



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2013 00710

(22) Data de depozit: 27.09.2013

(41) Data publicării cererii:  
30.04.2015 BOPI nr. 4/2015

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

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

• PINTEALĂ MARIANA,  
STR. THEODOR VĂSCĂUȚEANU NR. 2,  
IAȘI, IS, RO;  
• MAIER VASILICA, STR.FĂNTĂNILOR  
NR.37, BL.B 2, ET.7, AP.69, IAȘI, IS, RO;  
• SIMIONESCU ANA-BOGDANA,  
STR. NICOLINA NR. 4A, BL. F4, ET. III,  
AP. 14, IAȘI, IS, RO

(54) **PROCEDEU PENTRU CONTROLUL CARACTERISTICILOR  
PARTICULELOR DE HIDROXIAPATITĂ SINTETIZATĂ ÎN  
PREZENȚA BIOMACROMOLECULELOR**

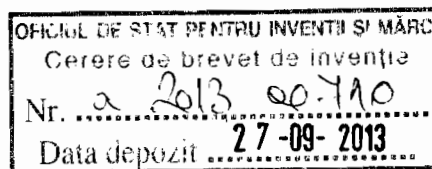
(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu pentru obținerea micro- și nanoparticulelor de hidroxiapatită individualizate sau în amestec intim cu bi macromolecule, destinate aplicațiilor biomedicale. Procedeu conform invenției constă în obținerea sării de calciu a bi macromoleculelor de tipul proteinelor și/sau polizaharidelor, sinteza cristalelor de hidroxiapatită în prezența unor adjuvanți

ai cristalizării, și, sub asistența câmpului electric aplicat din exteriorul mediului apos de reacție, în sistem capacitiv, separarea produsului de sinteză și post-procesarea acestuia.

Revendicări: 23





## **Procedeu pentru controlul caracteristicilor particulelor de hidroxiapatită sintetizată în prezența biomacromoleculilor**

**Invenția se referă la un procedeu pentru controlul caracteristicilor particulelor de hidroxiapatită sintetizată în prezența biomacromoleculilor, caracterizat prin aceea că asigură obținerea de micro- și nanoparticule de hidroxiapatită cu dimensiuni, geometrie, cristalinitate și compoziție de fază reproductibile, în contextul în care sinteza lor se conduce în condiții nederivante pentru biomacromoleculele prezente în sistemul de reacție (la temperaturi, pH-uri și tării ionice în plaja valorilor fiziologice). În virtutea caracteristicilor lor, dar și funcție de biomacromoleculele asociate (proteine, polizaharide, acizi nucleici și derivații biologic activi ai acestora), particulele obținute sunt apte încorporării în compoziții care chemo-, morfo- și bio-mimează țesutul osos, ori calusul osos. Sinteza particulelor în prezența biomacromoleculilor asigură asocierea intimă a celor două tipuri de componente (anorganică și organică), inclusiv prin nucleerea și creșterea fazei (nano)cristaline pe matricea macromoleculară, cu adecvarea dimensională la conformația spațială a acesteia din urmă, funcție de concentrația locală asigurată și de adjuvanții utilizați în sinteză. *Conform procedurii brevetat, controlul caracteristicilor particulelor de hidroxiapatită se realizează prin procedura de conducere a sintezei, precum și prin intermediul câmpului electric (electrostatic și / sau variabil) indus din exteriorul mediului de reacție. Particulele obținute conform procedurii brevetat, precum și compozițiile rezultate ca urmare a asocierii lor cu diverse biomacromolecule, sunt destinate aplicațiilor din domeniul ingineriei tisulare, medicinei reconstitutive și regenerative, chirurgiei plastice, farmaceuticii și cosmeticii farmaceutice, dar și transfecției osoase prin sisteme generate ex vivo pentru vehicularea informației genetice.***



În regnul animal, sărurile de calciu sunt frecvent regăsite la nivelul structurilor biomineralizate (schelete, exoschelete, cochilii etc.). Speciile animale inferioare recurg mai ales la carbonați polimorfi, în timp ce structurile biomineralizate ale cordatelor (animale cu schelet axial intern) conțin dominant fosfați ai calciului. În ambele cazuri însă, biomineralizarea implică formarea unor amestecuri complexe de specii cristaline și amorse, în prezența și cu concursul biomacromoleculilor. Acestea din urmă (mai ales scleroproteinele, dar și polizaharidele) sunt capabile să inițieze cristalizarea respectivelor săruri de calciu (nucleerea) și să intervină atât în procesele de creștere a cristalelor (inclusiv în adoptarea geometriei acestora), cât și în cele de reglare a rapoartelor cantitative între fazele cristaline și amorse ale mineralelor (Cölfen H., *Bio-inspired Mineralization Using Hydrophilic Polymers*, în: *Biomaterialization II – Mineralization Using Synthetic Polymers and Templates*, Editor: Naka K., Seria: *Topics in Current Chemistry*, vol. 271, Springer-Verlag, Berlin, 2007, p. 1-77).

Din punct de vedere chimic, fracția minerală din țesutul osos al cordatelor este un derivat al hidroxiapatitei, uzual numit bioapatită. Aceasta are o compoziție variabilă, care poate fi descrisă prin formula  $\text{Ca}_{10-x+y} \text{X}_y (\text{PO}_4)_{6-x} (\text{CO}_3)_x (\text{OH})_{2-x+y}$ , cu  $x = 0 \div 2$  și  $y = 0 \div 4$ . Comparativ cu hidroxiapatita ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})$ ), bioapatita include diverși ioni (uzual  $\text{F}^-$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , notați generic prin X), anioni carbonat ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) care substituie până la stoechiometrie ionii fosfat ( $\text{PO}_4^{3-}$ ), iar în plus poate fi nestoechiometrică în ceea ce privește ionii de calciu, unii dintre aceștia putând lipsi din rețeaua cristalină (fapt simbolizat prin cele două paranteze drepte, [ ], care indică poziții vacante în structura cristalină). Altfel spus, bioapatita este o hidroxiapatită calciu deficientă, slab cristalină ca urmare a defectelor de rețea, divers substituită cu anioni  $\text{CO}_3^{2-}$  și / sau  $\text{F}^-$  în defavoarea fosfatului sau hidroxilului, și / sau cu surplus de cationi metalici în defavoarea calciului. (Skinner H. C. W., *Biomaterials*. *Mineralogical Magazine* 69 (5), 2005, 621-641). Conținutul de  $\text{CO}_3^{2-}$  al bioapatitei poate ajunge până la circa 6 % masic și de regulă este proporțional acompaniat de fluor și de cationi metalici. Toate diferențele citate în comparație cu hidroxiapatita fac ca bioapatita să formeze domenii cristaline (cristalite) cu dimensiuni mici și geometrie disimetrică (circa 100 x 5 nm), favorabile însă depozitării intracelulare ori în matricea biomacromoleculară extracelulară (alcătuită preponderent din colagen tip I, în cazul scheletului cordatelor, sau din chitină, în cazul exoscheletului nevertebratelor). (Skinner H. C. W., Jahren A. H., *Biomaterialization*, în: *Treatise on Geochemistry*, vol. 8: *Biogeochemistry*, Editori: Holland H.D. și Turekian K. K., Elsevier, Oxford, 2007, 1-69.)

Deși chemo-mimarea bioapatitei poate fi realizată prin sinteză chimică (cel mai adesea în soluții apoase alcaline), morfo-mimarea caracteristicilor acesteia este dificilă. Dimensiunile domeniilor cristaline și disimetria (geometria) nanoparticulelor de bioapatită chemo-mimată acoperă o plajă largă de valori și sunt, în general, nereproductibile în masa de produs de sinteză, precum și de la o șarjă la alta. De regulă, prin chemo-mimare se obțin particule cu dimensiuni nano- și micro-metrice, având geometrie sferoidală sau elipsoidală, mult diferită de cea planară a bioapatitei. Respectivul particule reprezintă agregate constituite din domenii cristaline și domenii amorfe. Compoziția chimică a domeniilor cristaline (numite și cristalite) este tipică hidroxiapatitei calciu deficiente controlat substituită. Domeniile amorfe sunt alcătuite din diverși fosfați de calciu. Atunci când aceste din urmă domenii predomină, aplicațiile particulelor obținute se limitează la cimenturile de uz ortopedic și stomatologic. Dacă raportul cristalin / amorf este echilibrat sau ușor supraunitar, devine posibilă realizarea de compozite injectabile mixte, anorganic-organice, alături de compuși macromoleculari și modulatori ai metabolismului celular, cu aplicații în refacerea osoasă ghidată. Dacă însă se vizează aplicații evaluate de inginerie tisulară (cum ar fi biomimarea calusului osos, ori realizarea *ex-vivo* a unor ansambluri spațiale cultivate cu celule), sau de transfecție osoasă mediată de vectori genetici non-virali, bio-mimarea bioapatitei devine esențială, implicând și morfo-mimarea caracteristicilor acesteia.

**Din literatura de specialitate și din cea de brevete, este cunoscut faptul că** (nano)particule de hidroxiapatită și derivați ai acesteia divers substituiți, asimilabili bioapatitei, cu aplicații biomedicale, se pot obține prin: (i) **procesarea fizico-chimică a pieselor de os recoltate de la bovine** (US 5167961, EP 1338291, US 20080206299), (ii) **tehnica mecano-chimică** (Nakamura S., Isobe T., Senna M, *Hydroxyapatite nano sol prepared via a mechanochemical route*, Journal of Nanoparticle Research 3, 2001, 57-61), (iii) **coprecipitarea controlată pornind de la săruri de calciu, fosfor și eventual alte specii chimice anorganice** (RO 125817, US 8287914, EP 1855991), (iv) **tehnica sol-gel, în mediu neapos** (Agrawal K., Singh G., Puri D., Prakash S., *Synthesis and Characterization of Hydroxyapatite Powder by Sol-Gel Method for Biomedical Application*, Journal of Minerals & Materials Characterization & Engineering, 10 (8), 2011, 727-734), (v) **sinteza pe substrat microstructurat** (template synthesis) (Nguyen N. K., Leoni M., Maniglio D., Migliaresi C., *Hydroxyapatite nanorods: Soft-template synthesis, characterization and preliminary in vitro tests*, Journal of Biomaterials Applications, 28(1), 2013, 49-61; Salimi E., Javadpour J., Anbia, M, *Template-Based Synthesis of Nanoporous Hydroxyapatite*, International Scholarly

