



A61L 27/52 (2006.01);
A61L 27/20 (2006.01);
A61L 27/22 (2006.01);
A61L 27/26 (2006.01)

(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2016 00926**

(22) Data de depozit: **28/11/2016**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **29/05/2020** BOPI nr. **5/2020**

(41) Data publicării cererii:
30/05/2018 BOPI nr. **5/2018**

(73) Titular:

- **UNIVERSITATEA POLITEHNICA DIN BUCUREȘTI, SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR.313, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **INSTITUTUL NAȚIONAL DE CERCETARE "CANTACUZINO", SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR. 103, CP 1-525, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **MEDICAL ORTOVIT S.R.L., STR. MIRON COSTIN NR. 8, BUCUREȘTI, B, RO**

(72) Inventatori:

- **STANCU IZABELA-CRISTINA, CALEA GRIVIȚEI NR. 232, BL. 2, SC. F, ET. 1, AP. 167, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **CECOLTAN SERGIU, ȘOS. OLTENIȚEI NR. 17J, BL. 7, AP. 13, POPEȘTI-LEORDENI, IF, RO;**
- **PETRE DANIELA GETA, STR. ELEV ȘTEFĂNESCU ȘTEFAN NR. 51, BL. 422, SC. A, AP. 32, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **LUNGU ADRIANA, STR. DRUMUL TABEREI NR. 96, BL. 521, AP. 14, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **SERAFIM ANDRADA, STR. ION MIHALACHE NR. 148, BL. 8, SC. A, ET. 9, AP. 37, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **DRAGUȘIN DIANA-MARIA, STR. CONSTANTIN MOISIL NR. 1, BL. 4, SC. D, AP. 2, PITEȘTI, AG, RO;**

- **VASILE EUGENIU, STR.NADA FLORILOR NR.2, BL.2, SC.2, ET.7, AP.74, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **MARINESCU RODICA, STR.EROU IANCU NICOLAE NR.12-26, VILA 70, VOLUNTARI, IF, RO;**
- **SALAGEANU AURORA, STR. MARIA ROSETTI NR. 10, AP. 28, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **TUCUREANU CĂTĂLIN, STR. CETATEA HISTRIA NR. 5, BL. MIIB/15, SC. A, AP. 22, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **CARAS IULIANA, STR. VLĂDEASA NR. 4, BL. C75, SC. 1, ET. 3, AP. 18, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **TOFAN VLAD-CONSTANTIN, STR. SERGENT MAJOR CARA ANGHEL NR. 12, BL. C8, SC. D, ET. 4, AP. 39, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **ISTODORESCU MIRCEA, BLD.GLORIEI, NR.20, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO**

(56) Documente din stadiul tehnicii:

I. C. STANCU & AL., "POROUS CALCIUM ALGINATE INTERPENETRATED MATRIX AND ITS BIOMINERALIZATION POTENTIAL", J. MATER. SCI: MATER MED, VOL. 22, PP. 451-460, 2011;
T. R. CUADROS & AL., "POROUS MATRIX AF CALCIUM ALGINATE/GELATIN WITH ENHANCED PROPERTIES AS SCAFFOLD FOR CELL CULTURE", JOURNAL OF MECHANICAL BEHAVIOR OF BIOMEDICAL MATERIALS, VOL. 46, PP. 331-342, 2015;
US 2012/0270810 A1; WO 2008/076407 A2; WO 2016/007879 A1

(54)

PROCEDEU DE OBTINERE A UNOR SUBSTRATURI BIONANOCOMPOZITE HIDRATATE PENTRU CREȘTERE CELULARĂ ȘI REGENERARE/MODELARE TISULARĂ



1 Prezenta invenție se referă la un procedeu de obținere a unor substraturi bionano-
2 compozite hidratate cu componentă polipeptidică reticulată enzimatic, pentru creștere
3 celulară și regenerare/modelare tisulară, într-o varietate de forme și dimensiuni. Biocompo-
4 zitele au faza organică pe bază de gelatină din piele din pește de apă rece (GP), alginat de
5 calciu (AlgCa) și fază minerală fosfo-calcică similară mineralului din țesuturile dure.

