



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2017 01142**

(22) Data de depozit: **19/12/2017**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **28/02/2022** BOPI nr. **2/2022**

(41) Data publicării cererii:
28/06/2019 BOPI nr. **6/2019**

(73) Titular:
• **INSTITUTUL DE CHIMIE
MACROMOLECULARĂ "PETRU PONI" DIN
IAȘI, ALEEA GRIGORE GHICA VODĂ
NR.41 A, IAȘI, IS, RO**

(72) Inventatori:
• **CHIRIAC AURICA,
STR.ALEXANDRU VLAHUȚĂ NR.7B, AP.16,
IAȘI, IS, RO;**
• **NIȚĂ LOREDANA ELENA, BD.COPOU
NR.42, BL.A 3, SC.B, PARTER, AP.3, IAȘI,
IS, RO;**
• **DIACONU ALINA, STR. VIILOR NR. 17,
TÂRGU BUJOR, GL, RO;**

• **RUSU ALINA GABRIELA,
STR.1 DECEMBRIE 1918, NR.8, BL.B4BIS,
SC.A, ET.4, AP.20, PAȘCANI, IS, RO;**
• **NEAMȚU IORDANA,
STR.THEODOR PALLADY NR.8, SC.B,
AP.9, IAȘI, IS, RO;**
• **TUDORACHI NIȚĂ, STR. DECEBAL
NR. 14, SC. A, AP. 19, IAȘI, IS, RO**

(56) Documente din stadiul tehnicii:
**I. NEAMȚU, A. G. RUSU, A. DIACONU, L. E.
NIȚĂ ȘI A. P. CHIRIAC, "BASIC
CONCEPTS AND RECENT ADVANCES IN
NANOGELS ASCARRIERS FOR MEDICAL
APPLICATIONS", VOL. 24(1),
PP. 539-557, 2017; EP 2345419 B1**

(54) **PROCEDEU DE PREPARARE A UNUI NANOGEL
AUTOASAMBLAT**

Examinator: **biochimist EREMIA LAURA**



Orice persoană are dreptul să formuleze în scris și motivat, la OSIM, o cerere de revocare a brevetului de invenție, în termen de 6 luni de la publicarea mențiunii hotărârii de acordare a acesteia

RO 133399 B1

1 Invenția se referă la un procedeu de preparare a unui nanogel autoasamblat pe bază
de copolimer poli(3,9-divinil-2,4,8,10-tetra-oxaspiro[5.5] undecan-co-anhidridă itaconică)
3 matrice și colesterol ca gelifiant cu masa moleculară mică, cu proprietăți responsive la modi-
ficarea temperaturii, destinat înglobării de substanțe bioactive, cu aplicații terapeutice ca
5 sistem pentru transportul și eliberarea controlată a medicamentelor, sau ca structură
receptivă pentru sisteme tip senzor.

7 Nanogelurile sunt nanoparticule de hidrogel alcătuite din rețele tridimensionale 3D
de lanțuri polimerice. Nanogelurile integrează caracteristicile și avantajele unui sistem hidro-
9 gel (hidrofilie, capacitate mare de încapsulare etc) cu cele ale formulărilor la scară nano-
metrică (exemplu: dimensiune redusă).

11 În domeniul biomedical nanogelurile sunt materiale promițătoare și inovative ca
dispersii de nanoparticule de gel pe bază de rețele polimerice reticulate care au fost numite
13 generația următoare de sisteme de transport a medicamentelor datorită capacității ridicate
de încapsulare a medicamentelor, uniformității, dimensiunii reglabile, preparare ușoară,
15 toxicității minime, stabilității în condiții fiziologice și responsivitate la stimuli.

