



(12) **CERERE DE BREVET DE INVENȚIE**

(21) Nr. cerere: **a 2021 00050**

(22) Data de depozit: **12/02/2021**

(41) Data publicării cererii:  
**30/08/2022** BOPI nr. **8/2022**

(71) Solicitant:  
• **SANIMED INTERNATIONAL IMPEX S.R.L.**, ȘOS. BUCUREȘTI- MĂGURELE, NR.70F, PARCELA 22, PARTER, SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:  
• **MAIER STELIAN SERGIU**, STR.FÂNTÂNILOR NR.37, BL.B 2, ET.7, AP.69, IAȘI, IS, RO;  
• **MAIER VASILICA**, STR. FÂNTÂNILOR NR.37, BL.B 2, ET.7, AP.69, IAȘI, IS, RO;

• **CHIFIRIUC MARIANA CARMEN**, STR. COSTACHE STAMATE NR. 5, BL. A8, SC. 1, ET. 9, AP. 37, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO;  
• **MARINAȘ IOANA-CRISTINA**, STR.BOZIENI, NR.9, BL.830 BIS, SC.2, ET.4, AP.64, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO;  
• **ANGHELOIU MARIN**, STR. GENERAL CULGER NR. 28, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;  
• **TIHĂUAN BIANCA MARIA**, STR.CODRII NEAMȚULUI, NR.5-7, BL.A, AP.8, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO

(54) **PROCEDEU PENTRU OBTINEREA MATRICELOR BIOPOLIMERICE MICROPOROASE, CU CONȚINUT DE LACTOFERINĂ, DESTINATE APLICAȚIILOR BIOMEDICALE ȘI DERMATO-COSMETICE**

(57) Rezumat:

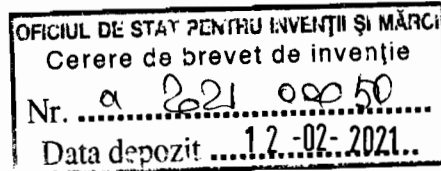
Invenția se referă la un procedeu de obținere a unor matrice biopolimerice microporoase cu conținut de lactoferină destinate aplicațiilor biomedicale și dermato-cosmetice ca dispozitive medicale. Procedeu, conform invenției, constă în etapele de preparare a soluției concentrate de atelocolagen hipoinmunogen biologic-activ, preparare a formei de înglobare a lactoferinei umane recombinant, prepararea și formularea soluțiilor/emulsiilor de adjuvanți, prepararea compoziției fluide precursorare, generarea matricelor solide poroase,

prin liofilizare, condiționarea fizico-chimică și post procesarea fizico-mecanică a matricelor solide poroase funcție de aplicația vizată, asocierea matricelor compactate cu sisteme fizice destinate atașării la suprafața tegumentelor, respectiv, ambalarea și sterilizarea produselor finale având caracteristici fizico-chimice adecvate utilizării ca dispozitive medicale.

Revendicări: 12

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).





## **Procedeu pentru obținerea matricelor biopolimerice microporoase, cu conținut de lactoferină, destinate aplicațiilor biomedicale și dermato-cosmetice**

**Invenția se referă la un procedeu pentru obținerea matricelor biopolimerice microporoase, cu conținut de lactoferină, destinate aplicațiilor biomedicale și dermato-cosmetice**, caracterizat prin aceea că furnizează structuri solide înalt poroase, cu porozitate deschisă și hidrofilie controlată, sterile, hipo-imunogene și hipo-alergenice, cu rol de pansament temporar sau compresă de unică folosință. Aplicațiile matricelor în sfera biomedicală și în dermato-cosmetică valorifică funcționalitatea componentei lor biopolimerice, (atelo)colagenul cvasi-nativ hipo-imunogen, alături de cea a lactoferinei. La utilizare, componenta biopolimerică a matricelor asigură, pe de o parte sorbția, stocarea și eliberarea temporizată a unor compoziții fluide formulate, dozate anterior utilizării sau extemporaneu, fie în matrice fie pe suprafața tegumentului eventual rănit, iar pe de alta preluarea și reținerea unor lichide ori produse semisolide generate fiziologic sau patologic de tegument, sau în rană. Componenta farmacologic-activă, lactoferina, conferă matricei rol antibacterian cu spectru îngust și induce un efect imunomodulator manifestat în mecanismele inflamatorii locale și în cele de vindecare a țesuturilor. **Matricele obținute conform procedurii brevetat, asociate sau nu cu sisteme fizice pentru fixarea lor pe suprafața tegumentelor, sunt destinate tratării efectelor afecțiunilor dermatologice și agresiunilor fizico-chimice și microbiologice localizate la nivelul tegumentelor, asistării refacerii post-traumatice a epidermei și dermei, precum și asigurării igienei locale a pielii divers afectate. Ele sunt utilizabile, ca atare sau după umidifiere / îmbibare cu compoziții fluide divers formulate, pentru efectuarea rapidă a manevrelor dermato-cosmetice (curățare locală) și a intervențiilor medicale (inducerea hemostazei), precum și pentru aplicarea tratamentelor prelungite, dermato-cosmetice (refacerea epidermei agresate termic, radiativ, sau chimic, reechilibrarea microbiotei pielii, asistarea vindecării rănilor cauzate de extragerea**

neglijență a comedoanelor etc.), ori medicale (vindecarea accelerată a rănilor superficiale și a arsurilor de mică amploare, asistarea vindecării ulcerațiilor și escarelor umede ori uscate / necrozate, igiena îndelungată a plăgilor chirurgicale).

Matricele microporoase obținute pornind de la compoziții biopolimerice specific formulate au caracteristici fizico-chimice de biomaterial și pot constitui suportul mecanic al produselor cu rol de dispozitiv medical interfațabil cu tegumente și țesuturi aflate în stare fiziologică sau patologică. Componentele farmacologic-active înglobate fizic în matrice determină funcționalitatea suplimentară a respectivului dispozitiv medical. În cazul prezentei invenții, funcționalitatea suplimentară este conferită de lactoferină, aceasta din urmă asistată de o serie de compuși (bio)chimici cu rol de adjuvanți, care o protejează și respectiv îi potențează activitatea farmacologică.

