



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2021 00370

(22) Data de depozit: 25/06/2021

(41) Data publicării cererii:
30/12/2021 BOPI nr. 12/2021

(71) Solicitant:

• INSTITUTUL DE BIOLOGIE ȘI
PATOLOGIE CELULARĂ "NICOLAE
SIMIONESCU", STR. B.P. HAȘDEU NR. 8,
SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO;
• UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI
FARMACIE "CAROL DAVILA" DIN
BUCUREȘTI, STR. DIONISIE LUPU NR. 37,
SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;
• UNIVERSITATEA POLITEHNICĂ DIN
BUCUREȘTI, SPLAIUL INDEPENDENȚEI
NR. 313, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
• UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI
FARMACIE DIN CRAIOVA,
STR. PETRU RAREȘ NR. 2, CRAIOVA, DJ,
RO

(72) Inventatori:

• SIMIONESCU MAYA,
STR. LOUIS PASTEUR NR. 16, SECTOR 5,
BUCUREȘTI, B, RO;
• TITORENCU IRINA DOMNICA,
ALEEA SOLIDARITĂȚII NR. 1, BL. M17,
ET. 2, AP. 29, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B,
RO;
• ROȘCA ANA MARIA, STR. DUMBRAVA
NOUĂ, NR. 31, BL. P47, SC. 3, AP. 71,
SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO;
• ȚUTUIANU RALUCA, STR. OȚESANI,
NR. 2, BL. OD53A, ET. 3, AP. 13, SECTOR 2,
BUCUREȘTI, B, RO;
• IACOMI MĂDĂLINA DANIELA,
STR. IEDEREI, NR. 3, TULUCEȘTI, GL, RO;
• PRUNĂ VASILE, INTRAREA PITULICII,
NR. 7, BL. P27, SC. 3, AP. 33, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;
• LASCĂR IOAN, INTRAREA POIANA
NR. 25, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;
• CHECHERIȚĂ IONEL ALEXANDRU,
STR. MATEI BASARAB NR. 100, BL. 85, SC. 2,
ET. 2, AP. 37, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B,
RO;

• NEAGU TIBERIU PAUL,
STR. BANUL UDREA, NR. 1, BL. V97, SC. 5,
AP. 80, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;
• MOGOANTĂ LAURENȚIU,
CALEA BUCUREȘTI NR. 30, BL. C9, SC. 2,
ET. 4, AP. 9, CRAIOVA, DJ, RO;
• MOGOȘANU GEORGE-DAN,
BD. OLTENIA NR. 1C, BL. T3, SC. 2, AP. 15,
CRAIOVA, DJ, RO;
• PIRICI NICOLAE-DANIEL,
STR. FRÎNARULUI, NR. 5, CRAIOVA, DJ,
RO;
• STREBA COSTIN TEODOR,
ALEEA ANUL 1848 NR. 19, CRAIOVA, DJ,
RO;
• BÎRCĂ ALEXANDRA CĂTĂLINA,
ALEEA REȘIȚA D, NR. 8, BL. A1, SC. 2, ET. 2,
AP. 22, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO;
• BURDUȘEL ALEXANDRA CRISTINA,
STR. DR. BURGHELEA, NR. 7A, CORP A,
AP. 3, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;
• STOICA ALEXANDRA ELENA,
STR. TINERETULUI, NR. 1, BL. 48, ET. 4,
AP. 14, URZICENI, IL, RO;
• GRUMEZESCU ALEXANDRU MIHAI,
SPLAIUL INDEPENDENȚEI, NR. 313D, SC. 1,
AP. 115, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
• CHIRCOV CRISTINA, STR. FRASINULUI,
NR. 4, BL. 4, SC. D, ET. 4, AP. 18, TULCEA,
TL, RO

(74) Mandatar:

CABINET DE PROPRIETATE
INDUSTRIALĂ "LAZĂR ELENA",
B-DUL UNIRII, BL. 16C, AP. 12, OP 1, CP 52,
BUZĂU, JUDEȚUL BUZĂU

Această publicație include și modificările descrierii,
revendicărilor și desenelor depuse conform art. 35
alin. (20) din HG nr. 547/2008

(54) HIDROGELURI POLIMERICE COMPOZITE CU PROPRIETĂȚI ANTIBACTERIENE ȘI CICATRIZANTE ȘI PROCEDEU DE OBTINERE A ACESTORA

(57) Rezumat:

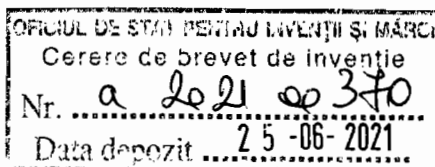
Invenția se referă la un procedeu de obținere a unui hidrogel polimeric compozit utilizat ca produs topic pentru tratamentul și profilaxia leziunilor cutanate acute și cronice, având caracter antibacterian, cicatrizant și regenerativ. Procedeu, conform invenției, constă într-o primă etapă de preparare a gelului de fibrină, pornind de la 85% fibrinogen uman și 1% trombină, amestecarea acestuia cu 4% suspensie de nanoparticule polimerice polietilenglicol/polivinilpirolidonă pe bază de

argint cu concentrația de 1 mg/ml, urmată de o altă etapă de amestecare cu 10% suspensie de exosomi izolați din mediul de cultură al celulelor mezenchimale umane, prin ultracentrifugare, rezultând un hidrogel biodegradabil formulat ca pansament pentru aplicare săptămânală.

Revendicări: 4

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art. 32 din Legea nr. 64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art. 23 alin. (1) - (3).





HIDROGELURI POLIMERICE COMPOZITE CU PROPRIETĂȚI ANTIBACTERIENE ȘI CICATRIZANTE ȘI PROCEDEU DE OBTINERE A ACESTORA

Invenția se referă la hidrogeluri ce pot fi folosite ca produs topic pentru tratamentul și profilaxia leziunilor cutanate acute și cronice, având caracter antibacterian, cicatrizant și regenerativ.

Se cunoaște faptul că problemele asociate plagilor cutanate, precum formarea țesutului cicatricial fibros, pierderea temporară sau permanentă a funcțiilor pielii și posibilitatea de infectare a plagii, care poate duce la extirparea țesutului afectat sau chiar la amputarea membrului, pot evolua frecvent către morbiditate severă și mortalitate. Astfel, aceste patologii constituie nu numai o gravă problemă de sănătate dar și o povară financiară majoră asupra sistemelor naționale de sănătate.

În acest context, hidrogelurile polimerice utilizate ca pansamente pentru tratamentul plagilor cutanate reprezintă un subiect de mare interes la nivel global.