6 Dezvoltarea de noi substraturi pentru creșterea de celule și regenerare/modelare
7 tisulară reprezintă o prioritate în domeniul biomaterialelor. Una dintre cele mai promițătoare
8 abordări, folosită și în cadrul prezentei invenții, constă în dezvoltarea unor substraturi inspi-
9 rate din caracteristicile compoziționale, morfostructurale și funcționale ale matricei extra-
10 celulare (MEC). MEC prezintă specificitate anatomo-fiziologică, și constă într-o rețea hidra-
11 tată acelulară, complexă din punct de vedere compozițional, în care sunt dispuse celule și
12 vase de sânge. În țesuturile dure MEC este un material bifazic, bionanocompozit, a cărui
13 principală componentă organică este reprezentată de colagen. Proteoglicanii și glicozamino-
14 glicanii sunt, la rândul lor, constituenți organici importanți, cu rol în menținerea apei în țesut.
15 Faza minerală este reprezentată de cristale nanometrice de hidroxiapatită, formate pe fibrele
16 de colagen. Colagenul este o proteină structurală intens investigată și utilizată ca atare sau
17 în combinație cu alte componente, într-o gamă largă de aplicații biomedicale. Prin prelucra-
18 rea soluțiilor de colagen se pot obține geluri, filme, membrane și acoperiri biofuncționale,
19 exemple de procedee de obținere fiind descrise în documentele: **US 2012/0114763 A1**,
20 **RO 122673 B1**, **US 2006/0199170 A1**, **RO 120820 B1**. Utilizarea colagenului fibrilar în astfel
21 de produse este limitată de solubilitatea redusă a acestuia, concentrația uzuală fiind mai
22 mică de 4% (w/v), iar riscul de alterare structurală la sterilizare este crescut
23 (**Parenteau-Bareil, R., Gauvin, R., & Berthod, F. (2010), Collagen-based biomaterials**
24 **for tissue engineering applications, Materials (Basel), 3(3), 1863-1887,**
25 **<http://doi.org/10.3390/ma3031863>**). Gelatina păstrează avantajele compoziționale ale
26 colagenului, oferind posibilitatea de a crește semnificativ conținutul de proteină în diversele
27 tipuri de substraturi. În prezent se utilizează gelatina de origine bovină, porcină, recombi-
28 nantă și din piele de pește. Avantajele utilizării gelatinei din piele de pește (GP) în aplicații
29 biomedicale sunt evidențiate recent deoarece oferă o soluție unor constrângeri socio-cul-
30 turale, și elimină riscul de transmitere a unor boli precum encefalopatia spongiformă bovină,
31 datorită unei distanțe filogenetice mari și absenței unor patogeni comuni (**Serafim, A.,**
32 **Cecoltan, S., Lungu, A., Vasile, E., Iovu, H., & Stancu, I. C. (2015), Electrospun fish**
33 **gelatin fibrous scaffolds with improved bio-interactions due to carboxylated**
34 **nanodiamond loading, RSC Adv., 5(116), 95467-95477,**
35 **<http://doi.org/10.1039/C5RA14361F>**).

36 GP este utilizată pentru blocarea reacțiilor specifice de tip antigen-anticorp, avantajul
37 fiind lipsa reacțiilor încrucișate cu anticorpii de mamifere. În plus, gelifierea unor tipuri de GP,
38 mai specific, gelatină din piele de pește de apă rece, are loc la temperaturi reduse (sub 8°C),
39 permițând o manipulare facilă la temperatura camerei a soluțiilor cu concentrație mare
40 (20...50%) (A. Serafim et al., 2015). Acest comportament reprezintă un avantaj de fabricare
41 important față de gelatinele mamifere ce necesită aport termic, și a căror procesare este
42 limitată la concentrații mai mici (<20%). Solubilitatea gelatinelor în medii apoase, și degrada-
43 rea prin mecanism enzimatic conduc la necesitatea fixării acestor substraturi prin reticulare,
44 pentru anumite aplicații. Reticularea se poate realiza fizic, chimic sau enzimatic. Cele mai
45 utilizate metode chimice de reticulare a colagenului și gelatinei se bazează pe: 1) reacții între
46 funcțiuni amină primară și aldehide precum formaldehidă și glutaraldehidă (**Sung, H. W.,**
47 **Huang, D. M., Chang, W. H., Huang, R. N., & Hsu, J. C. (1999), Evaluation of gelatin**
48 **hydrogel crosslinked with various crosslinking agents as bioadhesives: In vitro study,**