Lactoferina este o glicoproteină cu masa moleculară de 78182 Da (conform nextprot.org, pentru izoforma 1, NX\_P02788; 690 aminoacizi; patru poziții de glicozilare; masa moleculară în stare glicozilată 85119 Da), secretată în fluide ale organismului majorității mamiferelor, mai ales în colostru (până la 7 g/L) și lapte (circa 1 g/L; 12,5 μM), odată cu care este transferată vietăților alăptate, predominant în scop imunostimulator (Elzoghby A.O. și alții, *Lactoferrin, a multi-functional glycoprotein: Active therapeutic, drug nanocarrier & targeting ligand*, Biomaterials, 263, 2020, 120355). Ea se regăsește în zerul rezultat după procesarea primară a laptelui. Este prezentă și în salivă, lacrimi și secrețiile nazale, unde joacă rol antimicrobian și imunomodulator. În anumite circumstanțe, este prezentă și în lichidul biliar. Ca specie biochimică, lactoferina este o componentă a sistemului imunitar înăscut, dar funcționează și ca transportor al ionilor ferici ( $Fe^{3+}$ ), ca agent antibacterian, antiviral și antiparazitic, ca biocatalizator și ca factor antialergic și antineoplazic. Se poate izola din zer (US Pat. No. 9458225 / 2016), dar poate fi obținută și utilizând tehnologia ADN-ului recombinant, prin biosinteză în celule ale plantelor (US Pat. No. 8334254 / 2012) sau fungilor (US Pat. No. 6635447 / 2003). După izolare și uscare, se prezintă ca o pulbere de culoare roz-somon până la roșie (cauzată de prezența ionilor ferici). Are un punct izoelectric (pI) de  $8,0 \pm 8,5$ , fiind deci încărcată pozitiv la pH-ul fiziologic (de 7,4 unități).

Restricția majoră impusă procedeele de obținere a substraturilor (bio)polimerice care includ proteine este aceea de a le îngloba în stare nedenaturată. Aceeași restricție este impusă și matricelor microporoase, care trebuie să mențină, să vehiculeze și să elibereze lanțurile polipeptidice în stare biologic-activă, deci nedenaturată și anturată cu speciile chimice adjuvante (de regulă mic-moleculare) necesare.

Fiind un chelator înalt eficient al ionilor metalici (în condiții fiziologice, a ionului feric față de care constanta de chelatare / disociere este de  $10^{-20}$  M), lactoferinei trebuie să i se asigure stabilitatea conformațională ca ligand. În caz contrar, ea pierde afinitatea de complexare și, odată cu aceasta, abilitatea de a funcționa drept agent antibacterian și antioxidant. Mai mult decât atât, ionii metalici (ferici) eliberați vor deveni inductori ai formelor de oxigen radicalic, extrem de nocive în țesuturi, mai ales în cele deja aflate în stare patologică.

În plus, pentru a exercita acțiune antibacteriană, lactoferina, înglobată în matrice și apoi eliberată în mediul umed în care urmează să acționeze, trebuie menținută în stare cationică (la valori ale pH-ului mai mici decât pH-ul izoelectric), formă sub care interacționează cu lipopolizaharidele (anionice) din peretele celular al bacteriilor Gram-negativ, cauzând perforarea acestuia, soldată cu distrugerea bacteriei. Însă, pH-ul în respectivul mediu umed nu poate fi tamponat sever, deoarece, rigid reglat fiind, poate influența negativ procesele de vindecare a țesuturilor conjunctive. Din acest motiv, alegerea adjuvanților destinați secundării lactoferinei este critică.

Pentru a acționa drept agent imunostimulator, imunomodulator și antiinflamator local, dar și ca agent antiviral (Chang R., Ng T.B., Sun W.Z., *Lactoferrin as potential preventative and adjunct treatment for COVID-19*, International Journal of Antimicrobial Agents, 56, 2020, 106118), lactoferina trebuie dozată în cantități extrem de precise, de ordinul  $10^{-7} + 10^{-5}$  M (echivalent cu  $8 + 800$   $\mu\text{g/mL}$ ), respectiv în concentrații cuprinse între circa  $10$   $\mu\text{g/mL}$  și  $1$   $\text{mg/mL}$ . În plus, ea trebuie să fie anturată cu o serie de stimulatori ai metabolismului celular (spre exemplu vitamine și factori de creștere) și trebuie să fie protejată cu glicozaminoglicani anionici specifici țesutului (în cazul dermei pielii, cu acid hialuronic și heparan-sulfat), de care se leagă ionic labil, reversibil în medii puternic hidratate.

**Din literatura de specialitate și din cea de brevete, este cunoscut faptul că** matricele microporoase solide ce includ (atelo)colagen și eventual proteine biologice active se obțin pornind de la suspensii coloidale concentrate ( $5 + 15$   $\text{g/L}$ ), formulate suplimentar sau nu, ce se supun uscării prin liofilizare sau, preferabil, cu bioxid de carbon la punctul critic (US Pat. No. 9439999 / 2016; US Pat. No. 9655997 / 2017; US Pat. No. 9757495 / 2017; Sherifi I., Bachy M., Laumonier T., Petite H., Hannouche D., *Use of supercritical carbon dioxide technology for fabricating a tissue engineering scaffold for anterior cruciate ligament repair*, Scientific Reports, 10, 2020, 14030). Frecvent, compozițiile se formulează prin adaos de antibiotice (US Pat. No. 3823212 / 1974; RO 128972 / 2017) și specii de interes biochimic (US Pat. No. 8882850 / 2014;

US Pat. No. 9539363 / 2017; US Pat. No. 9540610 / 2017), funcție de aplicația biomedicală vizată. **Dezavantajul major al procedeeleor deja cunoscute** derivă din faptul că, în vederea funcționalizării suplimentare a substratului colagenic, recurg la specii farmacologic-actieve față de care microorganismele au dezvoltat rezistență, ori la factori de creștere al căror efect este energetic și dificil de controlat, fapt care adaugă variabilitate proceselor de vindecare a rănilor și afecțiunilor locale. Atunci când respectivele procedee uzează de amestecuri de specii biochimic- / biologic-actieve, acestea induc efecte multiple, dificil de reconciliat în sociologia celulară a țesutului aflat în condiții non-fiziologice, fapt care accentuează și uneori exacerbează răspunsul local, (inflamator și imunitar).

