2 – 10 ori mai mari decat cantitatea de polimer din solutie. Acesti complexi se pot asocia sau nu cu saruri regasite in mediile de cultura celulare de tipul fosfatului disodic sau bicarbonatului de natriu in asa fel incat pH solutie de chitosan sa nu iasa din domeniul sopecific cresterii celulare.
5. Procedeul pentru realizarea unor hidrogeluri pH si termosenzitive conform caruia cantitati prestabilite de chitosan se adauga in cantitati prestabilite de solutii acide cu pH de 1 – 5.86. Suspensia rezultata adaugarea se lasa in repaus 24 ore, timp in care chitosanul se dizolva complet cu formarea unei solutii slab galbui si vascozitatea dependenta de concentratia acidului sau se incalzeste la 50 – 70 °C timp de 3 – 6 ore. Solutia polimerica rezultata se centrifugheaza la 3000 rpm, timp de 20 min. la temperatura mediului ambiant, operatie in urma careia aceasta devine limpede. In faza urmatoare aceasta este neutralizata cu cantitati prestabilite de pomplexi poliolici bazici, asociati sau nu cu cantitati prestabilite de saruri care se regasesc in mediile de cultura celulara astfel incat pH solutiei sa se plaseze in intervalul 6.9 – 7.4 specific cresterii si dezvoltarii celulare. Neutralizarea se realizeaza la temperaturi din intervalul 0 – 4 °C, prin adaugare, sub agitare, a complexilor neutralizanti, dizolvati sau nu in cantitati prestabilite de apa sau solutii tampon de tipul. Dupa completa dizolvare a complexilor neutralizanti amestecul rezultat este dezaerat prin ultrasonare, timp de 15 – 30 min., la T din intervalul 0 – 4 °C. Amestecul de reactanti astfel preparat se pipeteaza in godeurile unor placi biologice, dupa care acestea se introduc in incubator la 37 °C, timp de 3 – 30 ore. Hidrogelurile sub astfel rezultate au forma de disc si dupa obtinere se spala cu apa deionizata timp de 15 – 30 min. iar apoi in vederea liofilizarii se ingheata la -20 °C temperatura la care se pastreaza timp de 20 – 24 ore iar apoi se liofilizeaza in doua etape, prima timp de 4 ore la -20 °C iar a doua timp de 20 – 24 ore la -40 °C.

COMPOZITIE SI PROCEDEU PENTRU OBTINEREA UNOR HIDROGELURI pH si TERMOSENZITIVE

FIGURI

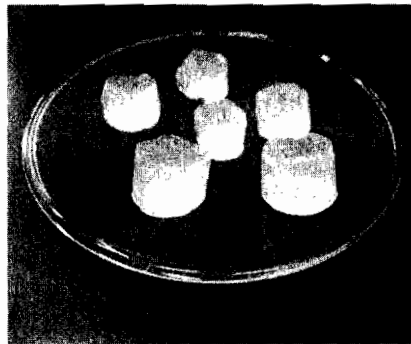


Fig.1

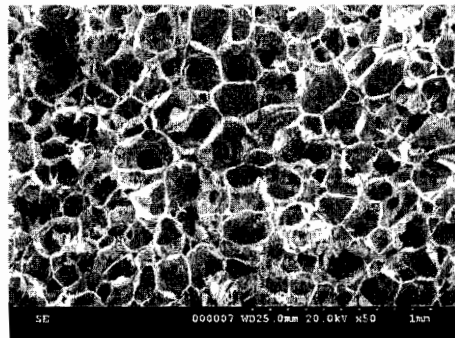


Fig.2