Journal of Biomedical Materials Research, 46(4), 520-530, 1
[http://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4636\(19990915\)46:4<520:AID-JBM10>3.0.CO;2-9,](http://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4636(19990915)46:4<520:AID-JBM10>3.0.CO;2-9)
WO2009/109963 A1, WO2011/124640 A1), 2) reacții cu carbodiimide (de exemplu, sistemul 3
 EDC-NHS (EDC: 1-etil-3-(3-dimetil aminopropil) carbodiimidă și NHS: N-hidroxisuccinimidă))
 (US 20120114763 A1, WO 2013/121429 A1) și, mai recent, 3) prin fotopolimerizare cu 5
 formare de rețea utilizând fotoinițiatori, după modificarea în prealabil a proteinei prin introdu-
 cerea de grupări polimerizabile C=C (Drăgușin, D.-M., Van Vlierberghe, S., Dubruel, P., 7
 Dierick, M., Van Hoorebeke, L., Declercq, H. A., ... Stancu, I.-C. (2012), **Novel**
gelatin-PHEMA porous scaffolds for tissue engineering applications, Soft Matter,8(37), 9
9589, <http://doi.org/10.1039/c2sm25536g>; Hutson, C. B., Nichol, J. W., Aubin, H., Bae,
 H., Yamanlar, S., Al-Haque, S., ... Khademhosseini, A. (2011), **Synthesis and** 11
characterization of tunable poly(ethylene glycol): gelatin methacrylate composite
hydrogels, Tissue Engineering. Part A, 77(13-14), 1713-23, 13
<http://doi.org/10.1089/ten.TEA.2010.0666>; Klotz, B. J., Gawlitta, D., Rosenberg, A. J. W.
 P., Malda, J., & Melchels, F. P. W. (2016), **Gelatin-Methacryloyl Hydrogels: Towards** 15
Biofabrication-Based Tissue Repair, Trends in Biotechnology,
<http://doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.01.002>; Loessner, D., Meinert, C, Kaemmerer, E., 17
 Martine, L. C, Yue, K., Levett, P. A., ... Hutmacher, D. W. (2016), **Functionalization,**
preparation and use of cell-laden gelatin methacryloyl-based hydrogels as modular 19
tissue culture platforms, Nature Protocols, 11(4), 727-46,
<http://doi.org/10.1038/nprot.2016.037>; Nichol, J. W., Koshy, S. T., Bae, H., Hwang, C. 21
 M., Yamanlar, S., & Khademhosseini, A. (2010), **Cell-laden microengineered gelatin**
methacrylate hydrogels, Biomaterials, 57(21), 5536-5544, 23
<http://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.03.064>; Serafim, A., Tucureanu, C, Petre,
 D.-G., Dragusin, D.-M., Salageanu, A., Van Vlierberghe, S., ... Stancu, I.-C. (2014), 25
One-pot synthesis of superabsorbent hybrid hydrogels based on methacrylamide
gelatin and polyacrylamide, Effortless control of hydrogel properties through 27
composition design, New Journal of Chemistry, 38(7), 3112
<http://doi.org/10.1039/c4nj00161c>; Yue, K., Trujillo-de Santiago, G., Alvarez, M. M., 29
 Tamayol, A., Annabi, N., & Khademhosseini, A. (2015), **Synthesis, properties, and**
biomedical applications of gelatin methacryloyl (GelMA) hydrogels, Biomaterials, 31
<http://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.08.045>; Zhao, X., Lang, Q., Yildirim, L., Lin,
 Z. Y., Cui, W., Annabi, N., ... Khademhosseini, A. (2016), **Photocrosslinkable Gelatin** 33
Hydrogel for Epidermal Tissue Engineering, Advanced Healthcare Materials, 5(1), 108-
118, <http://doi.org/10.1002/adhm.201500005>). Reticulările cu carbodiimide, prin poli- 35
 merizare cu formare de rețea sau enzimatică sunt preferate celor cu aldehide din perspectiva
 reducerii riscului de potențială toxicitate (Lai, J. Y. (2012), **Biocompatibility of genipin and** 37
glutaraldehyde cross-linked chitosan materials in the anterior chamber of the eye.
International Journal of Molecular Sciences, 13(9), 10970-10985, 39
<http://doi.org/10.3390/ijms130910970>; Lai, J.-Y., Li, Y.-T., & Wang, T.-P. (2010), **In vitro**
response of retinal pigment epithelial cells exposed to chitosan materials prepared 41
with different cross-linkers, International Journal of Molecular Sciences, 11(12), 5256-
5272, <http://doi.org/10.3390/ijms11125256>) asociat uneori cu reticularea cu aldehide. 43

Dezvoltarea de bioadezivi, biomateriale injectabile și de sigilare a rănilor a stimulat 45
 găsirea unor metode de generare *in situ*, în condiții fiziologice, a rețelelor macromoleculare
 pornind de la precursori netoxici, precum colagen și gelatină. **WO 2013/121429 A1** se referă 47
 la bioadezivi pe bază de gelatină combinată cu alginat, reticulabili *in situ* utilizând sistemul
 EDC/NHS. O serie de bioadezivi pe bază de gelatină porcină și alte componente, inclusiv