**Problema pe care o rezolvă invenția** este legată de obținerea, în condiții de lucru la nivel (semi)industrial, a unor matrice biopolimerice preponderent colagenice, care asigură inducerea concomitentă a efectelor antimicrobiene, imunostimulatoare și imunomodulatoare utilizând un singur component biochimic- / biologic-activ, lactoferina, nativ înzestrată cu aceste caracteristici, înglobată, fără denaturare chimică și fără inactivare biochimică, în matrice (atelo)colagenice suplimentar formulate, rezultate prin deshidratarea protejată a unor compoziții fluide cu caracter coloidal. În respectivele compoziții se dozează și adjuvanți (bio)chimici cu rol de protejare a lactoferinei, de temporizare a eliberării și de modulare a activității sale, precum și compuși de interes biochimic general pentru susținerea metabolismului tisular al țesuturilor aflate în stare fiziologică sau patologică.

**Procedeul conform invenției permite obținerea unor matrice cu conținut de lactoferină** cu funcționalitatea unui dispozitiv medical utilizabil în aplicații biomedicale (hemostază în răni superficiale, asistarea vindecării rănilor, abraziunilor, escarelor, ulcerațiilor și arsurilor) și dermato-cosmetice (tratarea unor afecțiuni cutanate superficiale rezultate ca urmare a procedurilor cosmetologice, compensarea inflamațiilor locale secundare tratamentelor cosmetice, rebalansarea microbiotei tegumentelor și combaterea efectelor îmbătrânirii pielii). Procedeul care face obiectul invenției asigură obținerea unor produse utilizabile independent (de chiar persoana care se tratează), ori sub control și prin protocoale medicale. Urmare utilizării, respectivul produs eliberează lactoferina în stare nativă și biologic-activă, fapt care îi permite acesteia ca la contactul cu tegumentul intact ori afectat să joace rol de **imunomodulator activ pentru controlul inflamațiilor locale** (Drago-Serrano M.E., Campos-Rodríguez R., Carrero J.C., de la Garza M., *Lactoferrin: Balancing Ups and Downs of Inflammation Due to Microbial Infections*, International Journal of Molecular Sciences, 18(3), 2017, 501), de

**antibiotic activ împotriva biofilmelor bacteriene** (Quintieri L., Caputo L., Monaci L., Cavalluzzi M.M., Denora N., *Lactoferrin-Derived Peptides as a Control Strategy against Skinborne Staphylococcal Biofilms*, *Biomedicines*, 8, 2020, 323), de **antibiotic pentru asistarea dispozitivelor medicale** (Pall E., Roman A., *Lactoferrin Functionalized Biomaterials: Tools for Prevention of Implant-Associated Infections*, *Antibiotics (Basel)*, 9(8), 2020, 522), de **bacteriostatic pentru reechilibrarea microbiotei pielii** (Niaz B. și alții, *Lactoferrin (LF): a natural antimicrobial protein*, *International Journal of Food Properties*, 22(1), 2019, 1626-1641), dar și de **antioxidant implicat în blocarea peroxidării lipidelor epidermei** (Medina I., Tombo I., Satué-Garcia M.T., *Effects of Natural Phenolic Compounds on the Antioxidant Activity of Lactoferrin in Liposomes and Oil-in-Water Emulsions*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 2002, 2392-2399). Pentru a-și îndeplini respectivele roluri, lactoferina trebuie să poată difuza dinspre matricea solidă, către tegumentul intact sau lezat, la solicitarea acestuia și în cantități terapeutice active. Asigurarea difuziei se realizează prin gelifierea / destructurarea / solubilizarea matricei purtătoare în zona vizată a tegumentului, dar și prin contactul intim cu epiderma anterior umidificată.

În principiu, procedeul pentru obținerea matricelor biopolimerice solide microporoase, cu conținut de lactoferină, destinate aplicațiilor biomedicale și dermato-cosmetice, procedeul care face obiectul prezentei invenții, implică parcurgerea următoarelor etape, proiectate pentru a asigura reproductibilitatea compozițională a produselor finale, derulate toate în condiții de sterilitate și de curățenie industrială conforme reglementărilor din sfera dispozitivelor medicale din clasa III:

- i. – prepararea soluțiilor concentrate ale precursorilor biomacromoleculari;
- ii. – prepararea formei de înglobare a lactoferinei;
- iii. – prepararea și formularea compozițiilor fluide precursore ale matricelor;
- iv. – generarea matricelor microporoase solide, cu conținut de lactoferină;
- v. – condiționarea fizico-chimică a matricelor microporoase solide;
- vi. – post-procesarea fizico-mecanică a matricelor microporoase solide;
- vii. – asocierea matricelor post-procesate cu sisteme fizice cu rol de atașare la suprafața tegumentelor;
- viii. – ambalarea și sterilizarea produselor finale.

În continuare se prezintă **principiile și detaliile semnificative ale modului de conducere la scară semiindustrială a etapelor mai sus enumerate**, conform unui flux tehnologic a cărui parcurgere asigură obținerea de produse finale ce răspund exigențelor aplicațiilor bio-medicale și dermato-cosmetice.