Procesul natural de vindecare a rănilor este unul complex și dinamic, implicând o multitudine de mecanisme celulare strâns corelate (Wilkinson & Hardman, 2020). Inițial, are loc oprirea sângerării de la nivelul leziunii prin formarea unei matrici insolubile de fibrină. Ulterior, aceasta va permite colonizarea fibroblastelor, celulelor endoteliale și keratinocitelor pentru refacerea țesutului cutanat afectat (Aderibigbe & Buyana, 2018; Stoica *et al.*, 2020; Wilkinson & Hardman, 2020). Astfel, fibrina, un hidrogel natural format prin polimerizarea fibrinogenului în cadrul cascadei coagulării (Heher *et al.*, 2018), a devenit un biopolimer intens studiat ca material pentru pansamente cutanate. Avantajele sale considerabile implică posibilitatea izolării precursorilor săi din surse autologe și limitarea imunogenității, versatilitatea proprietăților rețelei de

fibrină și biomimetismul mecanismelor de vindecare a pielii, dar și prețul scăzut asociat izolării fibrinei în comparație cu alți polimeri naturali (Bencherif *et al.*, 2017).

Din aceste considerente, la momentul actual există o serie de brevete în care este descrisă sinteza unor pansamente pe bază de fibrină, respectiv hidrogel biodegradabil și flexibil în cadrul brevetului **US 6,486,377 B2** (Rapp, 2002), hidrogel sub formă de spumă în cadrul brevetului **US 8,512,740 B2** (Delmotte, 2013), acoperiri pentru pansamente pe bază de fibrină în cadrul brevetului **WO/2014/209620** (Bjork *et al.*, 2014) și hidrogeluri sau hidrogeluri deshidratate care pot fi sintetizate sub formă de film, spumă sau amestecuri în cadrul brevetului **WO/2016/160541** (Bjork *et al.*, 2016).

Totuși, studiile actuale se concentrează pe îmbunătățirea proprietăților pansamentelor pe bază de hidrogeluri de fibrină prin adăugarea unor compuși bioactivi care să asigure atât caracteristici antibacteriene, cât și stimularea și imunomodularea capacității endogene de regenerare a țesuturilor.

În acest sens, nanoparticulele de argint (Burduşel *et al.*, 2018), pe de o parte, și exosomi derivați din secretomul celulelor stromale mezenchimale umane (Hu *et al.*, 2016; Rani & Ritter, 2016), pe de altă parte, pot fi introduse la nivelul hidrogelurilor polimerice pentru a asigura caracteristicile necesare unui pansament ideal.

Cu toate acestea, până în prezent, în lucrările de specialitate nu a fost descrisă sinteza unui pansament pentru plagile cutanate pe bază de fibrină, care să înglobeze nanoparticule de argint și exosomi derivați din celulele stem mezenchimale.

Problema tehnică rezolvată de invenție este aceea de a realiza hidrogeluri polimerice compozite pe bază de fibrină, nanoparticule hibride de argint și exosomi, care datorită capacității acestor hidrogeluri va îmbunătăți procesul de vindecare, prin sporirea regenerării țesuturilor de la nivelul răni și eliminarea riscului de infectare, prin caracterul lor antibacterian ridicat. **Hidrogel** polimeric

biodegradabil complex este constituit din 85% fibrinogen cu concentrația de 43,4 mg/ml și 1 % trombină de concentrație 3840 NIH/ml, în amestec cu 4 % suspensie de nanoparticule polimerice pe baza de argint cu concentrația de 1 mg/ml și în amestec cu 10 % de suspensie concentrată de exosomi derivați din celule stromale mezenchimale umane.

Procedeu de obținere a unui hidrogel polimeric compozit cu proprietăți antibacteriene și cicatrizante este caracterizat prin aceea că, într-o primă etapă în prepararea gelului de fibrină, pornind de la fibrinogen uman 85 % și trombină 1%, urmată de amestecarea acestuia cu o suspensie de nanoparticule polimerice pe bază de argint 4 %, obținute din nanoparticulele de Ag@PEG (polietilen glicol) / PVP (plovinil pirolidona) au fost obținute prin reducere din azotat de argint, soluția de ioni de argint 1% a fost adăugată în picatura, peste soluția de bază de NaOH (5%), cu conținut de glucoză (0,25%), PEG (0,375%) și PVP (0,375%), la 80°C, nanoparticulele de Ag@PEG/PVP, cu cristalinitate ridicată, singura fază cristalină identificată este argintul, nanoparticule care au dimensiuni cuprinse între 30 și 60 nm, iar cantitatea de PEG și PVP imobilizată pe suprafața nanoparticulelor este de 16,2%. Din masa nanoparticulelor de tipul Ag@PEG/PVP, urmată de o altă etapă de amestec și cu o suspensie de exosomi izolați din mediul de cultură al celulelor stem mezenchimale umane în procent de 10 %, prin ultracentrifugare.

Exosomi sunt vezicule extracelulare cu dimensiuni cuprinse între 30-300 nm care la suprafața prezintă următorii markeri caracteristici: CD 9, CD 63 și CD 81, aceste vezicule au proprietăți de stimulare a proliferației și migrației fibroblastelor și keratinocitelor umane precum și efect angiogen de a induce formarea de noi vase de sânge, exosomii se păstrează la -80°C, se decongelează pe gheață și se păstrează pe gheață până în momentul incorporării lor în hidrogel, înainte de incorporarea în hidrogel se agită foarte bine suspensia pentru omogenizare, exosomii sunt resuspendați într-o soluție salină.

Nanoparticulele de Ag se păstrează la temperatura de 4°C și se adăuga în

hidrogel la temperatura camerei, ele sunt resuspendate in apa sterila fara endotoxine, fibrinogenul se pastreaza la temperatura de 80°C si dupa decongelare, care nu se face pe gheata, se pastreaza la temperatura camerei pana in momentul utilizarii si se pipeteaza usor, trombina se pastreaza la temperatura de 80°C si dupa decongelare se pastreaza pe gheata pana la utilizare.

Prin aplicarea invenției, se obțin următoarele avantaje:

- biocompatibilitate crescută a hidrogelului și lipsa imunogenității, datorită utilizării unui biopolimer rezultat din precursori de proveniență umană;
- biodegradabilitate și bioresorbabilitate a componentelor hidrogelului, fără formarea unor compuși secundari toxici;
- acțiune stimulatorie de regenerare, refacere și vindecare a țesutului cutanat, datorită biomimetismului fibrinei și al exosomilor;
- acțiune antibacteriană, datorită nanoparticulelor polimerice hibride pe bază de argint;
- reducerea disconfortului la schimbarea pansamentului, datorită formulării destinate pentru aplicare săptămânală;
- cost redus de producție.

Se prezintă, în continuare, un exemplu concret, nelimitativ, de realizare a invenției.

Astfel, prin prezenta invenție se propune realizarea unui **hidrogel polimeric** complex, constituit din **fibrină ca biopolimer natural** care conține doi compuși bioactivi, și anume nanoparticule compozite polimerice pe bază de argint și **exosomi** cu proprietăți antibacteriene, respectiv regenerative.

Procedul de obținere a pansamentelor constă într-o prima etapa in prepararea **gelului de fibrină**, pornind de la fibrinogen uman 85 % și trombină 1%, urmată de amestecarea acestuia cu o suspensie de **nanoparticule polimerice** pe bază de argint 4 % și cu o suspensie de **exosomi derivați** din celule stromale mezenchimale umane 10 %.

Analiza histopatologica a procesului de reparare tisulara la soareci care nu

exprima fibrinogen indica modificari microscopice importante, cu persistenta hemoragiilor difuze, si o re-epitelizare intarziata a ranilor [PMID: 11389004].