1 alginat, a fost descrisă în Sung, H. W., Huang, D. M., Chang, W. H., Huang, R. N., & Hsu,
2 J. C. (1999), Evaluation of gelatin hydrogel crosslinked with various crosslinking
3 agents as bioadhesives: In vitro study, *Journal of Biomedical Materials Research*,
4 **46(4)**, 520-530, ([http://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4636\(19990915\)46:4](http://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4636(19990915)46:4<520::AID-JBM10)
5 [520::AID-JBM10](http://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4636(19990915)46:4<520::AID-JBM10)
6 [> 3.0.CO;2-9](http://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4636(19990915)46:4<520::AID-JBM10)), în care sistemul gelatină porcină - alginat a fost reticulat folosind carbo-
7 diimidă, la pH de 4,5. În literatură sunt raportate și alte sisteme gelatină-alginat, în care, spre
8 deosebire de prezenta invenție, gelatina este reticulată cu aldehidă glutarică (Stancu, I.C.,
9 Dragusin, D.M., Vasile, E., Trusca, R., Antoniac, L., Vasilescu, D.S. (2011), Porous
10 calcium alginate-gelatin interpenetrated matrix and its biomineralization potențial,
11 *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, **22(3)**, 451-460,
12 <https://doi.org/10.1007/s10856-011-4233-7>) sau nu este reticulată, fiind utilizată în principal
13 ca agent porogen (Cuadros, T.R., Erices, A.A., Aguilera, J.M. (2015), Porous matrix
14 calcium alginate/gelatin with enhanced properties as scaffold for cell culture, *Journal*
15 *of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, **46**, 331-342, [http://doi:](http://doi:10.1016/j.jmbbm.2014.08.026)
16 [10.1016/j.jmbbm.2014.08.026](http://doi:10.1016/j.jmbbm.2014.08.026)).

17 O metodă bioinspirată de reticulare a colagenului și gelatinei constă în folosirea
18 enzimelor ce participă la structurarea colagenului din țesuturi (Ehrbar, M., Rizzi, S. C,
19 Hlushchuk, R., Djonov, V., Zisch, A. H., Hubbell, J. A., ... Lutolf, M. P. (2007), Enzymatic
20 formation of modular cell-instructive fibrin analogs for tissue engineering,
21 *Biomaterials*, **28(26)**, 3856-3866, <http://doi.Org/10.1016/j.biomaterials.2007.03.027>).
22 **US 2011/0110882 A1** descrie utilizarea transglutaminazei (TGase) pentru reticularea poli-
23 peptidelor, inclusiv a gelatinei, vizând în special acțiunea hemostatică și de sigilare tisulară,
24 cu stoparea pierderii de fluide corporale. Același document indică și posibilitatea includerii
25 alginatului în compoziția de reticulat, rolul alginatului fiind însă numai de aditiv ce mărește
26 viscozitatea precursorului ce urmează a fi reticulat. Spre deosebire de acest caz, în prezenta
27 invenție, alginatul se utilizează pentru mimarea componentelor proteoglicani și glicozamino-
28 glicani din MEC. **US 2016/178611 A1** prezintă utilizarea reticulării cu TGase pentru gene-
29 rarea de modele de investigare tumorală, constând din matrice tridimensionale pe bază de
30 gelatină (gelatină bovină, concentrația 6%) pentru creșterea de sferoizi tumorali.
31 **US 2012/0270810 A1** descrie modificarea agenților de reticulare enzimatici pentru controlul
32 superior al proprietăților matricelor reticulate. Față de acesta, în prezenta invenție se utili-
33 zează TGase pentru reticularea enzimatică a gelatinei, cu formarea unui bionanocompozit.

34 Biocompozitele pe bază de colagen și mineral fosfo-calcic similar fazei minerale din
35 țesuturile dure au fost investigate intens în ultimii ani, din dorința de producere a unor
36 substraturi implantabile, cu performanțe superioare, pentru umplerea defectelor osoase și
37 regenerare tisulară, așa cum raportează în **US 5455231 A**, **US 5231169 A**, **WO 1993/012736**
38 **A1**, **US 5320844 A**. Asemenea materiale sunt recunoscute pentru stimularea aderenței celu-
39 lilor și osteointegrării. **WO 2016/156992 A2** raportează utilizarea TGase pentru reticularea
40 colagenului și gelatinei, în vederea obținerii unor compoziții injectabile, scaffold-uri și adezivi
41 tisulari. Se menționează și posibilitatea combinării cu compuși osteoconductivi, precum
42 hidroxiapatită și fosfat tricalcic. În ultimii ani, atenția specialiștilor s-a îndreptat către utilizarea
43 unor procedee biomimetice sau bioinspirate de sinteză/fabricare, în care nanocristalele mine-
44 rale se formează direct în rețeaua macromoleculară fibrilară. **RO 127725 B1**, **US 5320844 A**,
45 **US 6384196 B1**, **US 6384197 B1**, **US 6300315 B1** și **US 6417166 B2** raportează generarea
46 de biocompozite colagen/mineral prin utilizarea precursorilor anorganici în compoziție. **US**
47 **20060204581 A1** și **US 6589590 B2** indică generarea mineralului în rețeaua polimerică prin
48 dubla difuzie a ionilor de calciu și fosfat.