(i) Conform prezentei invenții, compozițiile fluide de precursor biomacromolecular se prepară utilizând soluții de atelocolagen hipoimunogen biologic activ (apt de fibrilare), obținute aplicând procedeul descris în brevetul RO 126403 / 2015, cu excepția condiționării (care implică adaosuri de antibiotic și din acest motiv nu se efectuează). Soluția coloidală de start se supune unei condiționări particulare, prin diafiltrare contra unei soluții de acid boric 0,1 M în apă bidistilată, cu pH 5,1, schimbând 5 + 7 volume. (La concentrația de 0,1 M, acidul boric nu acționează ca antiseptic.) Valoarea slab acidă a pH-ului este necesară pentru menținerea lactoferinei în stare cationică, formă sub care este activă ca antibiotic. Soluția nu se tamponează, pentru a evita, în cazul utilizării matricei în scopuri biomedicale, interferarea în mecanismele refacerii tisulare. Acidifierea se realizează cu acid boric deoarece acesta funcționează ca acid Lewis (nu cedează protoni mediului apos ci consumă ioni hidroxil, întocmai ca și bioxidul de carbon dizolvat în apă), interferând astfel minimal cu proteinele (nu le alterează conformația). La final, soluția coloidală se concentrează prin ultrafiltrare, până la 6 + 9 g/L atelocolagen (determinat cantitativ prin măsurarea conținutului de hidroxiprolină).

(ii) Conform prezentei invenții, în vederea adăugării lactoferinei în soluția concentrată de atelocolagen aceasta se dizolvă mai întâi în soluție 0,1 M acid boric, alături de mici cantități de complecși chelatici ai ionilor de fier (feroși sau ferici), cum sunt bis-glicinatul feros (CAS 20150-34-9), ascorbatul feros (CAS 24808-52-4), fumaratul feros (CAS 141-01-5), gluconatul feros (CAS 299-29-6), gluconatul feric (CAS 38658-53-6), citratul feric monohidrat (CAS 2338-05-8), sau citratul de fier amoniacal (CAS 1185-57-5). Rolul sării complexe de fier adăugate este acela de a asigura echilibrul conformațional al lactoferinei, prin menținerea unui mic exces de ioni metalici legați de un chelator mai puțin eficient decât proteina, astfel încât cei doi chelatori să stabilească echilibre dinamice de complexare, lente cinetic în mediu umed și blocate în mediu uscat. Sarea complexă trebuie să lege suficient de stabil ionii de fier, pentru a evita angrenarea acestora în reacții red-ox capabile să dezvolte radicali liberi. Alegerea între sărurile feroase ( $Fe^{2+}$ ) și ferice ( $Fe^{3+}$ ) se face funcție de rapiditatea cu care ionii trebuie să devină biodisponibili ( $Fe^{2+}$  are o biodisponibilitate mai ridicată decât  $Fe^{3+}$ ), dar și de eficiența cu care cele două tipuri de ioni dezvoltă specii reactive de oxigen, potențial nocive ( $Fe^{2+}$  este mai activ decât  $Fe^{3+}$ ) (Collin F., *Chemical Basis of Reactive Oxygen Species Reactivity and Involvement in Neurodegenerative Diseases*, International Journal of Molecular Sciences, 20, 2019, 2407).

Tipul de lactoferină utilizată, prin prisma sursei acesteia, se alege funcție de exigențele aplicațiilor finale ale matricelor. Pentru aplicații biomedicale se utilizează

lactoferină de tip uman obținută prin tehnologia ADN recombinant (Conesa C., Calvo M., Sánchez L., *Recombinant human lactoferrin: a valuable protein for pharmaceutical products and functional foods*, *Biotechnology Advances*, 28(6), 2010, 831-838), de preferință exprimată în plante (cum este orezul). Pentru aplicații dermato-cosmetice se poate utiliza și lactoferină extrasă din zerul rezultat din laptele altor mamifere, sau de tip recombinant produsă de bovine transgenice (Wang M. și alții, *Large-scale production of recombinant human lactoferrin from high-expression, marker-free transgenic cloned cows*, *Scientific Reports*, 7, 2017, 10733).

(iii) Compozițiile fluide din care urmează a se obține matricele microporoase solide se prepară amestecând soluția coloidală concentrată de atelocolagen cu cea de lactoferină, ambele având pH 5,1 și temperatura de  $5 \pm 15$  °C, pentru a evita denaturarea lactoferinei. Dată fiind diferența semnificativă între vâscozitățile celor două soluții, amestecarea se efectuează în două etape: prin malaxare lentă și apoi prin recircularea lentă, în scop de omogenizare, prin duze de laminare înseriate, ce au orificii cu diametre diferite, cuprinse între 1 și 5 mm. În cursul malaxării se efectuează și formularea amestecului, adaugând adjuvanții necesari. Astfel, cu scopul de a reduce cinetica de schimb a ionilor de fier între cei doi chelatori, se adaugă **ascorbil-fosfat de sodiu** (CAS 66170-10-3), care prezintă afinitate de chelatare și potențial antioxidant mai reduse decât acidul ascorbic (acesta din urmă reducând  $\text{Fe}^{3+}$  la  $\text{Fe}^{2+}$ ). În plus, în cazul derivatului fosfatat, tendința de a induce precipitarea  $\text{Fe}^{3+}$  la hidroxid feric coloidal ( $\text{Fe}(\text{OH})_3$ ) este mult diminuată, fapt care menține concentrația prescrisă a ionilor de fier chiar și în soluția cu pH 5,1 (știut fiind faptul că precipitarea este amorțată la valori ale pH-ului mai mari decât 3). Pentru stimularea proliferării celulare se adaugă **retinol** (CAS 68-26-8) și  **$\beta$ -caroten** (CAS 7235-40-7). Pentru captarea radicalilor liberi și a formelor reactive de oxigen se adaugă **(+)- $\alpha$ -tocoferol** (CAS 59-02-9) și/sau **acid trans-ferulic** (CAS 537-98-4). În calitate de cicatrizant, se adaugă **hemi-pantetonat de calciu** (CAS 137-08-6). Dacă aplicația vizată impune instalarea rapidă a efectului antiinflamator (alături de cel cicatrizant), în compoziție se adaugă **alantoină** (CAS 97-59-6). Compușii hidrofobi se aduc mai întâi în microemulsie utilizând tensioactivi neionogeni lipsiți de potențial denaturant față de proteine (decil-D-glicozida (CAS 54549-25-6), lauril-glicozida (CAS 58846-77-8), sau n-dodecanoil-sucroza (CAS 25339-99-5)), cu rol de emulgator și 1,2-propilen-glicolul (CAS 57-55-6) drept co-surfactant.