Apare o deficienta a formarii tesutului de granulatie, iar fibrele de colagen depuse au rezistenta mecanica mica. Modificari majore apar si in ceea ce priveste dinamica repararii celulare, si in cazul leziunilor cutanate, keratinocitele nu migreaza sistematic dinspre periferia leziunii catre centrul acesteia.

Adaugarea unei matrici de fibrinogen in mijlocul leziunii, la aceste animale, favorizeaza migrarea keratinocitelor, subliniind efectul sau pro-reparator .

In afara de formarea fibrinei, cu rol esential in procesul de hemostaza, fibrinogenul participa si pe alte cai in procesul de reparare a leziunilor [PMID: 16689737].

Fibrinogenul sufera modificari conformationale, expunand epitopi asemenatori fibrinei, si formeaza elemente fibrilare de ancorare celulara in structura matricii provizorii ce apare initial in procesul de reparare a leziunilor cutanate si vasculare [PMID: 9326231].

Astfel, moleculele de integrina, caderine sau selectine, expuse pe membranele celulelor endoteliale, ale celulelor musculare netede, keratinocitelor, fibroblastelor sau leucocitelor, asigura aceasta interactiune [PMID: 11460491, 11460494, 11460493].

De asemenea, fibrinogenul poate lega si mentine un nivel crescut al unor factori de crestere precum FGF-2 si VEGF, favorizand aparitia si maturarea tesutului de granulatie [PMID: 12920033].

Asociat proceselor de reparare apare si infiltratul inflamator mixt (acut si cronic) care fagociteaza elementele necrozate, si asigura remanierea tisulara si apararea impotriva agentilor infectiosi contaminatori.

Fibrinogenul si fibrina moduleaza activitatea monocitelor si macrofagelor, favorizant maturarea tesutului de granulatie cu scaderea elementelor inflamatorii [PMID: 11886497].

O alta etapa a procedului o constituie obtinerea unor nanoparticule astfel :

Nanoparticulele de Ag@PEG (polietilen glicol)/PVP (plovini pirolidona) au fost obtinute prin reducere din azotat de argint. Solutia de ionii de argint (1%) a fost adaugata in picatura, peste solutia de bazica de NaOH (5%), cu continut de glucoza (0,25%), PEG (0.375%) si PVP (0,375%), la 80°C.

Nanoparticulele de Ag@PEG/PVP, cu cristalinitate ridicata, singura faza cristalina identificata este argintul, nanoparticule care au dimensiuni cuprinse intre 30 si 60 nm, iar cantitatea de PEG si PVP imobilizata pe suprafata nanoparticulelor este de 16,2% din masa nanoparticulelor de tipul Ag@PEG/PVP.

Urmeaza o alta etapa de realizare a unei suspensii de exosomi izolati din mediul de cultura al celulelor stem mezenchimale umane prin ultracentrifugare (Vonk LA, van Dooremalen SFJ, Liv N, Klumperman J, Coffe PJ, Saris DBF, Lorenowicz MJ. Mesenchymal Stromal/stem Cell-derived Extracellular Vesicles Promote Human Cartilage Regeneration *In Vitro. Theranostics* 2018; 8(4):906-920. doi:10.7150/thno.20746).

Exosomi – vezicule extracelulare cu dimensiuni cuprinse intre 30-300 nm care la suprafata prezinta urmatorii markeri caracteristici: CD 9, CD 63 si CD 81.

Aceste vezicule au proprietati de stimulare a proliferarii si migrarii fibroblastelor si keratinocitelor umane precum si efect angiogen (induc formarea de noi vase de sange).

Conditii de depozitare constituinti hidrogel:

Exosomii se pastreaza la (minus) -80°C, se decongeleaza pe gheata si se pastreaza pe gheata pana in momentul incorporarii lor in hidrogel. Inainte de incorporarea in hidrogel se agita foarte bine suspensia pentru omogenizare. Exosomii sunt resuspendati intr-o solutie salina.

Modele de soarece knock-out pentru CD9 arata deficiente de re-epitelizare a ranilor, cu persistenta dehiscentelor tisulare comparativ cu animale de control [PMID: 21881583].

Se pare ca mecanismul exact la aceste animale este reprezentat de o activare prelungita a terminal kinazei C-JUN NH2 la nivelul keratinocitelor, cu niveluri

anormal de ridicate de matrix metaloproteinaza 9 (MMP9), ceea ce duce la o degradare excesiva a colagenului de tip IV, si deci la o formare defectuoasa a membranelor bazale vasculare si epiteliale.

CD63 este un receptor pentru inhibitorul tisular al metaloproteinazei 1 (TIMP1) si favorizeaza supravietuirea celulara, remodelarea citoskeletului de actina, adeziunea intercelulara, dar si migrarea keratinocitelor, prin activarea proteinkinazei 2 FAK. Accelereaza procesele de angiogeneza prin favorizarea internalizarii VEGFR2 activat [PMID: 16917503, 24635319, 23632027].

CD81 favorizeaza migrarea celulara intr-un spectru larg, ambele proteine fiind supraexprimate in tumorile cu caracter invaziv si metastazant [PMID: 31494861].

Teste de migrare celulara pentru vindecarea leziunilor au aratat o localizare a CD9 si CD81 la nivelul jonctiunilor intercelulare ale keratinocitelor mobile, dar si o inhibare a migrarii celulare in urma tratamentului cu anticorpi neutralizanti pentru aceste molecule [PMID: 10844555].

Desi mecanismele exacte ale modului de implicare a celor doua molecule in repararea ranilor nu sunt cunoscute exact, se pare ca ele realizeaza adeziuni tranzitorii si reciclarea receptorilor integrinici in timpul migrarii keratinocitelor.

Nanoparticulele de Ag se pastreaza la 4°C, se adauga in hidrogel la temperatura camerei. Nanoparticulele sunt resuspendate in apa sterila fara endotoxine.

Fibrinogenul se pastreaza (minus) - 80°C si dupa decongelare (care nu se face pe gheata) se pastreaza la temperatura camerei pana in momentul utilizarii si se pipeteaza usor

Trombina se pastreaza (minus) - 80°C si dupa decongelare se pastreaza pe gheata pana la utilizare

Etape formare hidrogel:

- Intr-un recipient steril gol primul component care se adauga este fibrinogenul in procent de 85 % din solutia finala

- Se adauga apoi nanoparticulele de Ag in procent de 4 %
- Se adauga suspensia de exosomi in tampon salin steril in procent de 10 %
- La final se adauga trombina in procent de 1 % si se pipeteaza foarte usor.

Tot amestecul se face la temperatura camerei si apoi se aplica la nivelul plagii.

Toata operatiunea dureaza aproximativ 5 minute.

Produsul rezultat reprezintă un hidrogel biodegradabil constituit din 85% fibrinogen cu concentrația de 43,4 mg/ml, 1 % trombină de concentrație 3840 NIH/ml, 4 % suspensie de nanoparticule hibride de argint cu concentrația de 1 mg/ml și 10 % suspensie concentrată de exosomi, folosit în vindecarea rănilor cutanate, datorită proprietăților antibacteriene și cicatrizante.