Research Network - Ceramics, 2012, doi:10.5402/2012/960915; Wang Y., Zhang S., Wei K., Zhao M., Chen J., Wang X., *Hydrothermal synthesis of hydroxyapatite nanopowders using cationic surfactant as a template*, Materials Letters, 60 (12), 2006, 1484-1487), (vi) **sinteza în prezența compușilor (bio)chimici mic-moleculari** (Song R.-Q., Colfen H., *Additive controlled crystallization*, CrystEngComm, 13. 2011, 1249-1276), (vii) **sinteza în prezența compușilor (bio)macromoleculari** (Gajjeraman S., Narayanan K., Hao J., Qin C., George A., *Matrix Macromolecules in Hard Tissues Control the Nucleation and Hierarchical Assembly of Hydroxyapatite*, The Journal of Biological Chemistry, 282 (2), 2007, 1193-1204; Kikuchi M., Ikoma T., Itoh S., Matsumoto H. N., Koyama Y., Takakuda K., Shinomiya K., Tanaka J., *Biomimetic synthesis of bone-like nanocomposites using the self-organization mechanism of hydroxyapatite and collagen*, Composites Science and Technology, 64 (6), 2004, 819-825; Tampieri A., Giancarlo C., Landi E., Sandri M., Roveri N., Falini G., *Biologically inspired synthesis of bone-like composite: Self-assembled collagen fibers / hydroxyapatite nanocrystals*, Journal of Biomedical Materials Research, 67A, 2 (11), 2003, 618-625; Pelin I. M., Maier S. S., Chițanu G. C., Bulacovschi V., *Preparation and characterization of a hydroxyapatite-collagen composite as component for injectable bone substitute*, Materials Science and Engineering: C, 29 (7), 2009, 2188-2194; Ficai A., Andronescu E., Voicu G., Ghițulică C., Vasile B. S., Ficai D., Trandafir V., *Self-assembled collagen/hydroxyapatite composite materials*, Chemical Engineering Journal, 160 (2), 2010, 794-800; Kumar R., Prakash K. H, Cheang P., Gower L., Khor K. A., *Chitosan-mediated crystallization and assembly of hydroxyapatite nanoparticles into hybrid nanostructured films*, Journal of the Royal Society Interface, 5, 2000, 427-439; Qiu C., Xiao X., Liu R., *Biomimetic synthesis of spherical nano-hydroxyapatite in the presence of polyethylene glycol*, Ceramics International, 34, 2008, 1747-1751).

Exceptând parțial ultima dintre metodele mai sus citate, celelalte furnizează (nano)particule de hidroxiapatită slab cristalină și derivați ai acesteia, al căror morfomimetism față de bioapatită este modest, mai ales sub aspectul absenței geometriei disimetrice, dar și sub cel al dimensiunilor reduse la nivelul domeniilor cristaline individuale prezente în particule. În plus, toate metodele enumerate generează amestecuri de faze cristaline cu compoziție chimică diferențiată (diverse specii de fosfați de calciu cristalini, alături de hidroxiapatită). Ambele deficiențe menționate se răsfrâng în aplatizarea picurilor din spectrele de raze-X determinate asupra pulberilor de hidroxiapatită sintetizată (amplitudinea redusă și concomitent lățimea crescută a acestora, dublate de un raport semnal / zgomot modest), și respectiv prin prezența unui

număr ridicat de picuri caracteristice altor forme cristaline ale sărurilor de calciu și fosfor, de amplitudine redusă (impurificare spectrală).

Un procedeu de interes la nivel de laborator prevede sinteza hidroxiapatitei chemo-mimetice sub controlul cinetic al proceselor de difuzie a ionilor  $\text{PO}_4^{3-}$  și  $\text{HO}^-$  prin soluțiile coloidale ale unor biomacromolecule anterior transformate în sare de  $\text{Ca}^{2+}$ , în baza diferențelor de sarcină electrică globală între biomacromoleculele ce au fixat  $\text{Ca}^{2+}$ , devenind astfel greu difuzibile, și soluția coloidală a biomacromoleculelor încă nesalefiate (Xiao X., He D., Liu F., Liu R., *Preparation and characterization of hydroxyapatite/chondroitin sulfate composites by biomimetic synthesis*, Materials Chemistry and Physics, 112, 2008, 838-843; He D., Xiao X., Liu F., Liu R., *Chondroitin sulfate template-mediated biomimetic synthesis of nano-flake hydroxyapatite*, Applied Surface Science, 255, 2008, 361-364). Deși, principial, respectivul procedeu poate asigura obținerea unei geometrii disimetrice (cvasi-planare) a cristalelor de hidroxiapatită, el nu perzintă interes pentru sinteza la scară largă, date fiind condițiile de reacție (cristalizarea progresivă la interfețe dificil de menținut stabile) și timpii de sinteză pe care îi impune.

O serie de metode au fost elaborate pentru controlul caracteristicilor dimensionale, de cristalinitate și de puritate de fază ale (nano)particulelor ce chemo-mimează bioapatita. Între acestea relativ eficiente s-au dovedit următoarele: (i) **optimizarea recepturii și procedurii de sinteză** (Rajkumar M., Sundaram M., Rajendran V., *Preparation of size controlled, stoichiometric and bioresorbable hydroxyapatite nanorod by varying initial pH, Ca/P ratio and sintering temperature*, Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures, 6 (1), 2011, 169-179), (ii) **sinteza sub asistența câmpului magnetic** (Sundaram N. M., Girija E. K., Ashok M., Anee T. K., Vani R., Suganthi R. V., Yokogawa Y., Kalkura S. N., *Crystallisation of hydroxyapatite nanocrystals under magnetic field*, Materials Letters 60, 2006, 761-765; Wu C., Sassa K., Iwai K., Asai S., *Unidirectionally oriented hydroxyapatite/collagen composite fabricated by using a high magnetic field*, Materials Letters, 61 (7), 2007, 1567-1571; Tian A., Xue X., Liu C., He J., Yang Z., *Electrodeposited hydroxyapatite coatings in static magnetic field*, Materials Letters, 64 (10), 2010, 1197-1199), (iii) **sinteza sub asistența câmpului electric** (Ficai A., Andronescu E., Trandafir V., Ghițulică C., Voicu G., *Collagen/hydroxyapatite composite obtained by electric field orientation*, Materials Letters, 64(4), 2010, 541-544; Tanaka S., Shiba N., Senna M., *Change in the morphology of hydroxyapatite nanocrystals in the presence of bioaffinitive polymeric species under the application of electrical field*, Science and

Technology of Advanced Materials, 7 (2), 2006, 226-228), (iv) **sinteza condusă în câmp de radiofrecvență** (Bose S., Dasgupta S., Tarafder S., Bandyopadhyay A., *Microwave-processed nanocrystalline hydroxyapatite: Simultaneous enhancement of mechanical and biological properties*, Acta Biomaterialia, 6 (9), 2010, 3782-3790). Deficiențele acestor metode derivă din inducerea denaturării termice a eventualei componente biomacromoleculare prezente în mediul de reacție (metodele (i) și (iv)), impurificarea produsului de sinteză ca urmare a proceselor la interfețele cu electrozii, induse de câmpul electric direct aplicat în soluție apoasă (metoda (iii)), respectiv randamente scăzute obținute cu costuri ridicate (metoda (ii)).

Câmpul electric aplicat extern sistemelor în care are loc sinteza în soluție apoasă a hidroxiapatitei, în prezența (bio)macromolecularelor, este apt a induce în mod controlabil și reproductibil nucleerea și creșterea cristalelor (Kniep R., Busch S., *Biomimetic Growth and Self-Assembly of Fluorapatite Aggregates by Diffusion into Denatured Collagen Matrices*, Angewandte Chemie - International Edition, 35 (22), 1996, 2624-2626; Busch S., Dolhaine H., DuChesne A., Heinz S., Hochrein O., Laeri F., Podebrad O., Vietze U., Weiland T., Kniep R., *Biomimetic Morphogenesis of Fluorapatite-Gelatin Composites: Fractal Growth, the Question of Intrinsic Electric Fields, Core/Shell Assemblies, Hollow Spheres and Reorganization of Denatured Collagen*, European Journal of Inorganic Chemistry, 1999, 1643-1653). O creștere a eficienței controlului asupra morfologiei nanocristalelor este posibilă conducând sinteza în prezența unor compuși macromoleculari (Yu S.-H., Cölfen H., *Polymer Controlled Crystallization: Shape and Size Control of Advanced Inorganic Nanostructured Materials-1D, 2D Nanocrystals and More Complex Superstructures*, în: Low-Dimensional Systems: Theory, Preparation, and Some Applications, NATO Science Series Vol. 91, 2003, 87-105). Deficiența celor două metode de control mai sus citate constă în necesitatea conducerii sintezei în soluții apoase concentrate sau în hidrogeluri ale compușilor (bio)macromoleculari, fapt care reduce mult cinetica proceselor.

**Problema pe care o rezolvă invenția** este legată de obținerea nanoparticulelor de hidroxiapatită chemo- și morfo-mimetică în raport cu bioapatita, caracterizate prin puritate de fază (avansat eliberate de forme amorfe și cvasi-cristaline instabile) și prin reproductibilitatea caracteristicilor finale. **Sinteza are loc (i) în prezența biomacromolecularelor, (ii) prin controlul strict al procedurii și (iii) sub asistența câmpului electric (electrostatic și / sau variabil) aplicat din exteriorul sistemului de reacție.** Ea decurge prin procese de nucleere și creștere caracterizate prin cinetici rapide, fapt care face fezabilă conducerea sa la scară semiindustrială.

În principiu, **procedeul pentru controlul caracteristicilor hidroxiapatitei sintetizate în prezența biomacromoleculilor, procedeu care face obiectul prezentei invenții, implică parcurgerea următoarelor etape și subetape** (toate operațiile aplicate sunt specifice tehnologiilor farmaceutice și se conduc în echipamente și instalații uzuale în respectivele tehnologii; acolo unde nu se specifică în mod expres, operațiile se efectuează la temperatura ambientală, care nu va depăși însă plaja 15 ÷ 25 °C; în cele ce urmează menționarea hidroxiapatitei nu este exclusivă, ea implicând și menționarea posibililor derivați de substituție ai acesteia, ce se doresc a fi sintetizați):

**i. – obținerea sării de calciu a biomacromoleculii / biomacromoleculilor în prezența căreia / căroră se va sintetiza hidroxiapatita;** respectiva sare de calciu, generată în chiar mediul de reacție, induce două efecte favorabile asupra proceselor de sinteză ulterioare: (a) *gelifierea și / sau microfibrilarea biomacromoleculilor*, soldată cu generarea de edificii supramoleculare cu caracteristici controlabile prin intermediul parametrilor soluției coloidale de start, edificii cu rol de mediu aglomerat structurat, ale cărui interspații lacunare funcționează drept matrită pentru controlul creșterii cristalelor, respectiv (b) *suprasaturarea locală a edificiilor supramoleculare cu săruri anorganice*, ca o condiție a nucleerii omogene a cristalizării hidroxiapatitei; etapa se derulează în următoarele subetape succesive:

- i.1. – aducerea speciilor biomacromoleculare în soluție cu concentrație standardizată, imediat sub concentrația de încâlcire (entanglement), la temperatura de lucru; dacă în sistemul de reacție vor fi prezente mai multe specii macromoleculare, acestea se dizolvă și se aduc la o concentrație imediat inferioară celei de separare de fază (co-precipitare), la temperatura de lucru;
- i.2. – termostatarea soluției obținute în subetapa anterioară, la 8 ÷ 16 °C;
- i.3. – îndepărtarea din soluția coloidală a fracțiilor cu mase moleculare sub limita prestabilită pentru speciile biomacromoleculare, precum și a contraionilor; speciile biomacromoleculare se aduc mai întâi sub formă complet protonată (prin acidifierea soluției), iar apoi soluția coloidală se diafiltrează contra unor soluții acide (de acizi organici având un pKa ușor inferior grupărilor acide ale biomacromoleculilor din soluția coloidală);