RO 132544 B1

În prezent, numeroase substraturi pentru tratament plăgi și regenerare tisulară sunt obținute/comercializate sub formă deshidratată/lioofilizate, cu forme și dimensiuni prestabilite, care de multe ori limitează utilizarea sau presupun pași suplimentari preparativi (de exemplu, decuparea în forma și dimensiunea dorite, hidratarea sau echilibrarea în mediu) înainte de utilizării. Pulberea absorbabilă sterilă Gelfoam® (obținută din burete absorbabil), din gelatină porcină, este recomandată ca material hemostatic cu aplicații inclusiv în sângerări la nivelul osului spongios, cu atenționarea evitării aglomerării la nivelul cavităților osoase datorită potențialelor riscuri asociate gonflării materialului ("DESCRIPTION," n.d.). Un alt produs de tip burete hemostatic din gelatină, SURGISPON, absoarbe de 40...50 de ori greutatea sa în apă sau sânge, presupunând manevrare suplimentară, iar produsul este complet degradabil în 3...4 săptămâni (2016-10-14, Absorbable Haemostatic Gelatin Sponge - Absorbable Haemostatic Gelatin Sponge Exporter, Manufacturer & Supplier, Ahmedabad, India, www.surgispon.com/absorbable-haemostatic-gelatin-sponge-719333.html). Alte produse absorbabile pe bază de bureți/particule de gelatină sunt Spongostan, Ethicon® SURGIFOAM®, KolSpon® Plug. În acest context, principalul dezavantaj practic al produselor existente este necesitatea efectuării unor etape preparative suplimentare înainte de utilizare, precum și riscul de gonflare necontrolată în situsul de aplicare.

În aceste condiții, în prezent sunt necesare substraturi pentru stimularea biointeracțiilor cu celulele și regenerare/modelare tisulară, cu manevrabilitate și performanțe superioare.

Principala problemă tehnică rezolvată de prezența invenției constă în posibilitatea de generare *in situ* (în plăci de cultură, în matrițe cu formă și dimensiunile adecvate utilizării finale, sau direct în defecte tisulare cu formă și dimensiuni variabile), printr-un procedeu biomimetic, netoxic, a unor substraturi biocompozite hidratate, cu compoziție și microstructură bioinspirate de MEC a țesutului osos, care stimulează interacțiuni celulare și procese de regenerare tisulară. Faza organică a biocompozitelor descrise este formată din GP care mimează colagenul din MEC, și AlgCa care mimează componentele polizaharidice, iar faza minerală este reprezentată de nanocristale de apatită similare mineralului din os. Formarea rețelei macromoleculare stabilizate enzimatic (componenta GP) și ionic (componenta AlgCa) are loc în paralel cu mineralizarea acesteia, cu generare de nanoparticule fosfo-calcice similare fazei minerale osoase. Procedeu descris permite obținerea substraturilor fără constrângeri legate de forma și dimensiunile matriței/defectului, în condiții preparative blânde, biomimetice, permițând și o potențială încărcare cu medicamente sau factori bioactivi.

Procedeu conform invenției, de obținere a unor substraturi bionanocompozite hidratate, constă în aceea că:

a) se pregătește un amestec de polimeri ce conține 10% gelatină de pește, respectiv, 2% alginat de sodiu, procentele fiind exprimate gravimetric, prin combinarea în proporție de 1:1 a unei soluții de 20% gelatină de pește în 65 mM tampon fosfat salin, și a unei soluții de 4% alginat de sodiu în 65 mM tampon fosfat salin, pH de 7,4 la 37°C;

b) se reticulează enzimatic gelatina de pește, prin adăugarea peste amestecul de polimeri obținut la punctul a) de transglutaminază 5 unități/g gelatină de pește, iar soluția astfel generată se toarnă într-un spațiu de formă dorită, pentru definitivarea reticulării gelatinei de pește timp de 8 h la 37°C, și obținerea unei matrice polimerice de tip rețea semi-interpenetrată;

c) se imersează sistemul rezultat la punctul b) într-o soluție de clorură de calciu 0,45 M, timp de 2 h, în final obținându-se bionanocompozite hidratate pe bază de hidrogel gelatină de pește - alginat de calciu mineralizat *in situ*, cu fază minerală fosfo-calcică, ce permite aderența și proliferarea celulară.

RO 132544 B1

1 Tamponul fosfat salin se adaugă datorită conținutului său de fosfat, ca precursor
2 pentru generarea fazei minerale fosfo-calcice.