Produsul este formulat pentru aplicare săptămânală, deoarece cu cât schimbarea pansamentului are loc mai rar, cu atât este mai confortabil tratamentul pentru pacienți, iar plaga este îngrijită mai eficient.

Exemplu de realizare al inventiei

Noul pansament se realizează astfel incat întreaga procedură durează cca. 15 minute.

Pentru obținerea hidrogelului de fibrină cu diametrul 10-12 mm si grosime ~1 mm s-au utilizat 101.2 μl fibrinogen de concentratie 43.4 mg/ml (solubilizat in apa), 12,5 μl suspensie de exozomi (resuspendati in PBS), 5 μl suspensie de nanoparticule Ag+EG-PVP / de concentratie 1mg/ml (resuspendate in apa) si 3 μl trombina de concentratie 1920 NIH/ml.

BIBLIOGRAFIE

Aderibigbe BA, Buyana B. Alginate in wound dressings. *Pharmaceutics*, 2018, 10(2):42. doi: 10.3390/pharmaceutics10020042; PMID: 29614804; PMCID: PMC6027439

Bencherif SA, Gsib O, Egles C. Fibrin: an underrated biopolymer for skin tissue engineering.

J Mol Biol Biotechnol, 2017, 2(1):3. <https://www.imedpub.com/articles/fibrin-an-underrated-biopolymer-for-skin-tissue-engineering.pdf>

Bjork JW, Halverson KJ, Young AJ, Moeller SJ. Fibrin-coated wound dressing. WO/2014/

209620, Patent Scope, 2014. <https://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf?docId=WO2014>

209620&tab=PCTBIBLIO

Bjork JW, Young AJ, Been RA, Ninkovic J, Baker BA. Fibrin composition, method and wound articles. WO/2016/160541, Patent Scope, 2016. <https://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf?docId=WO2016160541>

209620&tab=PCTBIBLIO

Burduşel AC, Gherasim O, Grumezescu AM, Mogoantă L, Ficai A, Andronescu E. Biomedical applications of silver nanoparticles: an up-to-date overview. *Nanomaterials (Basel)*, 2018, 8(9):681. doi: 10.3390/nano8090681; PMID: 30200373; PMCID: PMC6163202

Delmotte YA. Fibrin foam and process for making. US 8,512,740 B2, Google Patents, 2013. <https://patents.google.com/patent/US8512740B2/en>

Heher P, Mühleder S, Mittermayr R, Redl H, Slezak P. Fibrin-based delivery strategies for acute and chronic wound healing. *Adv Drug Deliv Rev*, 2018, 129:134–147. doi: 10.1016/j.addr.2017.12.007; PMID: 29247766

2017.12.007; PMID: 29247766

Hu L, Wang J, Zhou X, Xiong Z, Zhao J, Yu R, Huang F, Zhang H, Chen L. Exosomes derived from human adipose mesenchymal stem cells accelerates

cutaneous wound healing *via* optimizing the characteristics of fibroblasts. *Sci Rep*, 2016, 6:32993. doi: 10.1038/srep32993; PMID: 27615560; PMCID: PMC5018733

Rani S, Ritter T. The exosome – a naturally secreted nanoparticle and its application to wound healing. *Adv Mater*, 2016, 28(27):5542–5552. doi: 10.1002/adma.201504009; PMID: 26678528

Rapp M. Flexible wound covering based on fibrin and process for its production. US 6,486,377 B2, Google Patents, 2002. <https://patents.google.com/patent/US6486377B2>

Stoica AE, Chircov C, Grumezescu AM. Nanomaterials for wound dressings: an up-to-date overview. *Molecules*, 2020, 25(11):2699. doi: 10.3390/molecules25112699; PMID: 32532089; PMCID: PMC7321109

Wilkinson HN, Hardman MJ. Wound healing: cellular mechanisms and pathological outcomes. *Open Biol*, 2020, 10(9):20022310. doi: 10.1098/rsob.200223; PMID: 32993416; PMCID: PMC7536089

RE V E N D I C A R I :

1. **Hidrogel plimeric compozit cu proprietati antibacteriene si cicatrizante** pe bază de fibrină, caracterizat prin aceea ca un hidrogel polimeric biodegradabil complex este constituit din 85% fibrinogen cu concentrația de 43,4 mg/ml si 1 % trombină de concentrație 3840 NIH/ml, in amestec cu 4 % suspensie de nanoparticule polimerice pe baza de argint cu concentrația de 1 mg/ml și in amestec cu 10 % de suspensie concentrată de exosomi derivati din celule stromale mezenchimale umane.
2. **Procedeu de obtinere a unui hidrogel polimeric compozit cu proprietati antibacteriene si cicatrizante**, conform cu revendicarea 1, caracterizat prin aceea ca intr-o prima etapa in prepararea **gelului de fibrină**, pornind de la fibrinogen uman (85 %) și trombină (1%), urmată de amestecarea acestuia cu o suspensie de **nanoparticule polimerice** pe bază de argint (4 %), obtinute din nanoparticulele de Ag@PEG (polietilen glicol) / PVP (plovinil pirolidona) au fost obtinute prin reducere din azotat de argint, solutia de ionii de argint (1%) a fost adaugata in picatura, peste solutia de bazica de NaOH (5%), cu continut de glucoza (0,25%), PEG (0,375%) si PVP (0,375%), la 80°C, nanoparticulele de Ag@PEG/PVP, cu cristalinitate ridicata, singura faza cristalina identificata este argintul, nanoparticule care au dimensiuni cuprinse intre 30 si 60 nm, iar cantitatea de PEG si PVP imobilizata pe suprafata nanoparticulelor este de 16,2%. din masa nanoparticulelor de tipul Ag@PEG/PVP, urmata de o alta etapa de amestec și cu o suspensie de exosomi izolati din mediul de cultura al celulelor stem mezenchimale umane in procent de (10 %), prin ultracentrifugare.

3. **Procedeu de obtinere a unui hidrogel polimeric compozit cu proprietati antibacteriene si cicatrizante, conform cu revendicarea 2**, caracterizat prin aceea ca, exosomi sunt vezicule extracelulare cu dimensiuni cuprinse intre 30-300 nm care la suprafata prezinta urmatoorii markeri caracteristici: CD 9, CD 63 si CD 81, aceste vezicule au proprietati de stimulare a proliferarii si migrarii fibroblastelor si keratinocitelor umane precum si efect angiogen de a induce formarea de noi vase de sange, exosomii se pastreaza la -80°C , se decongeleaza pe gheata si se pastreaza pe gheata pana in momentul incorporarii lor in hidrogel, inainte de incorporarea in hidrogel se agita foarte bine suspensia pentru omogenizare, exosomii sunt resuspendati intr-o solutie salina.
4. **Procedeu de obtinere a unui hidrogel polimeric compozit cu proprietati antibacteriene si cicatrizante, conform cu revendicarea 2 si 3**, caracterizat prin aceea ca nanoparticulele de Ag se pastreaza la temperatura de 4°C si se agdauga in hidrogel la temperatura camerei, ele sunt resuspendate in apa sterila fara endotoxine, fibrinogenul se pastreaza la temperatura de -80°C si dupa decongelare, care nu se face pe gheata, se pastreaza la temperatura camerei pana in momentul utilizarii si se pipeteaza usor, trombina se pastreaza la temperatura de -80°C si dupa decongelare se pastreaza pe gheata pana la utilizare.