- i.4. – îndepărtarea excesului de acid din soluția coloidală, prin diafiltrare contra apei deionizate, liberă de pirogeni;
  - i.5. – reglarea pH-ului soluției coloidale la valori din plaja fiziologică, prin diafiltrare contra unor amestecuri tampon organice (imidazol, HEPES, TRIS etc.);
  - i.6. – salefierea controlată a biomacromoleculilor prezente în soluția coloidală, prin diafiltrare contra unei soluții de  $\text{CaCl}_2$ , tamponată și ea la aceeași valoare de pH, utilizând tamponi organici;
  - i.7. – microfibrilarea / gelifierea speciilor biomacromoleculare prin încălzirea sistemului concomitent cu continuarea diafiltrării contra soluției de  $\text{CaCl}_2$ ; încălzirea se realizează după pante controlate ( $0,01 \div 0,5 \text{ } ^\circ\text{C} / \text{minut}$ ), până la valori finale controlate ale temperaturii ( $25 \div 45 \text{ } ^\circ\text{C}$ , funcție de temperatura de denaturare a biomacromoleculilor prezente în sistem);
  - i.8. – maturarea sistemului coloidal rezultat în subetapa anterioară, sub termostatare la  $5 \div 15 \text{ } ^\circ\text{C}$ ;
  - i.9. – tipizarea fizico-chimică a sistemului coloidal în vederea uniformizării caracteristicilor edificiilor supramoleculare microfibrilate / gelificate, prin operații de agitare, pompare prin diuze calibrate, ultrasonare, aplicate individual sau succesiv;
- ii. – **reglarea parametrilor mediului de reacție și controlul compoziției chimice a acestuia (condiționarea chimică a mediului de reacție)**, prin eliminarea până la o valoare controlată a excesului de ioni de calciu nelegați și prin adaosul de specii chimice cu rol de modulator al proceselor de creștere a cristalelor de hidroxiapatită; această etapă este esențială în asigurarea reproductibilității caracteristicilor hidroxiapatitei ulterior sintetizate (mai ales al purității de fază a (nano)particulelor); parcurgând această etapă se evită nucleerea excesivă, mai ales cea care ar decurge necontrolat în mediul lichid de reacție; în plus, prin condiționarea chimică se pregătește și devine reproductibilă migrarea ionilor prin mediul de reacție și în interiorul edificiilor supramoleculare anterior generate, sub efectul câmpului electric aplicat din exteriorul sistemului, în etapa imediat ulterioară; etapa decurge în regim termostatat, între  $5$  și  $15 \text{ } ^\circ\text{C}$ ; etapa se



derulează în următoarele subetape succesive (eventual intercalate cu stadii de maturare a sistemului coloidal, la temperaturi coborâte):

- ii.1. – alcalinizarea sistemului coloidal prin diafiltrare contra unei soluții de bază volatilă, până la valori de pH optime subetapei următoare;
- ii.2. – chelatarea excesului de ioni de calciu și eliminarea complexilor formați prin diafiltrare contra unor soluții de agenți de complexare apți a funcționa drept competitori ai biomacromoleculilor din sistem în partajarea ionilor  $\text{Ca}^{2+}$ ; respectivii agenți se selectează funcție de constanta de stabilitate a sării de calciu a biomacromoleculilor, astfel încât echilibrele să tindă spre limita de formare a complexilor chelatici; în plus chelatorii selectați trebuie să fie biocompatibili, biodegradabili și activi doar la pH alcalin;
- ii.3. – opțional, dacă edificiile supramoleculare larghează după cinetici prea lente excesul de ioni de calciu cu care sunt îmbibați (mai ales în cazul sistemelor gelifiate), se poate aplica o operație de schimb ionic prin suspendarea în sistemul coloidal a unor schimbători de ioni perlați și agitare moderată, timp de 6 ÷ 18 ore; la final, schimbătorul de ioni se separă centrifugal;
- ii.4. – condiționarea chimică a sistemului coloidal prin dozarea de compuși chimici mic-moleculari apți a regla cineticile de nucleere și de creștere a nanocristalelor de hidroxiapatită (adjuvanți ai cristalizării), cum ar fi: chelatori cu afinitate moderată față de ionii  $\text{Ca}^{2+}$ , tensioactivi biocompatibili, poloxameri, oligomeri ai PEG, solvenți organici etc.; toate speciile dozate trebuie să fie stabile și active la pH alcalin;
- ii.5. – maturarea sistemului coloidal, sub termostatare;
- ii.6. – tipizarea fizico-chimică a sistemului coloidal în vederea uniformizării caracteristicilor edificiilor supramoleculare microfibrilate / gelifiate, prin operații de agitare, pompare prin diuze calibrate, ultrasonare, aplicate individual sau succesiv;
- iii. – **inducerea unei difuzii activate masive a celorlalți ioni implicați în sinteza hidroxiapatitei (fosfat și cei de substituie:  $\text{CO}_3^{2-}$ ,  $\text{F}^-$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  etc.), iar ulterior a unui surplus de ioni de  $\text{Ca}^{2+}$** , difuzie accelerată prin intermediul unui câmp electric generat din exteriorul mediului de reacție; urmare difuziei masive, are loc inițierea și controlul nucleerii în

fază heterogenă (edificii supramoleculare cvasi-imobile – ioni mobili) a nanocristalelor de hidroxiapatită, care vor crește apoi pe măsura aportului de ioni necesari; respectivul aport este controlat prin dozarea temporizată a sărurilor necesare (anorganice și organice) în mediul de reacție, precum și prin parametrii câmpului electric indus din exterior (câmp electrostatic, sau variabil după legi de variație impuse, armonice ori periodice dar nearmonice); câmpul electric se aplică fie continuu în timp, fie etapizat (în epoci), funcție de echipamentele disponibile, de necesarul de control al proceselor pe care câmpul le induce și de receptura și procedura după care se conduce sinteza hidroxiapatitei; etapa se derulează la temperaturi ce sunt crescute odată cu avansul proceselor de cristalizare, în plaja  $5 \div 80$  °C, funcție de natura biomacromoleculilor utilizate; câmpul electric se aplică între armăturile unui condensator (i) plasate pe un reactor cu pereții din material dielectric, special proiectat și construit, (ii) aparținând unui sistem de filtrare în câmp electrostatic, (iii) aparținând unui sistem de electroprecipitare (dry precipitator), (iv) aparținând unui sistem de uscare dielectrică, sau (v) aparținând unui sistem de conservare a alimentelor în câmp electric pulsatoriu; exceptând primul caz menționat, operarea sistemelor (comanda și controlul aplicării câmpului electric) va diferi de cea uzuală în aplicațiile industriale cărora le sunt dedicate; reactoarele chimice special proiectate și construite sunt de preferat, deoarece ele pot fi operate în regimuri perfect controlabile în ceea ce privește natura și parametrii câmpului electric aplicat (tensiune electrică, densitate de curent, frecvență, legea de evoluție în timp, aplicarea unui potențial diferențial (cu masă flotantă) între plăci, etapizarea epocilor de aplicare); diferența de potențial aplicată depinde de geometria sistemului de plăci (formă spațială, arie, distanțare) și se corelează cu pierderile dielectrice inerente, astfel încât să se asigure o densitate de sarcină eficace de  $0,01 \div 1 \cdot 10^{-3}$  C/m<sup>2</sup>; în cazul aplicării după legi periodice a tensiunii pe plăci, frecvența de lucru se situează între 0,1 Hz și 50 kHz dacă legea este armonică, respectiv 0,01 Hz și 1 kHz dacă legea este non-armonică; în cazul aplicării în pulsuri periodice a tensiunii, frecvența va fi de  $0,1 \div 10$  Hz, cu un factor de umplere între 1 și 10 %; tensiunea aplicată plăcilor condensatorului poate varia în plaja  $4 \div 60$  kV, funcție de caracteristicile

geometrice ale reactorului și de materialele din care sunt construiți pereții acestuia, de legea de evoluție în timp, de frecvența de lucru și de permitivitatea sistemului coloidal procesat; subetapele acestei etape implică:

- iii.1. – menținerea sistemului coloidal în câmp electric (electrostatic și / sau variabil în timp), pe durate și la intervale de timp prestabilite; perioadele de aplicare a câmpului electric (numite epoci de tratare) se stabilesc funcție de caracteristicile sistemului coloidal (permitivitate electrică, vâscozitate, concentrație în specii saline, concentrație în adjuvanți ai cristalizării, tendință de separare), de procedura după care este condusă sinteza, de modul de aplicare a câmpului electric, de eventuala operare cu masă flotantă și de caracteristicile constructive ale instalației de menținere în câmp;
  - iii.2. – maturarea sistemului coloidal în prezența sau în absența câmpului electric, pe durate variabile funcție de complexitatea echilibrelor implicate în cristalizare (complexitate proporțională cu complexitatea compozițională a sistemului coloidal); dacă maturarea se realizează în absența câmpului, sistemul coloidal poate fi supus agitării; epocile de menținere în câmp pot alterna cu epoci de maturare statică ori sub agitare; la finalul etapei, se aplică o maturare prelungită, la temperaturi scăzute ( $4 \div 12$  °C);
- iv. – separarea produselor de reacție**, realizată diferențiat funcție de forma utilă, respectiv a fracției anorganice, sau a amestecurilor intime ale acesteia cu biomacromoleculele în prezența cărora hidroxiapatita a fost sintetizată; separarea implică cel puțin două subetape:
- iv.1. – îndepărtarea din masa de reacție a sărurilor de calciu non-cristaline și / sau a formelor de cristalizare metastabile, prin spălarea pe filtru cu soluții ale unor chelatori slab afini (acizii citric, gluconic sau ascorbic), urmată de spălarea cu apă deionizată liberă de pirogeni; dacă bio(macro)moleculele în prezența cărora s-a condus sinteza nu sunt necesare în produsul final, ele se pot îndepărta prin spălare pe filtru cu soluții specifice (ce pot include sisteme tampon, enzime hidrolitice, agenți liotropi); la final se aplică o spălare suplimentară, pe filtru, cu apă deionizată liberă de

pirogeni și o maturare în soluția unui sistem tampon salin sau organic, cu pH și tărie ionică prestabilite;

iv.2. – separarea fizică a sistemului coloidal, cu îndepărtarea excesului de lichid prin decantare, filtrarea supernatantului, centrifugare etc.

v. – **postprocesarea, împachetarea și stocarea produsului de sinteză** se realizează în condiții sterile; masa de produs util rezultată la finalul sintezei se supune ultrasonării în vederea eliminării prin sinereză controlată a excesului de lichid, apoi se porționează în loturi cu mase între 10 și 1000 grame, loturi care se introduc în flacoane sterile cu închidere etanșă; după închidere, flacoanele se pulverizează cu soluții alcoolice ce conțin antibiotice, antifungice și coloizi macromoleculari, după care se usucă în curent de aer rece; la final, flacoanele se etichetează și se închid ermetic, sub vid, în pungi din polietilenă; stocarea produsului util se poate realiza la temperatura ambientală (dar nu la valori de peste 30 °C), fără a suferi modificări sesizabile ale caracteristicilor timp de 6 ÷ 18 luni, funcție de natura componentei biomacromoleculare eventual prezente; o serie de echilibre de post-cristalizare pot deveni evidente după circa 8 luni de stocare (supra-agregarea nanoparticulelor, modificarea rapoartelor masice între fazele cristaline, modificarea dimensiunii și geometriei cristalitelor).