3 Difuzia clorurii de calciu produce trei tipuri de efecte: (i) reticularea alginatului de
4 sodiu cu generare de alginat de calciu, (ii) formarea fazei minerale fosfo-calcice (prin com-
5 binarea calciului din clorura de calciu cu fosfați din tamponul fosfat salin) distribuită în
6 matricea polimerică, și (iii) inactivarea reacției de reticulare enzimatică a gelatinei de pește.

7 Avantajele aplicării invenției față de stadiul tehnicii actual sunt următoarele:
8 - ușurința de umplere a unor defecte tisulare, plăci de cultură și matrițe cu diversitate
9 de forme și dimensiuni, pentru inginerie tisulară/regenerativă;
10 - reacția de reticulare a proteinei la temperatură fiziologică;
11 - mineralizare derulată în paralel cu reticularea alginatului;
12 - obținerea acestor produse nu implică folosirea unor agenți de reticulare ce conțin
13 grupări aldehidice, sau a altor compuși ce pot genera un răspuns citotoxic;
14 - produsul se obține direct în stare hidratată, cu stabilitate în medii simulate, cât și în
15 mediu de culturi celulare, și poate fi conservat minimum 6 luni;
16 - produsul interacționează favorabil cu celule datorită compoziției și structurii sale bio-
17 inspirate din MEC.

18 Această invenție prezintă potențial de a fi implementată și aplicată, ținând cont de
19 interesul manifestat în prezent, de utilizare a unor metode netoxice de reticulare, fixare și
20 structurare, de obținere a unor substraturi biocompatibile cu utilizări în culturi celulare și
21 regenerare tisulară care să prezinte elemente compoziționale și microstructurale biomimetice
22 sau bioinspirate, și, foarte important, de eliminare a restricțiilor de formă și dimensiune, sau
23 a necesității de pregătire/manevrare suplimentară a eșantioanelor.

24 Se dau în continuare trei exemple de realizare a invenției în legătură cu fig. 1...3, ce
25 reprezintă:

26 - fig. 1, bionanocompozit GP-AlgCa-mineral fosfo-calcic (exemplul 1): A - membrană
27 albă hidratată; B, C - caracteristici microstructurale la suprafața biocompozitului, specifice
28 pentru bionanocompozite (microscopie electronică de baleiaj-SEM), B: 10000x, C: 50000x;
29 D - prelungiri celulare (preosteoblast MG63) aderate pe suprafața nanostructurată a biocom-
30 pozitului la 72 h post-însămânțare (SEM 50000x);

31 - fig. 2, GP-AlgCa-fază minerală (obținut în exemplul 2) cu aspect microstructural
32 specific de bionanocompozit: A - caracteristici microstructurale în profunzimea biocompozi-
33 tului (fractură) (SEM 50000x); B - spectrul EDAX relevant pentru natura fosfo-calcică a fazei
34 minerale din bionanocompozit, cu un raport Ca/P 1,5 similar apatitei biologice din țesutul
35 osos; C - caracteristici microstructurale la suprafața biocompozitului, similare apatitei biolo-
36 gice din țesutul osos (SEM 50000x); D - prelungire celulară (preosteoblast MG63) aderată
37 pe suprafața biocompozitului la 24 h post-însămânțare (SEM 50000x);

38 - fig. 3, evaluarea biocompatibilității materialelor obținute conform procedeelelor din
39 exemplele 1 și 2, utilizând linia de preosteoblaste MG63: a) testarea *in vitro* a viabilității
40 celulare prin testul MTT; b-e) imagini de microscopie de fluorescență la 7 zile de la însămân-
41 țare (roșu - colorație cu Phalloidin-TRCT pentru actină, verde - colorație cu Syber green
42 pentru nucleii); b), d) mărire 5X, c), e) 20X.

43 În această invenție s-au folosit următoarele materiale: alginat de sodiu din alge brune
44 cu viscozitate medie, fosfat de sodiu dibazic, fosfat de sodiu monobazic, soluție tampon de
45 fosfat de sodiu (TFS) 65 mM, pH de 7,4, gelatină din piele de pește de apă rece, transglut-
46 aminază microbială 2U-5U/ml, HEPES (acid (4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazin etan sulfonic))
47 soluție de 25 mM, pH de 7,4, NaOH 1M, clorură de calciu dihidrat 450 mM, apă dublu
48 distilată (aparat de bidistilare GFL), filtre de 0,2 μm (Merk Millipore), plăci de sticlă model
49 Bio-Rad Mini-PROTEAN cu spațiator de 1 mm.

RO 132544 B1

Se dau, în continuare, trei exemple de realizare a invenției, în legătură cu fig. 1, ce reprezintă metode de realizare a gelurilor bionanocompozite GP-AlgCa-fază minerală, cu caracteristici microstructurale de tip nanocompozit hidrogel GP-AlgCa încărcat cu fază minerală similară celei din os, constând în cristale aciculare și plachete cu morfologie și raport Ca/P specifice apatitei biologice (fig. 1A, B).