Descriere reformulată varianta 1 - modificari bibliografie

**HIDROGELURI POLIMERICE COMPOZITE CU PROPRIETĂȚI
ANTIBACTERIENE ȘI CICATRIZANTE ȘI PROCEDEU DE OBTINERE A
ACESTORA**

Invenția se referă la hidrogeluri și procedeu de realizare a lor destinate a fi folosite ca produs topic pentru tratamentul și profilaxia leziunilor cutanate acute și cronice, având proprietăți antibacteriene, cicatrizante și regenerative.

Se cunoaște faptul că problemele asociate plăgilor cutanate, precum formarea țesutului cicatricial fibros, pierderea temporară sau permanentă a funcțiilor pielii și posibilitatea de infectare a plăgii, care poate duce la extirparea țesutului afectat sau chiar la amputarea membrului, pot evolua frecvent către morbiditate severă și mortalitate. Astfel, aceste patologii constituie nu numai o gravă problemă de sănătate, dar și o povară financiară majoră asupra sistemelor naționale de sănătate.

În acest context, hidrogelurile polimerice utilizate ca pansamente pentru tratamentul plăgilor cutanate reprezintă un subiect de mare interes la nivel global.

Procesul natural de vindecare a rănilor este unul complex și dinamic, implicând o multitudine de mecanisme celulare strâns corelate (Wilkinson & Hardman, 2020). Inițial, are loc oprirea sângerării de la nivelul leziunii, prin formarea unei matrici insolubile de fibrină. Ulterior, aceasta va permite colonizarea fibroblastelor, celulelor endoteliale și keratinocitelor, pentru refacerea țesutului cutanat afectat (Aderibigbe & Buyana, 2018; Stoica *et al.*, 2020; Wilkinson & Hardman, 2020). Astfel, fibrina, un hidrogel natural format prin polimerizarea fibrinogenului în cadrul cascadei coagulării (Heher *et al.*, 2018), a devenit un biopolimer intens studiat ca material pentru pansamente cutanate. Avantajele sale considerabile implică posibilitatea izolării precursorilor săi din surse autologe și limitarea imunogenității, versatilitatea proprietăților rețelei de fibrină și biomimetismul mecanismelor de vindecare a pielii, dar și prețul scăzut asociat izolării fibrinei în comparație cu alți polimeri naturali (Bencherif *et al.*, 2017).

Din aceste considerente, la momentul actual există o serie de brevete în care este descrisă sinteza unor pansamente pe bază de fibrină, respectiv hidrogel biodegradabil și flexibil în cadrul brevetului **US 6,486,377 B2** (Rapp, 2002), hidrogel sub formă de spumă



în cadrul brevetului US 8,512,740 B2 (Delmotte, 2013), acoperiri pentru pansamente pe bază de fibrină în cadrul brevetului WO/2014/209620 (Bjork *et al.*, 2014) și hidrogeluri sau hidrogeluri deshidratate care pot fi sintetizate sub formă de film, spumă sau amestecuri, în cadrul brevetului WO/2016/160541 (Bjork *et al.*, 2016).

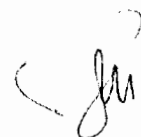
Totuși, studiile actuale se concentrează pe îmbunătățirea proprietăților pansamentelor pe bază de hidrogeluri de fibrină prin adăugarea unor compuși bioactivi care să asigure atât caracteristici antibacteriene, cât și stimularea și imunomodularea capacității endogene de regenerare a țesuturilor.

În acest sens, nanoparticulele de argint (Burdușel *et al.*, 2018), pe de o parte, și exosomi derivați din secretomul celulelor stromale mezenchimale umane (Hu *et al.*, 2016; Rani & Ritter, 2016), pe de altă parte, pot fi introduse la nivelul hidrogelurilor polimerice pentru a asigura caracteristicile necesare unui pansament ideal.

Cu toate acestea, până în prezent, în lucrările de specialitate nu a fost descrisă sinteza unui pansament pentru plăgile cutanate pe bază de fibrină, care să înglobeze nanoparticule de argint și exosomi derivați din celulele stem mezenchimale.

Problema tehnică rezolvată de invenție este aceea de a realiza hidrogeluri polimerice compozite pe bază de fibrină, nanoparticule hibride de argint și exosomi, care datorită capacității acestor hidrogeluri va îmbunătăți procesul de vindecare, prin sporirea regenerării țesuturilor de la nivelul răni și eliminarea riscului de infectare, prin caracterul lor antibacterian ridicat. **Hidrogelul** polimeric biodegradabil complex este constituit din 85% fibrinogen cu concentrația de 43.4 mg/ml și 1% trombină de concentrație 3840 NIH/ml, în amestec cu 4% suspensie de nanoparticule polimerice pe bază de argint cu concentrația de 1 mg/ml și 10% suspensie concentrată de exosomi derivați din celule stromale mezenchimale umane.

Procedeu de obținere a unui hidrogel polimeric compozit cu proprietăți antibacteriene și cicatrizante într-o primă etapă este de prepararea gelului de fibrină, pornind de la fibrinogen uman 85% și trombină 1%, urmată de amestecarea acestuia cu o suspensie de nanoparticule polimerice pe bază de argint 4%, obținute din nanoparticulele de Ag@PEG (polietilen glicol) / PVP (polivinil pirolidonă), au fost obținute prin reducere din azotat de argint, soluția de ioni de argint 1% a fost adăugată în picătură, peste soluția bazică de hidroxid de sodiu (5%), cu conținut de glucoză (0.25%), PEG



(0.375%) și PVP (0.375%), la 80°C, nanoparticulele de Ag@PEG/PVP, cu cristalinitate ridicată, singura fază cristalină identificată este argintul, nanoparticule care au dimensiuni cuprinse între 30 și 60 nm, iar cantitatea de PEG și PVP imobilizată pe suprafața nanoparticulelor este de 16.2% din masa nanoparticulelor de tipul Ag@PEG/PVP, urmată de o altă etapă de amestec și cu o suspensie de exosomi izolați din mediul de cultură al celulelor stem mezenchimale umane în procent de 10%, prin ultracentrifugare.

Exosomii sunt vezicule extracelulare cu dimensiuni cuprinse între 30-300 nm, care la suprafață prezintă următorii markeri caracteristici: CD9, CD63 și CD81, aceste vezicule au proprietăți de stimulare a proliferării și migrării fibroblastelor și keratinocitelor umane, precum și efect angiogen, de a induce formarea de noi vase de sânge, exosomii se păstrează la -80°C, se decongelează pe gheață și se păstrează pe gheață până în momentul încorporării lor în hidrogel, înainte de încorporarea în hidrogel se agită foarte bine suspensia, pentru omogenizare, exosomii sunt resuspendați într-o soluție salină.