Reproductibilitatea caracteristicilor (bio)materialelor și produselor de sinteză este esențială în aplicațiile biomedicale, ea constituind minima garanție a reproductibilității efectelor scontate prin utilizare. În absența reproductibilității certificate conform standardelor, includerea (bio)materialelor și a produselor de sinteză în proceduri de factură biomedicală este prohibită. Procedul mai sus descris vizează și asigură reproductibilitatea și stabilitatea caracteristicilor hidroxiapatitei ce chemo- și morfo-mimează bioapatita, sintetizată în prezența biomacromoleculilor.

Conform prezentei invenții, stabilirea caracteristicilor (nano)particulelor de hidroxiapatită sintetizată în prezența biomacromoleculilor se realizează, pentru fiecare șarjă, aplicând următorul protocol minimal. Probele de produs final de sinteză se colectează conform metodologiei de eșantionare prevăzute de standardele ISO 3951-3:2007, ISO 10725:2000 și ISO 11648-2:2001. Fiecare serie de probe conține trei eșantioane: două a câte 500 mg și unul a 100 mg. Probele se usucă la punctul supercritic al dioxidului de carbon (31,1 °C; 7,4 MPa) sau al trifluormetanului (26 °C; 4,7 MPa). Eșantioanele cu masa inițială de 500 mg se examinează prin spectrometrie de

raze X, una imediat, iar cealaltă după calcinare timp de 36 ore la 960 °C. În cazul eşantioanelor cu conţinut de biomacromolecule, calcinarea se efectuează în trepte, astfel: preîncălzire la 96 °C timp de o oră, preîncălzire la 120 °C timp de o oră, încălzire la 400 °C cu panta de 10 °C/min., menţinere 3 ore, încălzire la 600 °C cu panta de 5 °C/min., menţinere 6 ore, încălzire la 960 °C cu panta de 3 °C/min., menţinere 32 ore. După analiza de raze X, eşantioanele se recuperează şi se examinează prin spectroscopie FT-IR (în pastilă de KBr uscată). Eşantionul cu masa iniţială de 100 mg se examinează prin microscopie electronică, mai întâi de baleiaj (SEM + EDX) şi apoi în transmisie (TEM). Spectrometrul de raze X se etalonează în fiecare săptămână cu probe de siliciu pur ( $2\theta$  28,44°; hkl 111) şi carbură de siliciu ( $2\theta$  35,74°; hkl 111), iar în fiecare serie de eşantioane se include şi unul de SiO<sub>2</sub> pur, în vederea validării intensităţii de împrăştiere şi a lăţimii picurilor (parametrul FWHM) la unghiurile  $2\theta$  cu valorile de 21,63° (hkl 020), 26,64° (hkl 121) şi 31,29° (hkl  $\bar{1}\bar{2}2$ ), pentru a garanta astfel corectitudinea şi reproductibilitatea rezultatelor calculelor privind cristalinitatea şi dimensiunea cristalitelor din eşantioanele de hidroxiapatită. Profilul picurilor tuturor difractogramelor se analizează conform prescripţiilor din referinţa: Davies P. L., Gather U., Meise M., Mergel D., Mildenberger T., *Residual-based localization and quantification of peaks in X-ray diffractograms*, The Anals of Applied Statistics, 2 (3), 2008, 861-886. Difractogramele obţinute pentru eşantioanele calcinate se interpretează prin comparaţie cu cardurile JCPDS 9-0432 (pentru Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>5</sub>OH) şi JCPDS 46-0905 (pentru hidroxiapatita calciu-deficientă), evidenţiind diferenţele faţă de etaloanele ICDD. Compararea între şarje obţinute conform unor recepturi diferite se realizează utilizând baza de date AMCSD, intrările 99-100-3575÷3576 pentru hidroxiapatita nestoechiometrică, respectiv 99-100-3577÷3582 pentru hidroxiapatita carbonatăă şi 99-100-2243÷2254 pentru hidroxiapatita dopată cu ioni de sodiu şi magneziu. Între şarje cu receptură identică se stabileşte reproductibilitatea caracteristicilor, prin comparaţii succesive şi analiză statistică în componente principale. Dimensiunea cristalitelor se calculează pentru ambele tipuri de eşantioane (necalcate şi calcinate), luând în considerare cel puţin 3 ÷ 5 picuri din difractogramele obţinute, aplicând algoritmul din referinţa: Monshi A., Foroughi M. R., Monshi M. R., *Modified Scherrer Equation to Estimate More Accurately Nano-Crystallite Size Using XRD*, World Journal of Nano Science and Engineering, 2, 2012, 154-160. Toate evaluările calitative şi cantitative ale difractogramelor se realizează în reprezentarea cu distanţele interplanare,  $d_{hkl}$  în nm, pe abscisă şi cu intensitatea relativă a picurilor, în procente, pe ordonată.

**Procedeul de control al caracteristicilor hidroxiapatitei sintetizate în prezența biomacromoleculilor, conform prezentei invenții, prezintă următoarele avantaje:**

- asigură obținerea de nanoparticule de hidroxiapatită sau derivați ai acesteia asimilabili bioapatitei, cu caracteristici reproductibile din punctul de vedere al cristalinității, purității de fază și disimetriei geometrice;

- este aplicabil oricărui derivat al hidroxiapatitei sintetizabil în mediu apos, indiferent de receptura amestecului de reacție, cu precădere derivaților calciu deficienți;

- este adaptabil oricărei proceduri de sinteză care permite etapizarea dozării reactivilor și aplicarea unui câmp electric (electrostatic și / sau variabil) din exteriorul sistemului de reacție, sau cel puțin intercalarea unor stadii (epoci) de aplicare a respectivului câmp;

- asigură cinetici rapide ale etapelor de control al caracteristicilor, induse prin intermediul câmpului electric;

- este aplicabil mediilor de reacție aglomerate (crowded reaction systems) ca urmare a prezenței (bio)macromoleculilor în concentrații apropiate de limita de încălcire (entanglement);

- poate furniza separat faza anorganică, sau amestecuri intime ale acesteia cu specii (bio)macromoleculare, sub forma blendurilor coloidale sau a hidrogelurilor laxe;

- evită impurificarea necontrolată cu produse ale electrolizei și oxido-reducerii speciilor prezente în mediul de reacție apos ori în structura electrozilor, dată fiind aplicarea câmpului electric în regim capacitiv, fără electrozi imersați în mediul de reacție;

- este aplicabil mediilor lichide de reacție cu pH-uri și concentrații saline extreme, nefiind limitat de valorile ridicate ale conductivității mediului de reacție;

- asigură consumuri mici de energie electrică (la lucrul în instalații de nivel semi-industrial), dată fiind izolarea electrozilor față de mediul de reacție (este nevoie doar de compensarea curenților de fugă prin sistemul capacitiv).

### **Exemple de aplicare a procedurii descrise în invenție**

Descrierile ce urmează au titlu exemplificativ din următoarele puncte de vedere:

- **receptura sintezei:** natura și cantitățile de specii chimice (reactivi și / sau adjuvanți) utilizate;
- **procedura de conducere a sintezei:** parametrii de operare (timpi, cadențe de dozare, temperaturi de lucru, pH-uri, tării ionice, condiții

generale de reacție, filtrare / diafiltrare, centrifugare, modul de maturare, natura, valorile și evoluția în timp a tensiunilor electrice aplicate etc.) și modul de control (regimuri de termostatare, regimuri hidrodinamice ale agitării, regimul de reglare a parametrilor electrice etc.);

- **ordinea, cadența, repetarea proceselor și operațiilor** din fluxul de sinteză și procesare.

Toate elementele enumerate admit variații ce țin de natura reacțiilor de sinteză și cea a proceselor de separare și purificare, precum și de plajele uzuale de lucru. Speciile chimice utilizate drept reactivi, adjuvanți, componenți ai mediilor de reacție etc. pot fi substituite cu altele similare acțiunii, rolului și eficacității în raport cu cele incluse în descrierile exemplificative, în măsura în care sunt agreate de farmacopei, ori prin reglementările EMEA și FDA.

Biomacromoleculele ce apar în descrierea exemplilor sunt ilustrative pentru clasele cărora le aparțin (polipeptide și (sclero)proteine, respectiv polizaharide). Ele pot fi substituite cu compuși macromoleculari de sinteză în măsura în care funcționalitatea chimică a acestora din urmă este similară.

Exemplele vizează sinteza la nivel pilot și semi-industrial a hidroxiapatitei și varietăților acesteia, asimilabile bioapatitei. Sistemele de reacție și cele de aplicare a câmpului electric, precum și instalațiile și echipamentele aferente acestora sunt menționate cu caracter ilustrativ, dar nu exclusiv. Ele pot fi sisteme special proiectate și construite, sau sisteme modificate și adaptate pornind de la unele deja existente, dar destinate altor aplicații, mai ales din tehnologiile farmaceutice.

### **Exemplul 1. – Obținerea sărurilor de calciu ale biomacromoleculelor**

#### **Exemplul 1.1. – Obținerea atelocolagenatului de calciu**

În cantități inițiale de 15 ÷ 65 L per șarjă, soluția de atelocolagen hipoimunogen obținută conform brevetului RO 123256 se concentrează până la 6 g/L, prin ultrafiltrare peste membrane cu limita de trecere de 30 kDa, după care se congelează la -25 ÷ -40 °C și se supune liofilizării. Liofilizatul proaspăt obținut se cântărește cu precizie de ± 0,1 mg, după care se umectează prin pulverizare, apoi prin îmbibare, cu soluție de 0.02 M HCl. După completa și uniformă gonflare, hidrogelul rezultat se solvă sub agitare lentă în soluție de 0,02 M HCl, până la concentrația de 2,0 ÷ 2,5 g/L. Soluția coloidală rezultată se răcește la 8 ÷ 16 °C și se centrifughează la 7000 g, reținând supernatantul. Acesta