17 Nanogelurile prezintă un mare potențial în chimioterapie, diagnosticare, bioimagistică,
țintire și transport la organ a substanțelor bioactive, datorat caracteristicilor și avantajelor,
cum ar fi : stabilitatea, versatilitatea, biocompatibilitatea și biodegradabilitatea, capacitatea
19 de umflare în solvenți, sensibilitatea la stimuli, suprafață specifică mare, care intervin în
proiectarea structurilor conform aplicației vizate. Ele pot fi proiectate pentru a facilita încorpo-
21 rarea unei mari varietăți de compuși și chiar particule, prin mecanisme ce au la bază o com-
binare de interacțiuni electrostatice, hidrofobe sau legături de hidrogen. Nanogelurile sunt
23 capabile să încorporeze prin bioconjugare compuși bioactivi, cum ar fi medicamente,
proteine, material genetic ADN sau ARN, vaccinuri, în nanospațiul din rețelele polimerice.
25 De asemenea, nanogelurile prezintă un răspuns rapid la factorii de micromediu, ca tempe-
ratura sau pH-ul, datorită dimensiunii la scară nanometrică. Compoziția, posibilitatea de a
27 modifica balanța hidrofil/hidrofobă prin alegerea componentelor polimerice sau prin reacții
chimice ulterioare pe polimer, dimensiunile și comportarea la umflare pot fi reglate pentru a
29 controla caracteristicile de eliberare a medicamentului în calitate de nanogel purtător de
medicamente. Cercetările recente se axează pe depășirea restricțiilor impuse de preț, unele
31 cerințe tehnologice pentru producerea la scară comercială și integrarea lor ca platformă nouă
în biomedicină.

33 Uneori, metodele de preparare ale acestor sisteme sunt complexe și includ folosirea
de substanțe potențial toxice (agenți tensioactivi, solvenți organici) care constituie un deza-
35 vantaj pentru aplicațiile biomedicale ale acestor sisteme polimerice. Ca urmare sunt neces-
sare tehnici costisitoare pentru îndepărtarea lor completă la sfârșitul procesului de preparare.

37 Nanogelurile formate prin legături necovalente cu reticulare supramoleculară includ
agregări autoasamblate controlate a polimerilor hidrofilii capabili de diverse interacțiuni fizice
39 de tip ionic, hidrofobic și/sau legături de hidrogen. Față de reticularea covalentă, reticularea
supramoleculară nu necesită agent de reticulare care eventual să genereze interacțiuni
41 nedorită cu substanțele bioactive în timpul încapsulării biomacromoleculilor. În plus,
condițiile de preparare a gelurilor reticulate supramolecular sunt blânde și se evită efectele
43 toxice adverse.

45 În clasa spiroortocarbonaților, 3, 9-divinil-2, 4, 8, 10-tetraoxaspiro [5.5] undecan este
un comonomer hidrolizabil, conținând o legătură acetalică biciclică care clivează hidrolitic.
Este stabil la valori mari ale pH-ului, dar se degradează rapid la valori mici prin desfacerea
47 grupeii acetice în aldehydă și alcool.

RO 133399 B1

Încorporarea grupelor spiroacetalice în structura polimerului de bază în nanogel induce proprietăți de solubilitate și adeziune, stabilitate oxidativă și termică, biodegradabilitate, capacitate de a forma pelicule flexibile și cu rezistență la tracțiune. De asemenea, ciclurile spiroacetalice induc interacțiuni asupra oxigenului eteric, de tip legături de hidrogen sau legăturile de coordinație cu alte grupe funcționale.

În cazul copolimerului poli(anhidridă itaconică-co-3,9-divinil-2,4,8,10-tetraoxaspiro [5,5] undecan), ambii comonomeri sunt capabili de a genera efecte speciale, de exemplu capacitatea de a reticula cu formare de geluri, biodegradabilitatea și biocompatibilitatea, sensibilitatea la pH-ul acid. Monomerul 3,9-divinil-2,4,8,10-tetraoxaspiro [5,5] undecan prezintă în structură legături duble nesaturate capabile să reacționeze pentru a forma lanțuri macromoleculare reticulate de tip rețea. În plus, ciclurile spiroacetalice dispuse de-a lungul lanțului macromolecular prin forțe de respingere sterice oferă spațiul „gază” necesar pentru înglobarea și imobilizarea prin forțe fizice de substanțe bioactive sau anorganice.

Anhidrida itaconică este un monomer obținut din resurse regenerabile (acid citric prin piroliză sau fermentația carbohidraților cu obținere de acid itaconic urmată de dehidratare). Ciclul versatil anhidridic permite reacții blânde cu diverși parteneri cum ar fi medicamente, proteine, enzime. Poate fi copolimerizată cu alți monomeri prin reacții radicalice. Deoarece formează radicali terțiari cu reactivitate mare este aplicată pentru introducerea de funcționalitate polară în polimeri.