Nanoparticulele de Ag se păstrează la temperatura de 4°C și se adaugă în hidrogel la temperatura camerei, ele sunt resuspendate în apă sterilă fără endotoxine, fibrinogenul se păstrează la temperatura de -80°C și după decongelare, care nu se face pe gheață, se păstrează la temperatura camerei până în momentul utilizării și se pipetează ușor, trombina se păstrează la temperatura de -80°C și după decongelare se păstrează pe gheață până la utilizare.

Prin aplicarea invenției, se obțin următoarele avantaje:

- biocompatibilitate crescută a hidrogelului și lipsa imunogenității, datorită utilizării unui biopolimer rezultat din precursori de proveniență umană;
- biodegradabilitate și bioresorbabilitate a componentelor hidrogelului, fără formarea unor compuși secundari toxici;
- acțiune stimulatorie de regenerare, refacere și vindecare a țesutului cutanat, datorită biomimetismului fibrinei și al exosomilor;
- acțiune antibacteriană, datorită nanoparticulelor polimerice hibride pe bază de argint;
- reducerea disconfortului la schimbarea pansamentului, datorită formulării destinate pentru aplicare săptămânală;

- cost redus de producție.

Se prezintă, în continuare, un exemplu concret, nelimitativ, de realizare a invenției.

Astfel, prin prezenta invenție se propune realizarea unui **hidrogel polimeric** complex, constituit din **fibrină ca biopolimer natural** care conține doi compuși bioactivi, și anume nanoparticule compozite polimerice pe bază de argint și **exosomi** cu proprietăți antibacteriene, respectiv regenerative.

Procedeul de obținere a pansamentelor constă într-o primă etapă în prepararea **gelului de fibrină**, pornind de la fibrinogen uman 85% și trombină 1%, urmată de amestecarea acestuia cu o suspensie de **nanoparticule polimerice** pe bază de argint 4% și cu o suspensie de **exosomi derivați** din celule stromale mezenchimale umane 10%.

Analiza histopatologică a procesului de reparare tisulară la șoareci care nu exprimă fibrinogen indică modificări microscopice importante, cu persistența hemoragiilor difuze, și o re-epitelizare întârziată a rănilor (Drew *et al.*, 2001).

Apare o deficiență a formării țesutului de granulație, iar fibrele de collagen depuse au rezistență mecanică mică. Modificări majore apar și în ceea ce privește dinamica reparării celulare și în cazul leziunilor cutanate, keratinocitele nu migrează sistematic dinspre periferia leziunii către centrul acesteia.

Adăugarea unei matrici de fibrinogen în mijlocul leziunii, la aceste animale, favorizează migrarea keratinocitelor, subliniind efectul său pro-reparator.

În afară de formarea fibrinei, cu rol esențial în procesul de hemostază, fibrinogenul participă și pe alte căi în procesul de reparare a leziunilor (Laurens *et al.*, 2006).

Fibrinogenul suferă modificări conformaționale, expunând epitopi asemănători fibrinei, și formează elemente fibrilare de ancorare celulară în structura matricii provizorii care apare inițial în procesul de reparare a leziunilor cutanate și vasculare (Guadiz *et al.*, 1997).

Astfel, moleculele de integrină, caderine sau selectine, expuse pe membranele celulelor endoteliale, ale celulelor musculare netede, keratinocitelor, fibroblastelor sau leucocitelor, asigură această interacțiune (Bennett, 2001; Martinez *et al.*, 2001; Ugarova & Yakubenko, 2001).

De asemenea, fibrinogenul poate lega și menține un nivel crescut al unor factori de creștere, precum FGF-2 și VEGF, favorizând apariția și maturarea țesutului de granulație (Rybarczyk *et al.*, 2003).

Asociat proceselor de reparare apare și infiltratul inflamator mixt (acut și cronic), care fagocitează elementele necrozate și asigură remanierea tisulară și apărarea împotriva agenților infecțioși și contaminatori.

Fibrinogenul și fibrina modulează activitatea monocitelor și macrofagelor, favorizând maturarea țesutului de granulație, cu scăderea elementelor inflamatorii (Kubo *et al.*, 2001).

O altă etapă a procedurii o constituie obținerea unor nanoparticule, astfel :

Nanoparticulele de Ag@PEG (polietilen glicol)/PVP (polivinil pirolidonă) au fost obținute prin reducere din azotat de argint. Soluția de ioni de argint (1%) a fost adăugată în picătură, peste soluția de bazică de hidroxid de sodiu (5%), cu conținut de glucoză (0.25%), PEG (0.375%) și PVP (0.375%), la 80°C.

Nanoparticulele de Ag@PEG/PVP, cu cristalinitate ridicată, singura fază cristalină identificată este argintul, nanoparticule care au dimensiuni cuprinse între 30 și 60 nm, iar cantitatea de PEG și PVP imobilizată pe suprafața nanoparticulelor este de 16.2% din masa nanoparticulelor de tipul Ag@PEG/PVP.

Urmează o altă etapă de realizare a unei suspensii de exosomi izolați din mediul de cultură al celulelor stem mezenchimale umane prin ultracentrifugare (Vonk *et al.*, 2018).

Exosomii – vezicule extracelulare cu dimensiuni cuprinse între 30-300 nm, care la suprafață prezintă următorii markeri caracteristici: CD9, CD63 și CD81.

Aceste vezicule au proprietăți de stimulare a proliferării și migrării fibroblastelor și keratinocitelor umane, precum și efect angiogen (induc formarea de noi vase de sânge).

Condiții de depozitare pentru constituenții hidrogelului:

Exosomii se păstrează la -80°C, se decongelează pe gheață și se păstrează pe gheață până în momentul încorporării lor în hidrogel. Înainte de încorporarea în hidrogel, se agită foarte bine suspensia pentru omogenizare. Exosomii sunt resuspendați într-o soluție salină.

Modelele de șoarece *knock-out* pentru CD9 arată deficiențe de re-epitelizare a

rănilor, cu persistența dehiscentelor tisulare, comparativ cu animalele de control (Zhang *et al.*, 2012).

Se pare că mecanismul exact la aceste animale este reprezentat de o activare prelungită a terminal kinazei C-JUN NH₂ la nivelul keratinocitelor, cu concentrații anormal de ridicate de matrix metaloproteinază 9 (MMP9), ceea ce duce la o degradare excesivă a colagenului de tip IV și deci la o formare defectuoasă a membranelor bazale vasculare și epiteliale.

CD63 este un receptor pentru inhibitorul tisular al metaloproteinazei 1 (TIMP1) și favorizează supraviețuirea celulară, remodelarea citoscheletului de actină, adeziunea intercelulară, dar și migrarea keratinocitelor, prin activarea proteinkinazei 2 FAK. Accelerează procesele de angiogeneză prin favorizarea internalizării VEGFR2 activat (Jung *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2014; Tugues *et al.*, 2013).

CD81 favorizează migrarea celulară într-un spectru larg, ambele proteine fiind supraexprimate în tumorile cu caracter invaziv și metastazant (Mizoshiri *et al.*, 2019).