din urmă se diafiltrează peste membrane cu MWCO 100 kDa, contra a cinci volume de soluție 0,001 M HCl în apă deionizată liberă de pirogeni, anterior sterilizată prin ultrafiltrare peste membrane cu MWCO 10 kDa și răcită la  $8 \div 16$  °C. Diafiltrarea se continuă apoi contra apei deionizate, liberă de pirogeni și sterilă, până la constanța pH-ului. Dacă se constată scăderea concentrației soluției coloidale de atelocolagen sub 2,5 g/L, valoarea se corectează prin ultrafiltrare. Soluția se difiltrează în continuare, peste aceleași membrane, contra a trei volume de soluție tampon 0,6 M HEPES (CAS 7365-45-9) cu pH-ul de 7,4, răcită la  $8 \div 16$  °C. Soluția de tampon (retenat) se recuperează, se reconcentrează, se ultrafiltrează peste membrane cu MWCO 10 kDa și se reutilizează. Fără a schimba membranele, soluția se diafiltrează contra a trei volume de soluție 10 mM  $\text{CaCl}_2 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$  (CAS 7774-34-7) în tampon 1 M imidazol (CAS 288-32-4) (pH 7,4). Și această soluție (retenat) se recuperează pentru a fi reutilizată. În vederea microfibrilării atelocolagenului, sub diafiltrare contra alte două volume de soluție de  $\text{CaCl}_2$ , temperatura sistemului coloidal se crește până la  $27 \div 32$  °C, cu o pantă a încălzirii de  $0,1 \div 0,3$  °C / minut. În această etapă, pomparea sistemului coloidal peste membranele de diafiltrare se realizează sub pernă de aer. În continuare, sistemul coloidal se răcește la  $8 \div 10$  °C, se supune ultrasonării de trei ori câte 15 minute, la frecvența de 42 kHz și la o intensitate acustică de  $0,4 \div 0,8$  W/cm<sup>2</sup>, intercalând câte 45 minute ședere statică. După o maturare în condiții sterile, la  $8 \div 10$  °C, timp de  $28 \div 36$  ore, suspensia rezultată se agită energic și i se adaugă  $16 \div 32$  % v/v DMSO (CAS 7365-45-9) și  $0,1 \div 0,3$  M uree recristalizată sterilă (CAS 57-13-6), după care este supusă unei a doua maturări, în aceleași condiții. La final, sistemul coloidal rezultat (o suspensie de microfibrile de atelocolagenat de calciu ușor gonflăte în DMSO, a căror supraasociere este întârziată în prezența ureei) se agită energic și, încă rece, se omogenizează prin pompare cu recirculare, sub presiune moderată ( $10 \div 30$  kPa), prin diuze inelare cu miez conic, cu diametrul la intrare de 12 mm și la ieșire de 2 mm. Pentru evitarea spumării, diuzele se imersează în lichidul pompat. Sistemul coloidal rezultat se utilizează imediat după omogenizare.

### **Exemplul 1.2. – Obținerea hialuronatului de calciu**

Procedura este similară celei descrise în exemplul 1.1, cu următoarele particularizări. Comparativ cu atelocolagenul, acidul hialuronic se procesează în cantități mici (la start,  $5 \div 20$  g per șarjă), la nivel de laborator. Inițial, el se supune unei purificări conform descrierii din referința: Lefter C.-M., Maier S. S., Maier V., Popa M.,

Desbrieres J., *Engineering preliminaries to obtain reproducible mixtures of atelocollagen and polysaccharides*, Materials Science and Engineering: C, 33 (4), 2013, 323-2331. În continuare, soluția coloidală rezultată se concentrează până la  $1,4 \div 2,0$  g/L, prin ultrafiltrare. Acidularea se realizează prin diafiltrare contra a cinci volume de soluție de 0,05 M HCl. Eliminarea acidității prin diafiltrare se realizează mai întâi contra a trei volume de soluție  $0,3 \div 0,5$  %  $\text{NH}_4\text{OH}$ , iar apoi contra apei deionizate, liberă de pirogeni și sterilă, până la constanța pH-ului. Tamponarea la pH 7,4 se realizează prin diafiltrare contra unei soluții 1 M imidazol. În cazul hialuronului de calciu nu intervine microfibrilarea, ci o gelifiere laxă. Pomparea peste membranele de diafiltrare se realizează mereu în regim peristaltic. Condiționarea chimică prin adaos de DMSO nu se aplică. Sistemul coloidal rezultat la final se omogenizează prin pompare peristaltică, în circuit închis.

### **Exemplul 1.3. – Obținerea sării de calciu a gelanului nativ**

Procedura este similară celei descrise în exemplul 1.1, cu următoarele particularizări. Șarjele pornesc de la mase inițiale de gelan cuprinse între 100 și 3000 g. Gelanul nativ brut (produs în culturi de *Sphingomonas paucimobilis*, ATCC 31461) se purifică conform descrierii din referința citată în exemplul 1.2. Soluția coloidală rezultată se concentrează până la  $0,8 \div 1,5$  g/L. Acidularea prin diafiltrare se realizează contra a trei volume de soluție 0,02 M HCl. Eliminarea acidității prin diafiltrare se realizează mai întâi contra a trei volume de soluție  $0,1 \div 0,3$  %  $\text{NH}_4\text{OH}$ , iar apoi contra apei deionizate, libere de pirogeni și sterile, până la constanța pH-ului. Tamponarea la pH 7,4 se realizează prin diafiltrare contra unei soluții 1 M imidazol. Încălzirea în regim controlat nu este necesară. La adăugarea  $\text{CaCl}_2$ , gelanul gelifiază progresiv. De aceea, diafiltrarea contra soluției de  $\text{CaCl}_2$  tamponate, precum și toate diafiltrările ulterioare, se înlocuiesc cu pompare peristaltică în circuit închis. Maturările se efectuează la temperatura ambientală (dar nu înafara plajei  $15 \div 30$  °C). Condiționarea chimică prin adaos de DMSO nu se aplică. Sistemul coloidal rezultat la final se omogenizează prin pompare peristaltică, în circuit închis.

### **Exemplul 1.3. – Obținerea sărurilor de calciu ale derivaților chitozanului**

Procedura este similară celei descrise în exemplul 1.1, cu următoarele particularizări. Ea se poate aplica derivaților chitozanului deacetilat în proporție de peste  $85 \div 90$  %, cu mase moleculare mici ( $40 \div 60$  kDa) și medii ( $200 \div 500$  kDa), solubili în

mediu apos alcalin. Înaintea derivatizării citozanul se aduce la puritate farmaceutică, spre exemplu conform procedeelelor descrise în brevetul US 6896809, prin operații de deproteinizare, demineralizare, îndepărtare a ionilor metalici și decolorare. Pentru legarea unor cantități ridicate de  $\text{Ca}^{2+}$  se preferă derivații anionici, cum sunt chitozanul N-succinilat, O,N-succinilat, glicol-chitozanul succinilat, chitozanul sulfat și cel sulfat etc. Dacă polizaharidul urmează să se regăsească, alături de hidroxiapatită, în produsul final, se preferă formele de chitozan derivatizat cu caracter amfoter, sau cele parțial PEG-ilate și apoi anionizate. Șarjele pornesc de la mase inițiale de chitozan cuprinse între 300 și 6000 g în cazul formelor cu mase moleculare mici, respectiv între 100 și 1000 g în cazul celor cu mase moleculare medii. Dacă formele de chitozan avute în vedere sunt puternic anionice, masa inițială a șarjelor poate fi mărită cu un coeficient de  $1,3 \div 1,8$ . Etapa de acidulare și eliminare avansată a sărurilor se înlocuiește cu o etapă de purificare specifică derivatului de chitozan luat în lucru. Tamponarea la pH 7,4 se realizează prin diafiltrare contra unei soluții 1 M imidazol. Încălzirea în regim controlat nu este necesară. Dacă sistemul coloidal tamponat devine excesiv vâscos, diafiltrarea contra soluției de  $\text{CaCl}_2$  tamponate, precum și toate diafiltrările ulterioare, se înlocuiesc cu pompare peristaltică în circuit închis. Maturările se efectuează la temperatura ambientală (dar nu în afara plajei  $15 \div 30$  °C). Condiționarea chimică prin adaos de DMSO nu se aplică. Sistemul coloidal rezultat la final se omogenizează prin pompare peristaltică, în circuit închis.

## **Exemplul 2. – Condiționarea chimică a mediului de reacție**

### **Exemplul 2.1. – Condiționarea chimică a soluțiilor și suspensiilor coloidale**

Dacă starea fizico-chimică a mediului de reacție este aceea a unei soluții sau suspensii coloidale, condiționarea chimică se realizează prin diafiltrarea succesivă contra trei volume de soluție de amoniac cu pH  $9,5 \div 11,0$  cu eventual adaos de DMSO, iar apoi contra a trei volume din soluția unui chelator al calciului cu înaltă eficacitate (activ la concentrații mici, la temperaturi coborâte și la pH-uri depărtate de cele optime) și biocompatibili. În cazul suspensiei de atelocolagenat de calciu, soluția alcalină va conține și  $16 \div 32$  % v/v DMSO (CAS 7365-45-9), iar cea de chelator, și ea alcalină, va conține  $3 \div 18$  % w/v GLDA (sarea de tetrasodiu a N,N-bis(carboximetil)-acidului L-glutamic, CAS 51981-21-6). În cazul solului / hidrogelului lax de hialuronat de calciu, nu se adaugă DMSO, iar chelatorul va fi IDS (sarea de tetrasodiu a N(1,2-dicarboximetil)-acidului DL-aspartic, CAS 144538-83-0). După tratamentul cu chelatori înalt eficienți,

sistemul coloidal se diafiltrează contra a trei volume de soluție de amoniac cu pH 9,5 ÷ 11, iar apoi contra a trei volume din aceeași soluție în care se adaugă 2 ÷ 6 % w/v PEG 400 (anterior adus la puritate farmaceutică), 5 ÷ 15 % w/v acid gluconic (CAS 526-95-4) și 8 ÷ 12 % w/v Pluronic L44NF (CAS 9003-11-6), lucrând la temperaturi de 18 ÷ 25 °C. După o maturare la 18 ÷ 25 °C, timp de 16 ore, diafiltrarea se repetă contra a încă unui volum de soluție ce conține adjuvanții mai sus citați. La final, sistemul coloidal se supune ultrasonării, de trei ori câte 15 minute, la frecvența de 42 kHz și la o intensitate acustică de 0,4 ÷ 0,8 W/cm<sup>2</sup>, fără a depăși temperatura de 25 °C, intercalând câte 45 minute ședere statică. Apoi sistemul coloidal se omogenizează prin pompare sub pernă de aer, prin diuze inelare cu diametre variabile (12 mm la intrare, 2 mm la ieșire). Pentru evitarea spumării, diuzele se imersează în lichidul pompat. Produsul rezultat se utilizează imediat după omogenizare.