(iv) Generarea matricelor microporoase solide se realizează supunând liofilizării compozițiile fluide anterior preparate, turnate în casete din oțel inoxidabil, sterilizate prin autoclavizare. Pentru a obține matrice cu caracteristici reproductibile, liofilizarea se



conduce conform unui program de subrăcire, congelare, sublimare sub vid și uscare secundară adaptat compozițiilor procesate. Subrăcirea se realizează în congelator separat, evitând cristalizarea apei. Casetele cu compoziția subrăcită se introduc rapid în liofilizatorul subrăcit în prealabil la temperaturi cu  $5 + 15$  °C mai coborâte decât cele atinse în compoziție. După o scurtă etapă de menținere sub vid moderat (pentru eliminarea condensului), se inițiază congelarea compoziției la valoarea minimă a temperaturii permisă de utilaj, atinsă cu cea mai abruptă pantă posibilă. Uscarea primară se conduce sub vid înaintat, iar uscarea secundară sub vid moderat și temperaturi crescânde, care (doar) la final pot atinge  $30 + 40$  °C.

(v) Condiționarea fizico-chimică a matricelor poroase rezultate după liofilizare are drept scop asigurarea reproductibilității caracteristicilor de biomaterial ale produsului de la o șarjă la alta și se realizează prin menținere în atmosferă cu umiditate și temperatură controlată.

(vi) Post-procesarea fizico-mecanică a matricelor poroase este opțională și vizează formarea lor spațială și ajustarea dimensiunilor lor funcție de gama de utilizare a produsului finit. Se realizează prin aplatizare și decupare, eventual prin stivuirea straturilor aplatizate cu alte matrice sau (bio)materiale plane, cu grosimi reduse.

(vii) Asocierea matricelor divers post-procesate cu sisteme fizice care au rol de atașare sau fixare la, sau pe suprafața tegumentelor (eventual în zone afectate de răni, ulceratii etc.) este și ea opțională și dependentă de aplicația vizată. Se realizează prin montarea matricelor pe suprafața acoperită cu adezivi a unor folii sau filme polimerice, ori a unor materiale textile. Suporturile adezive se decupează după contururi adecvate aplicației, fie înaintea montării, fie după ce montarea s-a efectuat.

(viii) Ambalarea în condiții de curățenie de nivel ISO 6 și sterilizarea produselor finale sunt obligatorii. Sterilizarea se realizează prin expunere la radiație gamma, la dozele minim necesare, pentru a evita degradarea lactoferinei și eliberarea ionilor ferici.

**Procedeu pentru obținerea matricelor microporoase, cu conținut de lactoferină, destinate aplicațiilor biomedicale și dermato-cosmetice, conform prezentei invenții, prezintă următoarele avantaje:**

- asigură menținerea lactoferinei în stare nederaturată și deci biologic-activă;
- asigură matricelor obținute următoarele caracteristici fizico-chimice, înainte de aplatizare (operație care le modifică semnificativ, definitiv și variabil):
  - densitatea aparentă:  $0,07 \pm 0,02$  g/cm<sup>3</sup>;
  - densitatea reală (picnometrică; 2-propanol 99,8 %):  $0,34 \pm 0,05$  g/cm<sup>3</sup>;
  - porozitatea:  $82 \pm 3$  %;

- asigură matricelor obținute următoarele caracteristici compoziționale:
  - substanță uscată:  $84 \pm 1$  %, determinată în atmosferă cu umiditatea relativă de  $50 \pm 4$  %, la temperatura de  $23 \pm 3$  °C;
  - conținut de lactoferină:  $0,2 \div 0,8 \pm 0,05$  mg/cm<sup>3</sup>, raportat la substanța uscată a matricei;
  - conținut total de colagen (prin conținutul de hidroxiprolină):  $86 \pm 2,1$  %;
  - conținut de colagen nativ (prin metoda cu Sirius Red F3B):  $79 \pm 1,6$  %, respectiv  $92,6 \pm 4,2$  % din conținutul total de colagen;
  - conținutul de materii grase (prin metoda Weibull-Stoldt): sub 0,4 %, pentru matricele în care compușii liposolubili s-au dozat sub formă de microemulsie.
- asigură potențiale de eliberare a lactoferinei, la 37 °C, (în procente masice) de peste 76 % în medii umede, după 30 minute de la contactare (determinare prin îmbibare cu soluție Ringer, static, urmată de centrifugare);
- permite formularea compoziției, funcție de natura aplicațiilor vizate, din sfera bio-medicală și a dermato-cosmeticii;
- asigură menținerea caracteristicilor produsului final pentru durate de stocare de  $6 \div 9$  luni, la temperatura ambiantă ( $10 \div 28$  °C), respectiv de  $12 \div 24$  luni la frigider ( $2 \div 8$  °C), în ambalaje închise ermetic și supuse sterilizării cu radiație gamma.

În cele ce urmează, se prezintă exemple de conducere a etapelor și operațiilor de obținere și post-procesare a matricelor microporoase cu conținut de lactoferină, conform invenției. Descrierile de mai jos au titlu exemplificativ din următoarele puncte de vedere:

- tipul, originea și forma de prezentare a (atelo)colagenului utilizat drept precursor;
- tipul natura și caracteristicile lactoferinei utilizate;
- tipul, compoziția și modul de preparare a formelor de înglobare a lactoferinei;
- natura și concentrațiile compușilor (bio)chimici mic-moleculari, oligomeri sau macromoleculari utilizați în oricare dintre operațiile procesului;
- rapoartele de amestecare și diluare utilizate în oricare dintre operațiile de obținere, formulare și post-procesare a matricelor;
- parametrii fizico-chimici de lucru și compozițiile chimice implicate în oricare dintre etapele procesului;

- natura, numărul și succesiunea operațiilor unitare din cadrul etapelor generice ale procesului;
- echipamentele, instalațiile și dispozitivele utilizate pentru obținerea, formularea și post-procesarea matricelor, în oricare dintre etapele procesului;
- natura și concentrațiile speciilor chimice adjuvante și materialelor implicate în formularea compozițiilor precursorare, precum și în condiționarea matricelor;
- tipul, natura și dimensiunile sistemelor fizice destinate fixării matricelor postprocesate pe suprafața tegumentelor;
- modul de asociere a matricelor obținute conform invenției, cu sistemele fizice destinate fixării lor pe suprafața tegumentelor;
- denumirile atribuite etapelor, operațiilor și proceselor descrise în invenție.