În **US 4212955** (1980) se exemplifică o compoziție polimerică degradabilă care are în componență cel puțin un ortoester trialchilic ca substanță organică rapid autooxidabilă, aplicabil la ambalaje. Brevetul **US 6258895** (2001) prezintă sinteza de polimeri cu grupări repetabile spiro ortoesterice, cu aplicabilitate la compozitele dentare de umplură. În **US 2008/0033140** polimerii poli(ortoesterici) ca și compuși biodegradabili și compozițiile ce includ acești polimeri sunt utili pentru aplicații ca dispozitive medicale și compoziții farmaceutice, cu viteză apreciabilă de hidroliză (utilă în aplicațiile care necesită biodegradare și/sau bioerodare), fără a fi necesară doparea cu substanțe bazice sau acide (ex. lactide și/sau glicolide) pentru a stimula hidroliză.

Brevetul **US 5461140** din 1995 se referă la polimeri bioerodabili pe bază de polimeri ortoesterici care clivează în condițiile fiziologice, folosiți la eliberarea controlată a agenților terapeutici.

În brevetul **US 4549010** (1984) se descriu copolimeri bloc sau alternanți pe bază de poli(ortoesteri) care încorporează tipuri specifice de dioli în catena principală, bioerodabili în mod predictibil, hidrofilii, cu aplicații biomedicale (dispozitive de eliberare controlată a substanțelor bioactive, suturi, acoperiri bioerodabile).

În **US 5030457** din 1991 se prezintă sinteza de polimeri dintr-un monomer ortoester și un triol, cu structură flexibilă, bioerodabili, destinați dispozitivelor moi de dozare a medicamentului.

US 7070590 (2006) descrie dispozitive pentru eliberarea controlată de medicamente cu microcip, formate dintr-un substrat care include cel puțin două rezervoare și un sistem de eliberare bioerodabil care poate fi un poli (ortoester) dispus în rezervoare. Moleculele sunt eliberate din rezervoare în mod controlat, prin difuzie sau dezintegrarea acoperirii rezervorului.

Colesterolul este un sterol, cu moleculă lipidică biosintezat de toate celulele de origine animală, fiind o componentă structurală esențială a tuturor membranelor celulare. Este hidrofob sau amfifil funcție de grupele funcționale atașate moleculei sale prin diferite reacții de modificare. Colesterolul este deseori folosit ca fragment hidrofob pentru a induce

RO 133399 B1

1 autoasamblarea fizică a copolimerilor amfifili prin interacțiuni hidrofobe ale grupelor colesteril,
având ca urmare formarea unei rețele tridimensională 3D de gel. Este cunoscut ca gelifiant
3 cu masă moleculară mică, moleculele sale fiind capabile să reacționeze între ele prin interac-
țiuni necovalente, ca forțe van der Waals, interacțiuni hidrofobe sau de coordinație, dipol-
5 dipol și electrostatice, de incluziune tip "host-guest", pentru a forma rețele 3D autoasamblate.

Grupele funcționale ale colesterolului ce determină capacitatea sa de autoasamblare
7 esențială în gelifiere, pot fi ulterior folosite pentru cuplarea de compuși bioactivi și pentru
îmbunătățirea capacității de încărcare a unui vehicul pentru transportul unui medicament sau
9 pentru eliberarea sa controlată la locul țintă. Totodată, grupările hidroxilice secundare din
structura colesterolului induc deschiderea ciclului anhidridic cu manifestarea de interacțiuni
11 de natură fizică între cei doi compuși; ca urmare prezența colesterolului permite auto-
asamblarea cu formarea rețelei 3D în nanoagregate, prin interacțiuni de natură fizică. Sunt
13 cunoscute nanogeluri pe bază de pullulan purtător de colesterol, ele fiind printre cele mai
studiate biomateriale capabile să se autoasambleze și să prindă prin interacțiuni fizice
15 proteine sau medicamente hidrofobe, cu aplicații potențiale în sisteme de transport a
medicamentelor în ingineria tisulară.

17 În **US 8961983 B2** (2015) este descris un nanogel ce conține o polizaharidă hidrofilă
având o grupă funcțională cationică și colesterol adăugat în lanțul lateral al macromoleculii
19 și un vaccin, folosit pentru imunizare împotriva infecțiilor mucoaselor.

Un vaccin nazal pentru infecțiile cu *Streptococcus pneumoniae* este prezentat în
21 **US 20170014338 A1** (2017). Formularea de vaccin nazal include vaccinul și un nanogel în
care colesterolul hidrofob este adăugat ca lanț lateral al macromoleculii la pullulanul ce
23 prezintă grupe aminice.