Testele de migrare celulară pentru vindecarea leziunilor au arătat o localizare a CD9 și CD81 la nivelul joncțiunilor intercelulare ale keratinocitelor mobile, dar și o inhibare a migrării celulare în urma tratamentului cu anticorpi neutralizanți pentru aceste molecule (Peñas *et al.*, 2000).

Deși mecanismele exacte ale modului de implicare a celor două molecule în repararea rănilor nu sunt cunoscute exact, se pare că ele realizează adeziuni tranzitorii și reciclarea receptorilor integrinici în timpul migrării keratinocitelor.

Nanoparticulele de Ag se păstrează la 4°C și se adaugă în hidrogel la temperatura camerei. Nanoparticulele sunt resuspendate în apă sterilă fără endotoxine.

Fibrinogenul se păstrează la -80°C și după decongelare (care nu se face pe gheață) se păstrează la temperatura camerei până în momentul utilizării și se pipetează ușor.

Trombina se păstrează la -80°C și după decongelare se păstrează pe gheață până la utilizare.

Etapele formării hidrogelului:

- Într-un recipient steril gol, primul component care se adaugă este fibrinogenul în procent de 85% din soluția finală;

- Se adaugă apoi nanoparticulele de Ag în procent de 4%;
- Se adaugă suspensia de exosomi, în tampon fosfat salin (PBS) steril, în procent de 10%;
- La final, se adaugă trombina în procent de 1% și se pipetează foarte ușor.

Tot amestecul se realizează la temperatura camerei și apoi se aplică la nivelul plăgii.

Toată procedura durează aproximativ 5 minute.

Produsul rezultat reprezintă un hidrogel biodegradabil constituit din 85% fibrinogen cu concentrația de 43.4 mg/ml, 1% trombină de concentrație 3840 NIH/ml, 4% suspensie de nanoparticule hibride de argint cu concentrația de 1 mg/ml și 10% suspensie concentrată de exosomi, folosit în vindecarea rănilor cutanate, datorită proprietăților antibacteriene și cicatrizante.

Produsul este formulat pentru aplicare săptămânală, deoarece cu cât schimbarea pansamentului are loc mai rar, cu atât este mai confortabil tratamentul pentru pacienți, iar plaga este îngrijită mai eficient.

Exemplu de realizare a invenției

Noul pansament se realizează astfel încât întreaga procedură durează cca. 15 minute.

Pentru obținerea hidrogelului de fibrină cu diametrul de 10-12 mm și grosimea de ~1 mm s-au utilizat 101.2 μ l fibrinogen de concentrație 43.4 mg/ml (solubilizat în apă), 12.5 μ l suspensie de exosomi (resuspendați în PBS), 5 μ l suspensie de nanoparticule Ag@PEG/PVP de concentrație 1 mg/ml (resuspendate în apă) și 3 μ l trombină de concentrație 1920 NIH/ml.

Descriere reformulată varianta 1 - modificari bibliografie

BIBLIOGRAFIE

- Aderibigbe BA, Buyana B. Alginate in wound dressings. *Pharmaceutics*, 2018, 10(2):42. doi: 10.3390/pharmaceutics10020042; PMID: 29614804; PMCID: PMC6027439
- Bencherif SA, Gsib O, Egles C. Fibrin: an underrated biopolymer for skin tissue engineering. *J Mol Biol Biotechnol*, 2017, 2(1):3. <https://www.imedpub.com/articles/fibrin-an-underrated-biopolymer-for-skin-tissue-engineering.pdf>
- Bennett JS. Platelet-fibrinogen interactions. *Ann N Y Acad Sci*, 2001, 936:340–354. doi: 10.1111/j.1749-6632.2001.tb03521.x; PMID: 11460491
- Bjork JW, Halverson KJ, Young AJ, Moeller SJ. Fibrin-coated wound dressing. WO/2014/209620, Patent Scope, 2014. <https://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf?docId=WO2014209620&tab=PCTBIBLIO>
- Bjork JW, Young AJ, Been RA, Ninkovic J, Baker BA. Fibrin composition, method and wound articles. WO/2016/160541, Patent Scope, 2016. <https://patent.scope.wipo.int/search/en/detail.jsf?docId=WO2016160541>
- Burdușel AC, Gherasim O, Grumezescu AM, Mogoantă L, Fikai A, Andronescu E. Biomedical applications of silver nanoparticles: an up-to-date overview. *Nanomaterials (Basel)*, 2018, 8(9):681. doi: 10.3390/nano8090681; PMID: 30200373; PMCID: PMC6163202
- Delmotte YA. Fibrin foam and process for making. US 8,512,740 B2, Google Patents, 2013. <https://patents.google.com/patent/US8512740B2/en>
- Drew AF, Liu H, Davidson JM, Daugherty CC, Degen JL. Wound-healing defects in mice lacking fibrinogen. *Blood*, 2001, 97(12):3691–3698. doi: 10.1182/blood.v97.12.3691; PMID: 11389004
- Guadiz G, Sporn LA, Simpson-Haidaris PJ. Thrombin cleavage-independent deposition of fibrinogen in extracellular matrices. *Blood*, 1997, 90(7):2644–2653. PMID: 9326231
- Heher P, Mühleder S, Mittermayr R, Redl H, Slezak P. Fibrin-based delivery strategies for acute and chronic wound healing. *Adv Drug Deliv Rev*, 2018, 129:134–147. doi: 10.1016/j.addr.2017.12.007; PMID: 29247766
- Hu L, Wang J, Zhou X, Xiong Z, Zhao J, Yu R, Huang F, Zhang H, Chen L. Exosomes

derived from human adipose mesenchymal stem cells accelerates cutaneous wound healing *via* optimizing the characteristics of fibroblasts. *Sci Rep*, 2016, 6:32993. doi: 10.1038/srep32993; PMID: 27615560; PMCID: PMC5018733

Jung KK, Liu XW, Chirco R, Fridman R, Kim HR. Identification of CD63 as a tissue inhibitor of metalloproteinase-1 interacting cell surface protein. *EMBO J*, 2006, 25(17):3934–3942. doi: 10.1038/sj.emboj.7601281; PMID: 16917503; PMCID: PMC1560352

Kubo M, Van de Water L, Plantefaber LC, Mosesson MW, Simon M, Tonnesen MG, Taichman L, Clark RA. Fibrinogen and fibrin are anti-adhesive for keratinocytes: a mechanism for fibrin eschar slough during wound repair. *J Invest Dermatol*, 2001, 117(6):1369–1381. doi: 10.1046/j.0022-202x.2001.01551.x; PMID: 11886497

Laurens N, Koolwijk P, de Maat MP. Fibrin structure and wound healing. *J Thromb Haemost*, 2006, 4(5):932–939. doi: 10.1111/j.1538-7836.2006.01861.x; PMID: 16689737

Lee SY, Kim JM, Cho SY, Kim HS, Shin HS, Jeon JY, Kausar R, Jeong SY, Lee YS, Lee MA. TIMP-1 modulates chemotaxis of human neural stem cells through CD63 and integrin signalling. *Biochem J*, 2014, 459(3):565–576. doi: 10.1042/BJ20131119; PMID: 24635319