Acolo unde nu se specifică în mod expres, operațiile se efectuează la temperatura ambientală ( $15 \pm 28$  °C). Apa utilizată pentru prepararea soluțiilor și a compozițiilor apoase de tratare este dublu distilată sau deionizată până la conductivități de cel mult  $1 \mu\text{S}$  (ISO 3696:1987), sterilă și liberă de pirogeni (conform Farmacopeei Europene, sortimentul „Apă pentru preparate injectabile”). Toate soluțiile și toți reactivii lichizi se supun sterilizării prin filtrare, cu excepția celor care se pot steriliza în autoclavă și a celor potențial ne-infectabili (cum sunt solvenții organici).

#### **Exemplul 1 – Prepararea soluției concentrate de atelocolagen hipoimunogen**

Soluția coloidală de atelocolagen hipoimunogen biologic-activ, de înaltă puritate, de tip I, obținută conform procedurii descris în brevetul RO 126403 / 2015, exemplele 1 și 2, nesupusă operațiilor de condiționare, se caracterizează din punctul de vedere al conținutului de colagen total și nativ, se termostatează la  $5 \pm 1$  °C și apoi se concentrează până la  $6 \pm 9$  g/L colagen total, prin ultrafiltrare prin membrane ceramice cu limita de trecere de 50 kDa, sub o presiune de  $1,8 \pm 2,6$  bari. După concentrare, pH-ul soluției se aduce la valoarea 5,1, prin diafiltrare contra unei soluții de 6,2 g/L acid boric, schimbând  $5 \pm 7$  volume. La final, soluția se maturează static, timp de  $12 \pm 18$  ore, la  $5 \pm 1$  °C, sub vid moderat ( $10 \pm 25$  mbar), în incintă sterilă.

#### **Exemplul 2 – Prepararea formei de înglobare a lactoferinei**

Cantitatea necesară de lactoferină (umană recombinantă) se stabilește astfel încât în matricea finală uscată să se asigure un conținut de  $0,2 \pm 0,8$  mg/cm<sup>3</sup>, respectiv

2,5 + 10 pM/cm<sup>3</sup>. În acest scop, se iau în considerare următoarele valori ale caracteristicilor matricei: substanța uscată 82 + 86 % m/m, densitatea picnometrică 0,30 + 0,35 g/cm<sup>3</sup>. Pentru a atinge conținutul de lactoferină impus, concentrația acesteia în soluția coloidală de atelocolagen complet formulată trebuie să se situeze în plaja 0,5 + 2,5 mg/mL. Cantitatea de lactoferină stabilită prin calcul pentru prepararea unei șarje (cu volumul final de 10 + 120 L) se cântărește cu o precizie de ± 100 μg, apoi se umectează și se dizolvă cu mici adaosuri de soluție 6,2 g/L acid boric, răcită în prealabil la 5 + 15 °C, în raport masic final de 1 : 50 + 1 : 200 lactoferină : soluție de acid boric. După completa dizolvare, în soluția de lactoferină se adaugă, sub agitare moderată, o sare complexă feroasă sau ferică (bis-gicinat feros, ascorbat feros, fumarat feros, gluconat feros, gluconat feric, citrat feric monohidrat, sau citrat feric amoniacal), în raport masic de 30 : 1 + 150 : 1 lactoferină : sare complexă. Soluția rezultată se introduce în flacoane sterile pentru centrifugare, cu capac ermetic și apoi i se aplică o maturare în trei etape, ce diferă între ele prin valoarea temperaturii la care se realizează, astfel: (i) încălzire la 30 + 35 °C și menținere timp de 30 + 60 minute, sub agitare lentă prin unduire, (ii) răcire la 1 + 6 °C și menținere statică timp de 8 + 12 ore, (iii) aducere și menținere la temperatura ambiantă, timp de 3 + 6 ore, sub agitare lentă prin unduire. La final, soluția se centrifughează la 1200 + 3600 g, timp de 10 + 30 minute, reținând supernatantul.

### Exemplul 3 – Prepararea și formularea soluțiilor / emulsiilor de adjuvanți

**Adjuvanții solubili în apă** se aduc sub formă de soluție minimal diluată, iar adjuvanții hidrofobi se includ în microemulsii. Astfel, ascorbil-fosfatul de sodiu, în raport masic de 1 : 30 + 1 : 90 față de cantitatea de lactoferină, se dizolvă, sub agitare lentă, în 200 + 500 % apă pentru preparate injectabile, degazată prin menținere sub vid (30 + 50 mbar, 120 minute) și încălzită la 20 + 30 °C. Se dizolvă apoi hemi-pantetonatul de calciu, în raport masic de 1 : 10 + 1 : 60 față de lactoferină și eventual alantoina, în cantitate calculată pentru a atinge o concentrație de 2,5 + 10 mg/L în soluția coloidală de atelocolagen. Pentru captarea radicalilor liberi și ca protector pentru vitaminele liposolubile se adaugă 0,1 + 0,5 mg/mL acid trans-ferulic predizolvat în soluție de acid boric 0,1 M. La final, soluția se diluează 1 : 1 cu soluție 6,2 g/L acid boric.