În documentul lui **I. Neamțu, A. G. Rusu, A. Diaconu, L. E. Nita și A. P. Chiriac,**
25 ***Basic concepts and recent advances in nanogels as carriers for medical applications,***
se prezintă nanogeluri din domeniul biomedical ca dispersii de nanoparticule de hidrogel
27 bazate pe rețele polimerice reticulate care au fost denumite sisteme de livrare a medica-
mentelor de următoare generație datorită capacității lor relativ mari de încapsulare a medi-
29 camentului, uniformității, dimensiunii reglabile, ușurinței de preparare, toxicității minime,
stabilității în prezența serului și reacția la stimuli. Nanogelurile prezintă un mare potențial în
31 chimioterapie, diagnostic, orientare organică și livrarea de substanțe bioactive.

În brevetul **EP 2345419 B1** se prezintă un vaccin mucozal pentru prevenirea sau
33 tratamentul infecțiilor microbiene care este capabil să inducă răspunsuri imune specifice
antigenului vaccinului într-un organism fără adăugarea unui adjuvant pentru mucoasă.
35 Vaccinul mucozal cuprinde un compozit dintr-un nanogel care cuprinde o polizaharidă hidro-
filă având o grupă funcțională cationică și un colesterol hidrofob adăugat la un lanț lateral al
37 macromoleculii și un antigen de vaccin. Vaccinul se administrează pe cale mucoasă.

Problema pe care o rezolvă invenția este realizarea unui procedeu de preparare a
39 unui nanogel pe bază de copolimer poli(3,9-divinil-2,4,8,10-tetra-oxaspiro[5.5] undecan-co-
anhidridă itaconică) matrice și colesterol ca gelifiant cu masa moleculară mică, prin
41 autoasamblare, cu proprietăți responsive la modificarea temperaturii, care extinde gama de
biomateriale sau de sisteme tip senzor.

43 Procedeu de preparare a unui nanogel autoasamblat cu aplicații biomedicale con-
form invenției, înlătură dezavantajele de mai sus prin aceea că se realizează printr-o reacție
45 de autoasamblare prin amestecarea unei soluții 20% în dioxan de copolimer poli(anhidridă
itaconică-co-3,9-divinil-2,4,8,10-tetra-oxaspiro[5.5] undecan) cu o soluție 10% în dioxan de
47 colesterol ca gelifiant cu masă moleculară mică, măsurate exact în așa fel încât să se

RO 133399 B1

păstreze rapoartele gravimetrice copolimer:colesterol de 1:1, 2:1 și 4:1, la temperatura 22°C sub agitare lentă de 60 rpm timp de 20-30 sec, cu menținere la temperatura de 22°C timp de 24 h, în regim staționar, precipitare cu dietil eter, spălare repetată cu dietil eter și uscare în etuvă de vid la 25°C, 600 mmHg, timp de 24 h.

Procedeu conform invenției prezintă următoarele avantaje:

- este un procedeu ecologic, fără emanații toxice;
- este simplu de aplicat pe instalații existente, sigur în exploatare;
- necesită un număr redus de faze tehnologice;
- selectarea structurilor chimice cu anumite funcționalități permite proiectarea de proprietăți și capacitate de cuplare cu compuși bioactivi sau anorganici, în legătură cu domeniul de aplicare;

- stabilitate la stocare cât și operațională în decursul unei potențiale utilizări.

Se dă în continuare un exemplu de realizare a invenției.

Exemplu

Copolimerul matrice poli(3,9-divinil-2,4,8,10-tetra-oxaspiro[5.5] undecan-co-anhidridă itaconică) (PITAU) se sintetizează conform cererii de brevet de invenție A/00341/2015, prin tehnica copolimerizării în soluție de dioxan a monomerilor 3,9-divinil-2,4,8,10-tetra-oxaspiro[5.5] undecan și anhidridă itaconică în raport molar de 1,5:1, folosind 2,2'-azobis(2-metilpropionitril) ca inițiator radicalic. Prepararea particulelor reticulate de nanogel pe bază de copolimer PITAU se realizează prin amestecarea în recipiente plane de sticlă a unei soluții de stocare de PITAU de concentrație 20% în dioxan cu o soluție de stocare de colesterol (Col) de concentrație 10% în dioxan, măsurate exact în așa fel încât să se păstreze rapoartele gravimetrice PITAU: Col de 1:1, 2:1 și 4:1. Codificarea probelor de nanogel PITAU_Col sintetizate este înregistrată în tabelul 1.