### **Exemplul 2.2. – Condiționarea chimică a hidrogelurilor**

Dacă starea fizico-chimică a mediului de reacție este aceea a unui hidrogel (semi)structurat, condiționarea chimică se realizează prin supraîmbibare cu soluție de amoniac cu pH 9,5 ÷ 11,0. Dacă în urma supraîmbibării și aplicării unei agitări mecanice moderate rezultă un hidrogel lax, fragmentat, acesta se diluează în continuare cu soluție de amoniac, iar apoi, sub agitare lentă, se adaugă un schimbător de ioni cationic energetic, în formă acidă, perlat (Dowex HGR-W2, CAS 69011-20-7, anterior sterilizat cu 0,2 % hipoclorit de sodiu), în raport masic de 0,2 : 1 față de hidrogelul inițial luat în lucru. Schimbul ionic se realizează pe durata a 90 ÷ 120 minute, sub agitare lentă. Dacă după supraîmbibare hidrogelul rămâne ferm, sub forma unui gel fizic (nereticulat chimic), acesta se supune sinerezei prin vibrație mecanică (100 Hz, 0,8 ÷ 1,2 mm amplitudine), în tăvi din teflon, iar după scurgerea excesului de lichid se contactează cu blocuri de schimbător de ioni cationic energetic, în formă acidă, compactat prin presare la 2 ÷ 5 MPa (Dowex 50WX2, CAS 69011-20-7, sterilizat cu 0,2 % hipoclorit de sodiu, anterior compactării). Grupajul de operații vibrație mecanică alternată cu contactare cu schimbători de ioni se repetă de încă 3 ÷ 5 ori, schimbând fețele hidrogelului ce vin în contact cu blocul de schimbător de ioni. Drept consecință, hidrogelul inițial se umflă suplimentar. După o maturare de 24 ÷ 36 ore la 18 ÷ 25 °C, vibrația mecanică se repetă, iar apoi hidrogelul se supraîmbibă cu o soluție de amoniac cu pH 9,5 ÷ 11, ce conține 5 ÷ 10 % w/v PEG 400 (anterior adus la puritate farmaceutică), 12 ÷ 18 % w/v acid gluconic (CAS 526-95-4) și 15 ÷ 18 % w/v Pluronic L44NF (CAS 9003-11-6),

lucrând la temperaturi de  $18 \div 25$  °C, timp de  $16 \div 24$  ore, în condiții statice. La final, hidrogelul supraîmbibat se supune de trei ori, alternant, vibrații mecanice și maturării.

### **Exemplul 3. – Controlul sintezei cristalelor de hidroxiapatită în câmp electric generat din exteriorul mediului de reacție**

Indiferent de receptura utilizată (natura chimică a precursorilor ori adjuvanților, rapoartele molare între aceștia, forma fizico-chimică sub care se dozează și parametrii chimici ori fizici impuși mediului de reacție) procedura de sinteză a hidroxiapatitei sub asistența câmpului electric depinde de starea fizică sub care se prezintă sarea de calciu a biomacromoleculor luate în lucru și de caracteristicile fizico-chimice ale acesteia. Exemplele de mai jos derivă din tehnica de sinteză în care nucleerea se realizează prin aducerea sării de calciu a biomacromoleculor într-o soluție metastabilă de fosfați de calciu cu compoziție dinamică în timp, menținută la pragul suprasaturării locale, urmată de precipitarea lentă, la echilibru, a hidroxiapatitei. Controlul și evoluția caracteristicilor soluției metastabile se realizează prin intermediul câmpului electric generat din exteriorul mediului apos de reacție.

#### **Exemplul 3.1. – Procedura aplicabilă soluțiilor și dispersiilor coloidale**

**(A)** Sub agitare eficientă, în sistemul coloidal termostatat la  $15 \div 18$  °C se dozează o primă cantitate (circa 1 % din volumul prevăzut prin receptură) din soluția precursorului care furnizează fosforul în mediul de reacție. După formarea preliminară a fosfatului de calciu la nivelul structurilor biomacromoleculare, sistemului i se aplică o primă epocă de menținere sub câmp electrostatic, la  $4 \div 60$  kV, funcție de caracteristicile geometrice și constructive ale reactorului, timp de  $5 \div 15$  minute. În continuare precursorii sursă de fosfor și respectiv sursă de calciu se dozează în tandem și în rate succesive, sub agitare eficientă, în regim termostatat, în rapoarte volumice care să asigure un ușor exces al fosforului în raport cu stoechiometria reacției. Ratele de dozare se intercalează cu epoci de menținere statică a mediului de reacție sub câmp electrostatic. Cadența ratelor se îndesește, iar durata epocilor se scurtează pe măsură ce dozarea avansează. În cazul sintezei ce pornește de la atelocolagenatul de calciu, durata epocilor variază între 30 de minute la începutul și respectiv 3 minute la finalul dozării. Dacă sinteza pornește de la săruri de calciu ale polizaharidelor, duratele epocilor se extind cu un coeficient de  $1,5 \div 5$ , funcție de vâscozitatea mediului de reacție, la temperatura de lucru. După încheierea dozărilor, sistemul coloidal se

maturează mai întâi sub agitare lentă, la  $15 \div 25$  °C, timp de  $3 \div 6$  ore, iar apoi static, sub câmp electrostatic, timp de  $60 \div 90$  minute.

**(B)** O procedură similară celei descrisă în paragraful (A) prevede lucrul în prezența câmpului electric variabil în timp după o lege armonică. Procedura se poate derula în reactoare special proiectate și construite, în cazul cărora, pe plăcile opuse ale condensatoarelor, se pot aplica tensiuni diferențiale (cu masă flotantă). De asemenea, respectivele reactoare sunt prevăzute cu sisteme de termostatare prin manta. Comparativ cu procedura descrisă în paragraful (A), tensiunile aplicate se încadrează în plaja  $\pm 8 \div \pm 12$  kV, fiind sinusoidale, cu frecvențe dependente de caracteristicile sistemului coloidal luat în lucru, dar și de poziția epocii curenți în secvența epocilor de aplicare. În cazul atelocolagenatului de calciu, frecvența poate varia între 8 și 10 kHz în primele epoci, respectiv între 30 și 100 Hz în epocile finale. Temperatura mediului de reacție se menține în plaja  $18 \div 25$  °C. În cazul sărurilor de calciu ale polizaharidelor, frecvența poate varia între 30 și 50 kHz în epocile inițiale, respectiv între 1 și 5 kHz în cele finale. Temperatura de lucru se poate ridica la  $40 \div 90$  °C.

**(C)** O altă procedură prevede lucrul în prezența câmpului electric variabil în timp după o lege non-armonică, uzual de tip rampă („dinte de fierăstrău”) sau de tip pulsatoriu. Această procedură diferă față de cea descrisă în paragraful (A) doar prin valorile tensiunilor aplicate și prin frecvența de lucru. În cazul atelocolagenatului de calciu, pe plăcile condensatoarelor se aplică tensiuni variabile în rampă, între zero și  $20 \div 25$  kV, la frecvențe de  $0,01 \div 10$  Hz, în regim termostatat la  $18 \div 25$  °C. În cazul sărurilor de calciu ale polizaharidelor, la aceleași tensiuni aplicate, frecvența poate varia între 0,3 Hz și 1 kHz. De asemenea, sărurilor de calciu ale polizaharidelor li se pot aplica tensiuni pulsatorii de  $20 \div 60$  kV, la frecvențe de  $0,1 \div 10$  Hz, cu un factor de umplere între 1 și 10 %. În acest din urmă caz, duratele epocilor se prelungesc cu coeficienți de  $1,5 \div 4$ .

### **Exemplul 3.2. – Procedura aplicabilă hidrogelurilor**

Sărurile de calciu ale biomacromoleculilor care gelifică fizic se depun în tăvi din teflon, în straturi de  $8 \div 10$  mm, scufundate în soluția apoasă a cărei compoziție salină depinde de receptura după care se conduce sinteza. Nivelul total al soluției în tăvi nu va depăși 20 mm. Tăvile se introduc între plăcile unui condensator plan, distanțate la  $40 \div 80$  mm, căruia i se aplică tensiuni electrostatice de  $15 \div 60$  kV, sau variabile în rampă, între zero și  $15 \div 60$  kV, cu frecvența de  $0,01 \div 1$  Hz. Între plăci se suflă aer uscat, la

debite de  $4 \div 10$  L/s și presiuni statice de  $0,1 \div 0,3$  mbar ( $1 \div 3$  mm col. apă). De la o epocă la alta, polaritatea tensiunii aplicate pe plăcile condensatorului se inversează.

#### **Exemplul 4. – Separarea și purificarea produșilor de reacție utili**

##### **Exemplul 4.1. – Post-tratarea dispersiilor rezultate în urma reacțiilor**

La finalul sintezei (nano)cristalelor de hidroxiapatită sub asistența câmpului electric, în prezența biomacromoleculilor, dispersia apoasă rezultată se supune separării centrifugale cu scop de compactare, la 300 g, apoi spălării în centrifugă cu apă deionizată liberă de pirogeni, până la constanța pH-ului lichidului separat. Tratamentele următoare se efectuează în utilaje ce nu prezintă părți fixe sau mobile din metal. Șlamul separat se resuspendă în  $200 \div 500$  % w/w soluție  $8 \div 18$  % w/v acid citric sau citrat de sodiu și se menține sub agitare eficientă timp de  $30 \div 120$  minute, funcție de consistența rezultată. La finalul tratamentului, dispersia se supune decantării. Tratamentul cu acid citric / citrat se repetă de alte  $3 \div 5$  ori, până când dispersia decantează rapid, iar agregatele constituente se destramă, generând microparticule independente. În continuare șlamul se resuspendă și se decantează de  $4 \div 6$  ori în  $200 \div 500$  % w/w apă deionizată sterilă, liberă de pirogeni. Supernatantele rezultate la decantarea din apă se rețin și se supun centrifugării la  $1200 \div 3600$  g, pentru separarea avansată a microparticulelor. Șlamul și sedimentul centrifugal se resuspendă în soluție tampon imidazol cu pH 7,4, în care s-au adăugat  $5 \div 8$  mM/L  $K_3PO_4$ ,  $3 \div 9$  mM/L glucoză,  $30 \div 120$  mM/L acid L-ascorbic (CAS 50-81-7) și  $0,5 \div 1,5$  g/L doxicilină hclat (CAS 24390-14-5). După o maturare pe durata a  $12 \div 36$  ore în soluția tampon, la  $15 \div 25$  °C, dispersia se supune ultrasonării de trei ori câte 15 minute, la frecvența de 42 kHz și la o intensitate acustică de  $0,4 \div 0,8$  W/cm<sup>2</sup>, intercalând câte 45 minute ședere statică. La final, dispersia se centrifughează la 300 g și se spală în centrifugă cu soluția tampon mai sus menționată, apoi se centrifughează la  $900 \div 1300$  g, pentru obținerea unui sediment onctuos. Respectivul sediment se maturează în condiții sterile, timp de  $18 \div 36$  ore, la  $15 \div 20$  °C.

##### **Exemplul 4.2. – Post-tratarea hidrogelurilor rezultate în urma reacțiilor**

**(A)** Dacă nu este nevoie ca straturile de hidrogel să se mențină intacte, acestea se preiau din tăvile din teflon, se scurg și apoi se dezagregă prin agitare eficientă, în vas termostatat la  $10 \div 18$  °C, până la omogenizare. Omogenizatul se resuspendă, sub agitare lentă, în  $300 \div 600$  % w/w apă deionizată sterilă, liberă de pirogeni, apoi se

decantează și se separă centrifugal, la 300 g. Resuspendarea și separarea se repetă de încă 3 ÷ 5 ori. La final, sedimentul (gelatinos sau nu) se congelează la  $-25 \div -40$  °C și apoi se supune liofilizării. Solidul rezultat se destructurează prin măcinare și se cerne succesiv prin site cu densitatea ochiurilor de 10, 20 și apoi 30 mesh (cu fire din poliester având diametrul de 0,2 mm, respectiv cu ochiuri de 2,34, 1,07 și 0,65 mm), reținând separat cele patru sorturi rezultate. Acestea din urmă se rehidratează separat, prin pulverizare și apoi îmbibare cu soluție tampon imidazol având pH 7,4, în care s-au adăugat 5 ÷ 8 mM/L  $K_3PO_4$ , 3 ÷ 9 mM/L glucoză, 30 ÷ 120 mM/L acid ascorbic și 0,5 ÷ 1,5 g/L doxicilină hclat. Șlamul rezultat se omogenizează prin recirculare în șnec răcit.