Cantitățile necesare de **adjuvanți hidrofobi** (α-tocoferol, retinol și β-caroten) se stabilesc funcție de aplicația vizată pentru matricea microporoasă finală. Pentru aplicații biomedicale se au în vedere consumurile vitaminelor în rană deschisă. Astfel, masele ce vor fi incluse trebuie să asigure, raportat la unitatea de volum a produsului uscat,

următoarele concentrații:  $9 + 15 \mu\text{g}/\text{cm}^3$  retinol,  $20 + 80 \mu\text{g}/\text{cm}^3$   $\beta$ -caroten și  $60 + 90 \mu\text{g}/\text{cm}^3$   $\alpha$ -tocoferol. Pentru aplicații dermato-cosmetice, cantitățile de adjuvanți hidrofobi se înmulțesc cu un coeficient de 2 până la 5. Cantitățile necesare se calculează considerând următoarele valori ale caracteristicilor matricei: substanța uscată  $82 + 86 \%$  m/m, densitatea picnometrică  $0,30 + 0,35 \text{ g}/\text{cm}^3$ . În vederea emulsionării, cantitățile de adjuvanți hidrofobi, cântărite cu precizie de  $\pm 100 \mu\text{g}$ , se dizolvă mai întâi, separat, în volume minim necesare de solvent organic (etanol, acetonă, sau cloroform, în această ordine a preferințelor). Separat, prin topire la  $50 + 55 \text{ }^\circ\text{C}$ , se prepară un amestec  $3 : 1 + 12 : 1$  n-dodecanoil-sucroză : 1,2-propilen-glicol. După răcirea la  $35 \text{ }^\circ\text{C}$ , amestecul lichid vâscos rezultat se amestecă în raport masic de  $1 : 1 + 2,5 : 1$  cu cele trei soluții cumulate de adjuvanți hidrofobi în solvent organic, sub agitare eficientă, până la obținerea unei mase omogene. Peste respectiva masă se adaugă, sub agitare eficientă, la început în picături și apoi în fir subțire, soluție  $6,2 \text{ g}/\text{L}$  acid boric, în raport masic de  $300 + 900 : 1$ . După obținerea unei emulsii grosiere, aceasta se supune vortexării, adăugând încă  $300 + 500 \%$  soluție de acid boric, până la obținerea unei microemulsii omogene și stabile. Aceasta din urmă se maturează la  $40 + 45 \text{ }^\circ\text{C}$ , timp de  $60 + 90$  minute, sub agitare eficientă, urmărind stabilitatea sisemului coloidal.

#### **Exemplul 4 – Prepararea compoziției fluide precursorare**

Soluția coloidală concentrată de atelocolagen adusă la pH 5,1 (conform exemplului 1) se introduce în cuva unui malaxor și se răcește la  $5 + 15 \text{ }^\circ\text{C}$ . Apoi, sub malaxare lentă, peste aceasta se adaugă, în fir subțire sau în mici porții egale, soluția de lactoferină formulată (conform exemplului 2), malaxând până la completa omogenizare. Masa fluidă rezultată se introduce într-un sistem de amestecare prin laminare, alcătuit din două vase etanșe, conectate între ele printr-un tub pe lungimea căruia se plasează 3, 5, sau 7 duze ale căror orificii au diametre cuprinse între 1 și 5 mm. Ordinea de amplasare a duzelor urmează regula: de la 5 spre 1 mm și apoi din nou spre 5 mm. Întreg sistemul de amestecare se sterilizează în prealabil și se umectează cu soluție de acid boric 0,1 M. Masa fluidă este apoi pompată pneumatic (sub pernă de azot), prin tubul de legătură, între cele două vase etanșe, alternativ, de  $30 + 50$  de ori, la debite care să evite spumarea. Pe durata pompării alternative, în tubul de legătură, după prima duză cu diametrul de 5 mm, se injectează treptat și corelat cu sensul de pompare, la un capăt microemulsia adjuvanților hidrofobi, iar la celălalt soluția adjuvanților hidrosolubili (ambele preparate conform exemplului 3). Pe durata amestecării prin laminare, temperatura se menține la valoarea inițială, de  $5 + 15 \text{ }^\circ\text{C}$ , prin

termostatarea vaselor. La final, masa fluidă se maturează static, la  $5 \pm 15$  °C, timp de  $8 \pm 12$  ore.

#### **Exemplul 5 – Generarea matricelor solide poroase, prin liofilizare**

Compoziția fluidă precursoră se toarnă în casete din oțel inoxidabil (aliaj 316L) cu înălțimea de 15 mm și arii adaptate aplicațiilor vizate, anterior curățate, sterilizate și umectate cu soluție sterilă de acid boric 0,1 M. Înălțimea de turnare nu va depăși 12 mm. În continuare, compoziția repartizată în casete se supune subrăcirii, la temperaturi în plaja  $0 \pm -8$  °C, timp de  $3 \pm 8$  ore, într-un congelator separat. În paralel, incinta liofilizatorului se aduce la o temperatură cu  $5 \pm 15$  °C sub cea la care s-a răcit compoziția fluidă. După încărcarea rapidă a casetelor în liofilizator, presiunea în incinta acestuia se aduce la  $30 \pm 50$  mbar și se inițiază etapa de congelare, coborând temperatura până la  $-40 \pm -60$  °C, cu o pantă de  $1 \pm 3$  °C/minut. Congelarea se continuă timp de  $6 \pm 10$  ore, scăzând progresiv presiunea, în trei etape, până la  $5 \pm 10$  mbar. În continuare, se inițiază etapa de sublimare controlată, coborând presiunea în liofilizator până la  $0,10 \pm 0,15$  mbar și menținând-o, în condiții izoterme, timp de  $2 \pm 6$  ore. Apoi, în condiții izobare, temperatura în interiorul matricei poroase în formare se crește cu o pantă de  $1,5 \pm 3$  °C/oră, până la temperatura ambiantă. Etapa uscării secundare a matricei poroase se conduce izobar, ridicând temperatura în incinta liofilizatorului până la  $+40$  °C, cu o pantă de  $1,5 \pm 3,0$  °C/oră. După încheierea ultimei etape a liofilizării, incinta utilajului se inundă treptat cu azot gazos uscat, în condiții izoterme, până la o ușoară suprapresiune față de presiunea atmosferică.