Exemplul 1

Pentru obținerea unor membrane hidratate, cu grosime prestabilă, au fost folosite o soluție de 20% m/v GP și o soluție AlgNa de 4% m/v preparată la temperatura 70°C, timp de 3 h, polimerii fiind dizolvați în TFS 65 mM, pH de 7,4. Cele două soluții de polimeri, 20% m/v GP și AlgNa de 4% m/v, sunt combinate în raport de 1:1, omogenizate timp de 2 h la temperatura de 37°C, concentrația finală de polimeri fiind 10%GP și 2% AlgNa, apoi sunt răcite pe baie de gheață până la T de 4°C, cu agitare continuă. Peste soluția rece de polimeri se adaugă Tgase sub formă de pulbere cu concentrația finală de 5 unități/g GP, se omogenează în continuare pe baie cu gheață timp de 1 h. Soluția finală este turnată între plăci de sticlă între care se fixează un spațiator siliconic, și apoi se incubează la 37°C timp de 8 h, pentru reticularea enzimatică a GP. Ansamblul este transferat în baie de clorură de calciu de 0,45 M, și incubat la temperatura camerei timp de 2 h. În timpul incubării în clorură de calciu are loc, prin difuzia cationilor Ca²⁺, reticularea AlgNa cu formare de AlgCa în același timp cu nucleerea fazei minerale fosfo-calcice de tip nano-apatită, distribuită uniform în toată matricea polimerică (fig. 1). Membrana de biocompozit GP-AlgCa-fază minerală este spălată cu apă bidistilată, pentru înlăturarea excesului de clorură de calciu și clorură de sodiu. Membrana obținută este hidratată și are dimensiuni predefinite corespunzătoare dimensiunii plăcilor de sticlă și distanței dintre acestea; reticularea enzimatică a GP stabilizează membrana suficient pentru ca aceasta să își conserve forma și după tratamentul cu clorură de calciu. Membrana este albă și catifelată (datorită prezenței fazei minerale fosfo-calcice) (fig. 1A).

Exemplul 2

Membrana biocompozită este obținută conform procedurii descris în exemplul 1, cu următoarea deosebire: după etapa de reticulare/mineralizare descrisă în exemplul 1, după îndepărtarea din baia de clorură de calciu, produsul este imersat în TFS (100 mM, pH de 7,4) timp de 1 h, la temperatura camerei. Această etapă permite difuzia suplimentară a ionilor fosfat din TFS în substratul mineralizat ce conține cationi de calciu imobilizați fizic, conducând la încărcarea suplimentară a materialului cu mineral fosfo-calcic (fig. 2). Se observă o densitate mai mare a cristalelor minerale distribuite în matricea polimerică, precum și o dimensiune mai mare a acestora față de materialul bionanocompozit obținut în exemplul 1.

Toate materialele obținute favorizează adeziunea celulelor pe suprafață (fig. 3). La timpii de incubare până la 72 h nu se observă diferențe semnificative de proliferare celulară între probele analizate (o ușoară creștere se remarcă la compozitul obținut conform exemplului 1). La timpii de incubare de 7 și 14 zile se poate observa o mai mare diferență în proliferare celulară în favoarea materialului obținut conform exemplului 1 (fig. 3a). Imaginile de microscopie de fluorescență sunt relevante pentru morfologia și etalarea celulelor pe substraturi (fig. 3 b-e). O aderare mai uniformă se poate observa pe compozitul obținut conform exemplului 1, în concordanță cu rezultatele testului MTT.

Exemplul 3

Pentru obținerea substratului în plăci de cultură, se procedează conform procesului descris în exemplul 1 sau 2, cu deosebirea că turnarea soluției se realizează direct în godeurile plăcii.

RO 132544 B1

Revendicări

1

3 1. Procedeu de obținere a unor substraturi bionanocompozite hidratate, **caracterizat prin aceea că:**

5 a) se pregătește un amestec de polimeri ce conține 10% gelatină de pește, respectiv,
7 2% alginat de sodiu, procentele fiind exprimate gravimetric, prin combinarea în proporție de
9 1:1 a unei soluții de 20% gelatină de pește în 65 mM tampon fosfat salin, și a unei soluții de
11 4% alginat de sodiu în 65 mM tampon fosfat salin, pH de 7,4, la 37°C; b) se reticulează enzi-
13 matic gelatină de pește prin adăugarea peste amestecul de polimeri obținut la punctul a) de
15 transglutaminază 5 unități/g gelatină de pește, iar soluția astfel generată se toarnă într-un
spațiu de formă dorită, pentru definitivarea reticulării gelatinei de pește timp de 8 h la 37°C,
și obținerea unei matrice polimerice de tip rețea semi-interpenetrată; c) se imersează sis-
temul rezultat la punctul b) într-o soluție de clorură de calciu 0,45 M, timp de 2 h, în final
obținându-se bionanocompozite hidratate pe bază de hidrogel gelatină de pește - alginat de
calciu mineralizat *in situ* cu fază minerală fosfo-calcică, ce permite aderarea și proliferarea
celulară.