**(B)** Dacă se impune menținerea intactă a straturilor de hidrogel, acestea se spală repetat, în tăvile din teflon, cu apă deionizată sterilă, liberă de pirogeni, pînă la constanța pH-ului. Apoi, în tăvi se adaugă soluția tampon descrisă la paragraful (A) și sistemul se supune vibrării mecanice (100 Hz, 0,8 ÷ 1,2 mm amplitudine) și ultrasonării (42 kHz și la o intensitate acustică de 0,4 ÷ 0,8 W/cm<sup>2</sup>), iar apoi scurgerii avansate. Tratamentul se repetă de încă 3 ÷ 5 ori, intercalând perioade de maturare la rece (12 ÷ 36 ore, la 15 ÷ 25 °C). În continuare, stratul de hidrogel se congelează la  $-25 \div -40$  °C și apoi se supune liofilizării. Solidul rezultat se stochează ca atare, sau se rehidratează prin pulverizare și apoi îmbibare cu soluție tampon imidazol având pH 7,4, în care s-au adăugat 8 ÷ 16 mM/L  $K_3PO_4$ , 6 ÷ 9 mM/L glucoză, 50 ÷ 120 mM/L acid ascorbic și 0,5 ÷ 1,5 g/L doxicilină hclat.

#### **Exemplul 4. – Postprocesarea, împachetarea și stocarea produsului de sinteză**

Indiferent de forma fizică sub care se prezintă, produsele finale umede se tipizează prin postprocesare în condiții sterile. În acest sens, ele se supun ultrasonării la 42 kHz și la o intensitate acustică de 0,4 ÷ 0,8 W/cm<sup>2</sup>, timpi variabili, stabiliți experimental, pentru a asigura eliminarea prin sinereză a lichidului ce îl conțin, pînă la o valoare constantă a substanței uscate (8 ÷ 15 % în cazul sedimentelor onctuoase, respectiv 8 ÷ 10 % în cazul omogenizatelor din hidrogel, ori hidrogelurilor rehidratate). După porționarea în loturi cu mase între 10 și 1000 grame, produsul final se introduce și se închide în flacoane sterile cu închidere etanșă. Acestea din urmă se pulverizează cu soluții alcoolice care conțin antibiotice, antifungice și coloizi macromoleculari, apoi se usucă în curent de aer rece. La final, flacoanele se etichetează și se închid ermetic, sub vid, în pungi din polietilenă.



Produsul uscat prin liofilizare se condiționează în incinte sterile cu umiditatea relativă a aerului de  $12 \div 18 \%$ , apoi se secționează în piese cu dimensiuni convenabile stocării (uzual  $50 \times 50$  mm, până la  $50 \times 150$  mm). Piesele se dublează apoi cu folii din Mylar cu aceleași dimensiuni și grosime de  $180 \div 360 \mu\text{m}$ , anterior sterilizate, și se închid ermetic, sub vid, în pungi din polietilenă sterile și ele, etichetate în prealabil.

## REVENDICĂRI

1. Procedeu pentru controlul caracteristicilor particulelor de hidroxiapatită sintetizată în prezența biomacromoleculilor, **caracterizat prin aceea că:**

- asigură obținerea de nanoparticule de hidroxiapatită sau derivați ai acesteia asimilabili bioapatitei, cu caracteristici reproductibile din punctul de vedere al cristalinității, purității de fază și disimetriei geometrice, prin sinteză în mediu apos aglomerat macromolecular și ușor alcalin, condusă la temperaturi joase și medii:

- (i) în prezența (sclero)proteinelor, polipeptidelor și / sau polizaharidelor;
- (ii) prin controlul strict al procedurii, independent de receptură;
- (iii) sub asistența câmpului electric (electrostatic și / sau variabil în timp) aplicat din exteriorul sistemului de reacție, în regim capacitiv, fără contactul direct cu electrozi sau plăci ale condensatoarelor;
- (iv) în sisteme de reacție condiționate (bio)chimic prin adaos de adjuvanți și prin tamponare, după recepturi dependente de natura speciilor biomacromoleculare implicate;

- din punct de vedere chimic, speciile (bio)macromoleculare implicate se aduc mai întâi sub forma sării lor de calciu; din punct de vedere fizico-chimic, ele se utilizează sub forma unor sisteme coloidale structurate prin microfibrilare sau gelifiere fizică laxă;

- nucleerea și creșterea nanocristalelor de hidroxiapatită se realizează prin aducerea sării de calciu a biomacromoleculilor într-o soluție metastabilă de fosfați de calciu cu compoziție dinamică în timp, menținută la pragul suprasaturării locale, urmată de precipitarea controlată, la echilibru, a hidroxiapatitei; controlul și evoluția în timp a caracteristicilor soluției metastabile se realizează prin intermediul câmpului electric generat din exteriorul mediului apos de reacție;

- este aplicabil oricărui derivat al hidroxiapatitei sintetizabil în mediu apos slab alcalin, indiferent de receptura amestecului de reacție, cu precădere derivaților calciu deficienți;

- poate decurge în prezența compușilor macromoleculari de sinteză, dacă aceștia prezintă reactivitate și comportament coloidal similar (sclero)proteinelor, polipeptidelor sau polizaharidelor solubile sau dispersabile în mediu apos slab alcalin;

- poate furniza separat faza anorganică, sau amestecuri intime ale acesteia cu specii (bio)macromoleculare, sub forma blendurilor coloidale sau a hidrogelurilor laxe;

- evită impurificarea necontrolată cu produse ale electrolizei și oxido-reducerii speciilor chimice prezente în mediul de reacție apos ori în structura electrozilor, prin faptul că aplicarea câmpului electric se realizează în regim capacitiv, fără a necesita imersarea electrozilor în mediul de reacție;

- este aplicabil mediilor lichide de reacție cu o largă plajă de pH-uri și concentrații saline, nefiind limitat de valorile ridicate ale conductivității mediului de reacție;

- furnizează specii anorganice asimilabile bioapatitei, asociate fizico-chimic sau nu (bio)macromoleculilor în prezența cărora s-a condus sinteza, destinate aplicațiilor din domeniile ingineriei tisulare, medicinei reconstitutive și regenerative, chirurgiei plastice, farmaceuticii și cosmeticii farmaceutice, transfecției osoase prin vehicularea informației genetice în sisteme ce mimează calusul osos, generate *ex vivo*.

2. Procedeu conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** drept specie biomacromoleculară se utilizează atelocolagenul hipoimunogen.

3. Procedeu conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** drept specie biomacromoleculară se utilizează acidul hialuronic.

4. Procedeu conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** drept specie biomacromoleculară se utilizează gelanul nativ.

5. Procedeu conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** drept specie biomacromoleculară se utilizează derivați anionici ai chitozanului, solubili în mediu apos slab alcalin.

6. Procedeu conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** drept specie macromoleculară se utilizează compuși macromoleculari de sinteză ce prezintă reactivitate și comportament coloidal similar biomacromoleculilor menționate în revendicările 2, 3, 4 și 5, atunci când sunt dizolvați sau dispersați în mediu apos slab alcalin.

7. Procedeu conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** etapele procesului de obținere a particulelor de hidroxiapatită sunt următoarele: (i) obținerea sării de calciu a (bio)macromoleculii / (bio)macromoleculilor în prezența căreia / cărora se va sintetiza hidroxiapatita, (ii) condiționarea chimică a mediului de reacție, (iii) sinteza cristalelor de hidroxiapatită sub asistența câmpului electric generat din exteriorul mediului de reacție, (iv) separarea produselor de reacție, (v) postprocesarea, împachetarea și stocarea produsului de sinteză util.

8. Procedeu conform revendicării 7, **caracterizat prin aceea că** subetapele etapei de obținere a sării de calciu a (bio)macromoleculilor sunt următoarele: (i) aducerea speciei (bio)macromoleculare în soluție apoasă cu concentrație standardizată,

(ii) purificarea speciei (bio)macromoleculare prin restrângerea dispersității caracteristicilor sale în soluție, (iii) îndepărtarea contraionilor originari și aducerea speciei (bio)macromoleculare în formă complet protonată, (iv) eliminarea excesului de acid și tamponarea soluției speciei (bio)macromoleculare cu amestecuri tampon organice, (v) salefiera controlată a speciei (bio)macromoleculare cu contraioni de calciu, (vi) microstructurarea speciei (bio)macromoleculare prin microfibrilare și / sau prin gelifiere fizică, (vii) maturarea sistemului coloidal format în subetapa anterioară, (viii) tipizarea fizico-chimică a sistemului coloidal ce conține sarea de calciu a speciei (bio)macromoleculare.

9. Procedeu conform revendicării 7, **caracterizat prin aceea că** subetapele etapei de condiționare chimică a mediului de reacție sunt următoarele: (i) alcalinizarea sistemului coloidal obținut conform revendicării 8, utilizând soluția unei baze volatile, (ii) chelatarea excesului de ioni de calciu și eliminarea din sistemul coloidal a complexilor chelatici formați, (iii) dozarea în sistemul coloidal apos a speciilor chimice micromoleculare și oligomere cu rol de adjuvanți ai cristalizării, (iv) maturarea sistemului coloidal format în subetapa anterioară, (v) tipizarea fizico-chimică a mediului de reacție constituit în urma maturării.

10. Procedeu conform revendicării 7, **caracterizat prin aceea că** subetapele etapei de sinteză a cristalelor de hidroxiapatită sub asistența câmpului electric sunt următoarele: (i) formarea preliminară a fosfatului de calciu la nivelul structurilor coloidale (bio)macromoleculare, (ii) generarea în mediul de reacție a unei soluții metastabile de fosfați de calciu și menținerea permanentă a acesteia în pragul suprasaturării locale, (iii) menținerea sistemului coloidal (ce constituie mediul de reacție) în câmp electric, pe durate și la intervale de timp prestabilite, constituite în epoci de tratare în câmp, (iv) dozarea controlată, concomitentă sau în alternanță cu epocile de tratare în câmp, a speciilor chimice cu rol de precursor în sinteza hidroxiapatitei, (v) maturarea sistemului coloidal (ce constituie mediul de reacție) în prezența sau în absența câmpului electric, în regim termostatat.

11. Procedeu conform revendicării 7, **caracterizat prin aceea că** subetapele etapei de separare a produselor de reacție se realizează diferențiat, funcție de starea fizică a sistemului coloidal (ce constituie mediul de reacție), fiind, generic, următoarele: (i) îndepărtarea sărurilor de calciu non-cristaline și / sau a formelor cristalizate metastabile, prin tratare cu agenți de chelatare slab afini față ionii rețelei cristaline a hidroxiapatitei, (ii) condiționarea (bio)chimică a sistemului coloidal, (iii) maturarea speciilor chimice prezente în sistemul coloidal purificat, (iv) tipizarea fizico-chimică a

produsului util al sintezei, (v) separarea fizică a sistemului coloidal, cu sau fără izolarea fracției anorganice în raport cu cea organică.