Martinez J, Ferber A, Bach TL, Yaen CH. Interaction of fibrin with VE-cadherin. *Ann N Y Acad Sci*, 2001, 936:386–405. doi: 10.1111/j.1749-6632.2001.tb03524.x; PMID: 11460494

Mizoshiri N, Shirai T, Terauchi R, Tsuchida S, Mori Y, Hayashi D, Kishida T, Arai Y, Mazda O, Nakanishi T, Kubo T. The tetraspanin CD81 mediates the growth and metastases of human osteosarcoma. *Cell Oncol (Dordr)*, 2019, 42(6):861–871. doi: 10.1007/s13402-019-00472-w; PMID: 31494861

Peñas PF, García-Díez A, Sánchez-Madrid F, Yáñez-Mó M. Tetraspanins are localized at motility-related structures and involved in normal human keratinocyte wound healing migration. *J Invest Dermatol*, 2000, 114(6):1126–1135. doi: 10.1046/j.1523-1747.2000.00998.x; PMID: 10844555

Rani S, Ritter T. The exosome – a naturally secreted nanoparticle and its application to wound healing. *Adv Mater*, 2016, 28(27):5542–5552. doi: 10.1002/adma.201504009; PMID: 26678528

Rapp M. Flexible wound covering based on fibrin and process for its production. US 6,486,377 B2, Google Patents, 2002. <https://patents.google.com/patent/US6486377B2>

Rybarczyk BJ, Lawrence SO, Simpson-Haidaris PJ. Matrix-fibrinogen enhances wound closure by increasing both cell proliferation and migration. *Blood*, 2003, 102(12):4035–4043. doi: 10.1182/blood-2003-03-0822; PMID: 12920033

Stoica AE, Chircov C, Grumezescu AM. Nanomaterials for wound dressings: an up-to-date overview. *Molecules*, 2020, 25(11):2699. doi: 10.3390/molecules25112699; PMID: 32532089; PMCID: PMC7321109

Tugues S, Honjo S, König C, Padhan N, Kroon J, Gualandi L, Li X, Barkefors I, Thijssen VL, Griffioen AW, Claesson-Welsh L. Tetraspanin CD63 promotes vascular endothelial growth factor receptor 2- β 1 integrin complex formation, thereby regulating activation and downstream signaling in endothelial cells *in vitro* and *in vivo*. *J Biol Chem*, 2013, 288(26):19060–19071. doi: 10.1074/jbc.M113.468199; PMID: 23632027; PMCID: PMC3696679

Ugarova TP, Yakubenko VP. Recognition of fibrinogen by leukocyte integrins. *Ann N Y Acad Sci*, 2001, 936:368–385. doi: 10.1111/j.1749-6632.2001.tb03523.x; PMID: 11460493

Vonk LA, van Dooremalen SFJ, Liv N, Klumperman J, Coffey PJ, Saris DBF, Lorenowicz MJ. Mesenchymal stromal/stem cell-derived extracellular vesicles promote human cartilage regeneration *in vitro*. *Theranostics*, 2018, 8(4):906–920. doi: 10.7150/thno.20746; PMID: 29463990; PMCID: PMC5817101

Wilkinson HN, Hardman MJ. Wound healing: cellular mechanisms and pathological outcomes. *Open Biol*, 2020, 10(9):20022310. doi: 10.1098/rsob.200223; PMID: 32993416; PMCID: PMC7536089

Zhang J, Dong J, Gu H, Yu S, Zhang X, Gou Y, Xu W, Burd A, Huang L, Miyado K, Huang Y, Chan HC. CD9 is critical for cutaneous wound healing through JNK signaling. *J Invest Dermatol*, 2012, 132(1):226–236. doi: 10.1038/jid.2011.268; PMID: 21881583

Descriere reformulată varianta 1 - modificari bibliografice

REVENDICĂRI:

1. **Hidrogel polimeric compozit cu proprietăți antibacteriene și cicatrizante** pe bază de fibrină, caracterizat prin aceea că un hidrogel polimeric biodegradabil complex este constituit din 85% fibrinogen cu concentrația de 43.4 mg/ml și 1% trombină de concentrație 3840 NIH/ml, în amestec cu 4% suspensie de nanoparticule polimerice pe bază de argint cu concentrația de 1 mg/ml și în amestec cu 10% suspensie concentrată de exosomi derivați din celule stromale mezenchimale umane.
2. **Procedeu de obținere a unui hidrogel polimeric compozit cu proprietăți antibacteriene și cicatrizante, conform cu revendicarea 1**, caracterizat prin aceea că într-o primă etapă în prepararea **gelului de fibrină**, pornind de la fibrinogen uman (85%) și trombină (1%), urmată de amestecarea acestuia cu o suspensie de **nanoparticule polimerice** pe bază de argint (4%), obținute din nanoparticulele de Ag@PEG (polietilen glicol) / PVP (polivinil pirolidonă) au fost obținute prin reducere din azotat de argint, soluția de ioni de argint (1%) a fost adăugată în picătură, peste soluția bazică de hidroxid de sodiu (5%), cu conținut de glucoză (0.25%), PEG (0.375%) și PVP (0.375%), la 80°C, nanoparticulele de Ag@PEG/PVP, cu cristalinitate ridicată, singura fază cristalină identificată este argintul, nanoparticule care au dimensiuni cuprinse între 30 și 60 nm, iar cantitatea de PEG și PVP imobilizată pe suprafața nanoparticulelor este de 16.2% din masa nanoparticulelor de tipul Ag@PEG/PVP, urmată de o altă etapă de amestec și cu o suspensie de exosomi izolați din mediul de cultură al celulelor stem mezenchimale umane în procent de 10%, prin ultracentrifugare.
3. **Procedeu de obținere a unui hidrogel polimeric compozit cu proprietăți antibacteriene și cicatrizante, conform cu revendicarea 2**, caracterizat prin aceea că exosomii sunt vezicule extracelulare cu dimensiuni cuprinse între 30-300 nm, care la suprafață prezintă următorii markeri caracteristici: CD9, CD63 și CD81, aceste vezicule au proprietăți de stimulare a proliferării și migrării fibroblastelor și keratinocitelor umane, precum și efect angiogen, de a induce formarea de noi vase de sânge, exosomii se păstrează la -80°C, se decongelează pe gheață și se păstrează pe

gheață până în momentul încorporării lor în hidrogel, înainte de încorporarea în hidrogel se agită foarte bine suspensia pentru omogenizare, exosomii sunt resuspendați într-o soluție salină.

- 4. Procedeu de obținere a unui hidrogel polimeric compozit cu proprietăți antibacteriene și cicatrizante, conform cu revendicarea 2 și 3, caracterizat prin aceea că nanoparticulele de Ag se păstrează la temperatura de 4°C și se adaugă în hidrogel la temperatura camerei, ele sunt resuspendate în apă sterilă fără endotoxine, fibrinogenul se păstrează la temperatura de -80°C și după decongelare, care nu se face pe gheață, se păstrează la temperatura camerei până în momentul utilizării și se pipetează ușor, trombina se păstrează la temperatura de -80°C și după decongelare se păstrează pe gheață până la utilizare.**