17 2. Procedeu conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** spațiul cu formă
dorită este un vas Petri, o placă de cultură sau o placă de sticlă cu spațiator.

19 3. Procedeu conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că**, pentru creșterea
21 conținutului de fază minerală a bionanocompozitelor hidratate, după etapa de reticulare și
după îndepărtarea din baia de clorură de calciu, bionanocompozitul hidratat este imersat în
tampon fosfat salin, 100 mM, pH de 7,4, timp de 1 h, la temperatura camerei.

(51) Int.Cl.

A61L 27/52 (2006.01);

A61L 27/20 (2006.01);

A61L 27/22 (2006.01);

A61L 27/26 (2006.01)

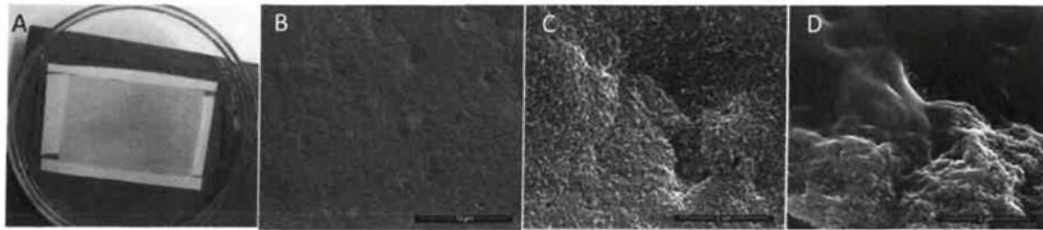


Fig. 1

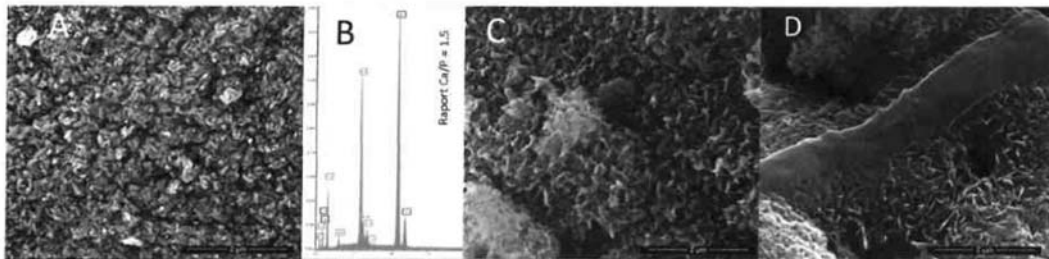


Fig. 2

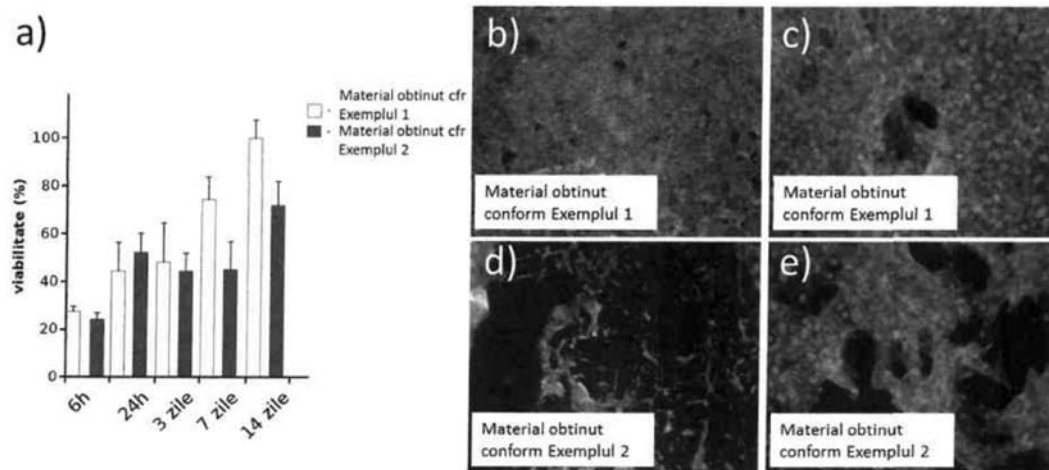


Fig. 3