12. Procedeu conform revendicării 7, **caracterizat prin aceea că** subetapele etapei de postprocesare, împachetare și stocare a produsului de sinteză utilizabil în stare umedă sunt următoarele: (i) condiționarea fizică prin ultrasonare în vederea eliminării apei prin sinereză, până la conținuturi de substanță uscată de  $8 \div 15$  % în cazul sedimentelor onctuoase rezultate după centrifugare, sau de  $8 \div 10$  % în cazul hidrogelurilor fizice sau al omogenizatelor din hidrogeluri ori hidrogelurilor rehidratate, (ii) porționarea și introducerea în flacoane sterile închise etanș, (iii) pulverizarea exteriorului flacoanelor închise cu o soluție alcoolică de antibiotice, antifungice și coloizi protectori, în vederea sterilizării, (iii) etichetarea flacoanelor sterilizate și închiderea lor sub vid, în folie din polietilenă.

13. Procedeu conform revendicării 7, **caracterizat prin aceea că** subetapele etapei de postprocesare, împachetare și stocare a produsului de sinteză utilizabil în stare uscată sunt următoarele: (i) secționarea în piese cu dimensiuni convenabile stocării și utilizării, (ii) condiționarea pieselor în incinte sterile cu umiditatea relativă a aerului de  $12 \div 18$  %, (iii) dublarea fiecăreia piese cu folii din Mylar anterior sterilizate, (iv) închiderea ermetică sub vid, în pungi din polietilenă sterile, etichetate.

14. Procedeu conform revendicărilor 1, 2 și 8, **caracterizat prin aceea că** atelocolagenatul de calciu se obține pornind de la soluții de atelocolagen hipoimunogen, astfel: (i) soluția coloidală se liofilizează, (ii) liofilizatul se reumectează și apoi se solvă în soluție 0,02 M HCl, (iii) soluția acidă se eliberează de orice suspensii solide și poi se purifică prin diafiltrare succesivă contra unor soluții acide, a apei deionizate sterile, respectiv a unei soluții tampon organic cu pH 7,4, (iv) soluția coloidală neutră se diafiltrează contra unei soluții diluate de CaCl<sub>2</sub>, tamponată la pH 7,4, concomitent cu creșterea controlată a temperaturii până la  $27 \div 32$  °C, în vederea microfibrilării, (v) suspensia formată se ultrasonează și apoi se maturează în condiții sterile, (vi) sistemul coloidal rezultat se condiționează fizico-chimic prin dozarea de DMSO și uree, iar apoi se maturează din nou, (vii) iar la final sistemul coloidal se omogenizează prin laminare, trecându-l repetat prin diuze cu miez conic și secțiuni inelară variabilă.

15. Procedeu conform revendicărilor 1, 3 și 8, **caracterizat prin aceea că** hialuronatul de calciu se obține similar descrierii din revendicarea 14, cu excepția subpunctului (iii), în care soluția tampon utilizată este 1M imidazol, precum și a subpunctului (vi), în care DMSO nu se utilizează.

16. Procedeul conform revendicărilor 1, 4 și 8, **caracterizat prin aceea că** sarea de calciu a derivaților chitozanului se obține similar descrierii din revendicarea 14, cu excepția subpunctului (ii), în care dizolvarea se efectuează în apă deionizată, subpunctului (iii), în care soluția tampon utilizată este 1M imidazol, precum și a subpunctului (vi), în care DMSO nu se utilizează.

17. Procedeul conform revendicărilor 1 și 9, **caracterizat prin aceea că** mediile de reacție de tipul soluțiilor și suspensiilor coloidale se condiționează chimic astfel: (i) prin diafiltrare contra unor soluții de amoniac cu pH-ul de  $9,5 \div 11,0$ , (ii) apoi contra aceleiași soluții în care s-a adăugat un chelator al calciului înalt eficient, (iii) din nou contra unei soluții alcaline ce conține adjuvanți ai cristalizării hidroxiapatitei, din clasa chelatorilor biocompatibili, a oligomerilor PEG-ului, a poloxamerilor și a solvenților organici, (iv) maturarea sistemului coloidal rezultat, (v) individualizarea avansată a entităților coloidale prin ultrasonare, (vi) apoi omogenizarea caracteristicilor fizico-chimice prin laminare, trecând repetat sistemul coloidal prin diuze cu miez conic și secțiune inelară variabilă.

18. Procedeul conform revendicărilor 1 și 9, **caracterizat prin aceea că** mediile de reacție de tipul hidrogelurilor fizice laxe se condiționează chimic astfel: (i) supraîmbibare cu soluție de amoniac având pH  $9,5 \div 11,0$ , (ii) eventuala fragmentare a hidrogelului prin agitare mecanică, (iii) tratarea cu un schimbător de ioni cationic energic, în formă acidă, dozat în volumul hidrogelului sau contactat în mod repetat cu suprafețele acestuia, (iv) separarea prin sinereză a excesului de lichid, (v) maturare, (vi) supraîmbibare cu soluții alcaline ce conțin adjuvanți ai cristalizării hidroxiapatitei, din clasa chelatorilor biocompatibili, a oligomerilor PEG-ului, a poloxamerilor și a solvenților organici, (vii) condiționarea fizico-chimică prin alternarea sinerezei induse mecanic și a maturării.

19. Procedeul conform revendicărilor 1 și 10, **caracterizat prin aceea că** sinteza propriu-zisă a hidroxiapatitei în prezența sărurilor de calciu ale biomacromoleculilor și sub asistența câmpului electric aplicat din exteriorul sistemului de reacție se conduce astfel: (i) formarea preliminară a fosfatului de calciu la nivelul structurilor de agregare a biomacromoleculilor, prin dozarea a circa 1 % din volumul de soluție prevăzut prin receptură pentru precursorul care furnizează ionul fosfat în mediul de reacție, (ii) aplicarea unei prime epoci de menținere sub câmp electric, (iii) dozarea în tandem a precursorilor sintezei hidroxiapatitei, alternant cu epoci de menținere sub câmp electric, epoci a căror durată se modifică progresiv odată cu avansul sintezei, (iv) maturarea la  $15 \div 25$  °C, sub agitare și apoi static.

20. Procedeu conform revendicărilor 1, 10 și 19, **caracterizat prin aceea că** amplitudinea și eventuala variație în timp a parametrilor câmpului electric pe durata epocilor de tratare în câmp se aleg funcție de caracteristicile mediului de reacție și de componentele recepturii sintezei (natura biomacromoleculilor, natura speciilor chimice ale precursorilor și adjuvanților etc.), dintre variantele: (i) câmp electrostatic creat de o diferență de potențial de  $4 \div 60$  kV, (ii) câmp variabil în timp după legi armonice, creat de o diferență de potențial de  $\pm 8 \div \pm 12$  kV, cu frecvențe între 8 și 50 kHz în epocile de început și de 30 Hz și 5 kHz în epocile finale, în condiții de termostatare, (iii) câmp variabil după legi non-armonice (rampă, impuls dreptunghiular etc.), sub diferențe de potențial variind între zero și  $20 \div 60$  kV, cu frecvențe de  $0,01$  Hz  $\div$  1 kHz și factor de umplere (acolo unde este cazul) de  $1 \div 10$  %, corelat cu frecvența și cu amplitudinea, în condiții de termostatare și de prevenire a descărcărilor electrice între plăcile condensatoarelor ce aplică diferența de potențial (acolo unde este cazul).

21. Procedeu conform revendicărilor 1, 10 și 19, **caracterizat prin aceea că** echipamentele / utilajele prin intermediul cărora se induce câmpul electric pot fi (i) de construcție specială, sau modificate pornind de la (ii) instalații de filtrare în câmp electrostatic, (iii) instalații de electroprecipitare, (iv) sisteme pentru uscare dielectrică, (v) sisteme pentru conservarea alimentelor în câmp electric pulsatoriu; în oricare dintre cazuri, aplicarea câmpului se efectuează în sistem capacitiv, prin intermediul plăcilor unor condensatoare, plăci care nu vin în contact direct cu mediul de reacție, fiind izolate de acesta din urmă prin pereți dielectricsi sau prin straturi de aer ce previn descărcarea electrică între plăci.

22. Procedeu conform revendicărilor 1, și 11, **caracterizat prin aceea că** separarea produșilor utili de reacție din soluțiile și dispersiile coloidale rezultate la finalul sintezei se realizează astfel: (i) compactare în câmp centrifugal moderat (300 g) și spălare în centrifugă cu apă deionizată, sterilă, liberă de pirogeni, (ii) resuspendare în soluții de chelatori moderați ai calciului și separare centrifugală, repetate până la individualizarea particulelor dispersiei și formarea unui sediment onctuos, (iii) resuspendare repetată în apă deionizată, sterilă, liberă de pirogeni, până la îndepărtarea chelatorului în exces și a complexilor chelatici, (iv) resuspendare în sistem tampon organic cu pH 7,4, completat cu un compus sursă de ioni  $\text{PO}_4^{3-}$  în ușor exces, un compus ce previne supraasocierea particulelor, un compus pentru tamponarea red-ox și un antibiotic cu spectru larg, stabil pe durate lungi în medii umede, (v) maturare statică la rece, în condiții sterile, (vi) condiționare fizico-chimică și

sinereză controlată în câmp ultrasonic, (vii) compactare în câmp centrifugal moderat (300 g) și spălare în centrifugă cu soluția tampon descrisă la subpunctul (iv), separare centrifugală, (viii) maturarea sedimentului onctuos rezultat.

23. Procedeu conform revendicărilor 1, și 11, **caracterizat prin aceea că** separarea produșilor utili de reacție generați prin sinteză în volumul unor hidrogeluri fizice laxe se realizează astfel: (i) prin dezagregarea hidrogelurilor urmată de (i.1) spălare prin resuspendare în apă deionizată, sterilă, liberă de pirogeni și apoi compactare centrifugală (la 300 g), (i.2) liofilizare, (i.3) destructurarea liofilizatului, (i.4) cernerea liofilizatului destructurat pe sorturi granulometrice, (i.5) rehidratarea separată a sorturilor granulometrice de liofilizat destructurat utilizând soluții tampon cu compoziția descrisă în revendicarea 22, subpunctul (iv), (i.6) omogenizarea fracțiilor rehidratate prin recirculare în șnec termostatat, respectiv (ii) fără destructurarea hidrogelurilor, prin (ii.1) spălare cu apă deionizată, sterilă, liberă de pirogeni, până la constanța pH-ului, (ii.2) ultrasonarea repetată a straturilor de hidrogel în soluții tampon cu compoziția descrisă în revendicarea 22, subpunctul (iv), urmată de scurgere avansată sub vibrație mecanică și intercalată cu perioade de maturare la rece, în condiții sterile, (ii.3) liofilizare, (ii.4.) eventuală rehidratare controlată în soluții tampon cu compoziția descrisă în revendicarea 22, subpunctul (iv).