Codificarea probelor PITAU_Col sintetizate

Tabelul 1

Codul probei PITAU_Col	Compoziție		
	Raport gravimetric PITAU:Col	Soluție de stocare, ml	
		PITAU	COL
PITAU_Col _{1:1}	0.0423611111	2	4
PITAU_Col _{2:1}	0.0840277778	3	3
PITAU_Col _{4:1}	0.1673611111	4	2

Amestecul de soluții este menținut la temperatura ambiantă (22°C), în atmosferă de azot sub agitare lentă de 60 rpm timp de 20-30 sec, timp în care se observă gelifierea treptată a sistemului. Apoi amestecul se păstrează la temperatura ambiantă (22°C), în regim staționar timp de 24 h, timp în care se realizează autoasamblarea cu definitivarea procesului de gelifiere. Reacția chimică de conjugare dintre Col și copolimerul PITAU apare spontan la amestecarea celor două soluții de stocare și este realizată prin prezența grupelor hidroxilice secundare din molecula de colesterol care desfac ciclul anhidridic din structura copolimerului. Rezultă o soluție limpede care este turnată cu picătura în dietil eter pentru precipitarea nanoparticulelor de PITAU_Col, sub formă de sfere monodisperse. Separarea nanogelurilor se face prin centrifugare (14000 rpm timp de 10 min). După îndepărtarea

RO 133399 B1

1 supernatantului, se fac spălări repetate cu dietil eter pentru îndepărtarea speciilor solubile
2 în dietil eter, cum ar fi reziduurile de polimer nereacționat. În final, nanoparticulele de gel sunt
3 uscate în etuva de vid la 25°C, 600 mmHg, timp de 24 h și stocate în exicator de vid în
4 vederea analizelor și a prelucrării ulterioare prin încapsulare de substanțe bioactive.

5 Conform cerințelor impuse de anumite aplicații potențiale în domeniul biomedical,
6 probele de nanogel sunt testate din punct de vedere al comportării termice prin analiza
7 termogravimetrică și al responsivității termice prin difracția luminii laser (DLS) pentru
8 determinarea evoluției diametrului hidrodinamic al particulelor cu variația temperaturii.

9 În tabelul 2 sunt înregistrate principalele caracteristici (intervale de descompunere,
10 temperatura inițială de descompunere, temperatura maximă de descompunere, pierderi în
11 greutate, temperatura corespunzătoare pierderilor în greutate de 10%, respectiv 20%)
12 rezultate din citirea curbelor termogravimetrice pentru variantele de nanogel din tabelul 1.

13 *Analiza termogravimetrică ^{x)} a variantelor de gel preparate*
14 *comparativ cu copolimerul PITAU*

Tabelul 2

17 Proba	18 Etape de degradare	19 $T_i, ^\circ\text{C}$	20 $T_m, ^\circ\text{C}$	21 $\Delta W, \%$	22 $T_{10}, ^\circ\text{C}$	23 $T_{20}, ^\circ\text{C}$
24 PITAU	25 I 26 II 27 reziduu	28 125376	29 177425	30 2.29e+11	31 192	32 274
33 PITAU_Col 1:1	34 I 35 II 36 III 37 reziduu	38 85340378	39 - 40 360 41 -	42 6.90e+14	43 165	44 195
45 PITAU_Col 2:1	46 I 47 II 48 III 49 reziduu	50 88338400	51 - 52 375 53 -	54 1.09e+13	55 170	56 220
57 PITAU_Col 4:1	58 I 59 II 60 reziduu	61 120360	62 177425	63 2.29e+11	64 180	65 260

66 ^{x)} - Analiza termogravimetrică s-a realizat pe intervalul de temperatură 30-600°C, în
67 azot, cu o viteză de încălzire de 10°/min T_i , T_m - temperatura inițială și temperatura vitezei
68 maxime de pierdere în greutate a proceselor principale de descompunere termică; ΔW -
69 pierderi în greutate pe intervalul de descompunere termică; T_{10} și T_{20} - temperatura
70 corespunzătoare pierderilor în greutate de 10%, respectiv 20%.

71 Probele PITAU_Col 1:1 și PITAU_Col 2:1 prezintă câte două procese principale de
72 degradare termică (II și III) cu importante pierderi în greutate (30,18 și 49,55%, respectiv
73 76,95 și 9,60) în timp ce proba PITAU_Col 4:1 prezintă un singur proces de degradare termică
74 (II) cu o pierdere în greutate de 63,76%.

75 În funcție de temperatura la care apar 10% pierderi în greutate (T_{10}) și 20% pierderi
76 în greutate (T_{20}), nanogelul PITAU_Col cu o cantitate mai mare de 3,9-divinil-2,4,8,10-tetra-
77 oxaspiro[5.5] undecan în raport cu anhidrida itaconică în compoziția copolimerului matrice
78 prezintă o stabilitate termică mai bună.

RO 133399 B1

Studiul DLS realizat pentru domeniul temperaturii fiziologice 22-40°C înregistrează sensibilitatea probelor de nanogel PITAU_Col la condițiile de temperatură și este prezentat în tabelul 3. Structura tridimensională a nanogelurilor este sensibilă la evoluția temperaturii. Indiferent de raportul dintre copolimer și reticulant - 1:1, 2:1 respectiv 4:1, sensibilitatea nanogelului la temperatură reflectată de diametrul hidrodinamic prezintă o evoluție sinusoidală. Aceasta se datorează balanței hidrofil/hidrofobe a noului compus atribuită prezenței colesterolului și componentei spiroacetalice care oferă conformație 3D specifică, capacității de interacțiune a oxigenului eteric, cum ar fi legăturile de hidrogen sau coordinative cu alte grupe funcționale, care schimbă stereochemia prin efect anomic la modificarea temperaturii.

Evoluția diametrului hidrodinamic a nanogelurilor cu temperatura

Tabelul 3

Proba	Diametru hidrodinamic (nm) ^{x)}						
	22	25	27	30	35	37	40
P1TAU_Col _{1:1}	250	250	500	450	600	650	250
PJTAU_Col _{2:1}	200	250	250	700	200	260	1600
PITAU_Col _{4:1}	190	190	200	220	600	700	1500

^{x)} - Se măsoară folosind tehnica de difracție dinamică a razei laser pe dispozitivul Malvern Nano ZS ZetaSizer device (Malvern Instruments, UK), pe intervalul de temperatură de 22-40°C

Caracterul sensibil cu temperatura al nanogelului preparat este o caracteristică importantă pentru sistemele cu eliberare controlată a principiilor bioactive din matricele în care sunt înglobate, sau pentru sistemele tip senzor. Acest caracter este atribuit prezenței grupei spiroacetalice cu o conformație specifică, inclusiv axială mai stabilă, cu o stare de energie mai joasă, care se manifestă atunci când apar variații de temperatură; rezultatul este creșterea sau descreșterea diametrului hidrodinamic al particulei de nanogel.

Astfel, pentru domeniul de temperatura de 22-30°C conformația permite încărcarea cu substanțe bioactive în timp ce pentru 35-40°C este favorizată eliberarea acestora din structura de nanogel. Variația temperaturii pe domeniul fiziologic cu creșterea sau descreșterea diametrului hidrodinamic are implicații în procesele de adsorbție sau eliberare de substanțe bioactive.

RO 133399 B1

1

Revendicare

3 Procedeu de preparare a unui nanogel autoasamblat cu aplicații biomedicale,
5 **caracterizat prin aceea că**, se realizează printr-o reacție de autoasamblare prin ames-
7 tecarea unei soluții 20% în dioxan de copolimer poli(anhidridă itaconică-co-3,9-divinil-
9 2,4,8,10-tetra-oxaspiro[5.5] undecan) cu o soluție 10% în dioxan de colesterol ca gelifiant cu
masă moleculară mică, măsurate exact în așa fel încât să se păstreze rapoartele gravi-
metriche copolimer:colesterol de 1:1, 2:1 și 4:1, la temperatura 22°C sub agitare lentă de
60 rpm timp de 20-30 sec, cu menținere la temperatura de 22°C timp de 24 h, în regim
staționar, precipitare cu dietil eter, spălare repetată cu dietil eter și uscare în etuvă de vid la
25°C, 600 mmHg, timp de 24 h.



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM
Tipărit la Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci
sub comanda nr. 79/2022