#### **Exemplul 6 – Condiționarea fizico-chimică a matricelor solide poroase**

Casetele cu matricea solidă poroasă se scot din liofilizator și se introduc, în vederea maturării, într-o cameră de climatizare, menținându-se timp de  $3 \pm 18$  ore, la temperatura de  $25 \pm 1$  °C și umiditatea relativă a aerului de  $55 \pm 3$  %, sub un flux de aer steril recirculat de  $5 \pm 8$  m<sup>3</sup>/h pentru fiecare metru cub al volumului incintei. La finalul maturării, înainte de preluarea casetelor din incintă, aceasta se ventilează timp de  $20 \pm 40$  minute, cu un flux de aer steril de  $15 \pm 30$  m<sup>3</sup>/h pentru fiecare metru cub al volumului incintei, în vederea eliminării urmelor de compuși volatili.

#### **Exemplul 7 – Post-procesarea fizico-mecanică a matricelor solide poroase**

Funcție de aplicația vizată, matricele solide poroase se compactează diferențiat, prin aplatizare. Operația se efectuează prin presare la rece între folii din Mylar® tip A

(polietilen tereftalat extrudat) transparent, cu grosimea de 0,5 mm, utilizând o presă hidrolică dotată cu plăci din oțel inoxidabil, a cărei închidere se limitează la  $0,8 \pm 2,2$  mm, pentru un timp de menținere de  $5 \pm 15$  secunde. Aplatizarea se poate aplica și unei stive alcătuită din matricea produsă conform descrierilor de mai sus și mai multe substraturi poroase, identice sau diferite, din atelocolagen, polizaharide, sau polimeri de (semi)sinteză. Pentru una / unele dintre folii, Mylar<sup>®</sup>-ul se poate înlocui cu un alt material (poliuretan, hârtie parafinată, hârtie plasticată, folii polimerice metalizate, materiale polimerice sau textile cu peliculă adezivă etc.). Structura compactată, încă flancată de folii, se decupează după diverse contururi, prin ștanțare în presă hidrolică, sau sub un valț profilat. Decuparea se poate face pe întreaga grosime a ansamblului matrice – folii, sau menținând una dintre folii intactă, ori doar perforând-o.

#### **Exemplul 8 – Asocierea matricelor compactate cu sisteme fizice destinate atașării la suprafața tegumentelor**

Opțional, funcție de aplicația vizată, matricele post-procesate fizico-mecanic se detașează de cel puțin una dintre foliile de flancare, se pulverizează superficial cu o compoziție de îmbibare ce conține unul sau mai mulți dintre următorii adjuvanți: 1-butanol, soluție  $8 \pm 12$  % lactat de butil în 2-propanol,  $0,2 \pm 0,6$  mg/mL pantotenat de calciu,  $0,1 \pm 0,5$  mg/mL acid nicotinic, apoi se zvântă în flux de aer steril și se montează pe suprafața unor materiale polimerice sau textile acoperite cu peliculă adezivă. După aplicarea unui strat de protecție definitiv sau temporar, structura rezultată se decupează după contururi adecvate. Toate operațiile se efectuează sub baldachin cu circulație verticală a aerului steril (minimum  $20 \text{ m}^3/\text{h}/\text{m}^3$ ).

#### **Exemplul 9 – Ambalarea și sterilizarea produselor finale**

Piese obținute conform descrierii din exemplul 8 se sortează dimensional și calitativ, iar apoi se includ în pachete sau în cutii etanșe și se ambalează corespunzător aplicației vizate. Pachetele ambalate se supun sterilizării cu radiație gamma (sursă de <sup>60</sup>Co), la doze administrate / absorbite minim necesare asigurării sterilității, corelate cu potențialul de degradare a componentelor matricelor (lactoferină și respectiv adjuvanți). De preferință doza administrată va fi 15 kGy, timp de 45 minute, pentru inactivarea fungilor, bacteriilor, și micoplasmelor (nu și a sporilor), sau de 25 kGy, timp de 15 minute, caz în care sunt inactivați și sporii, dar lactoferina pierde din eficacitate într-o măsură nereproductibilă.

## REVENDICĂRI

1. Procedeu pentru obținerea matricelor biopolimerice microporoase solide, cu conținut de lactoferină, destinate aplicațiilor biomedicale și dermato-cosmetice, care constă în parcurgerea succesivă a următoarelor opt etape, derulate în condiții tehnologice și de curățenie și sterilitate adecvate fabricării dispozitivelor medicale:

- prepararea soluțiilor concentrate ale precursorilor biomacromoleculari;
- prepararea formei de înglobare a lactoferinei;
- prepararea și formularea compozițiilor fluide precursoare ale matricelor;
- generarea matricelor microporoase solide, cu conținut de lactoferină, prin liofilizare;
- condiționarea fizico-chimică a matricelor microporoase solide;
- post-procesarea fizico-mecanică a matricelor microporoase solide;
- asocierea matricelor post-procesate cu sisteme fizice cu rol de atașare la suprafața tegumentelor;
- ambalarea și sterilizarea produselor finale,

**caracterizat prin aceea că :**

- asigură matricii finale capacitatea de a induce concomitent efecte antimicrobiene, imunostimulatoare și imunomodulatoare utilizând un singur component biochimic- / biologic-activ, lactoferina, înglobată într-o masă de atelocolagen hipoimunogen biologic activ;
- asigură menținerea în stare nedegradată a lactoferinei pe întreaga durată a proceselor de prelucrare și transformare pe care procedeul le implică;
- utilizează lactoferină umană recombinantă saturată cu ioni ferici, în vederea obținerii matricelor destinate aplicațiilor biomedicale și respectiv lactoferină semisaturată cu ioni ferici, extrasă din lapte de bovine, eventual de tip uman recombinant exprimată în celulele lactifere ale bovinelor, atunci când sunt vizate aplicații dermato-cosmetice;
- asigură formularea complexă a compoziției formelor fluide precursoare ale matricelor, prin dozarea de adjuvanți protectori și potențiatori ai lactoferinei;
- asigură matricelor obținute, înainte de condiționarea lor fizico-chimică și de post-procesarea lor, următoarele caracteristici fizico-chimice: densitate aparentă:  $0,07 \pm 0,02 \text{ g/cm}^3$ , densitate picnometrică:  $0,34 \pm 0,05 \text{ g/cm}^3$  și porozitate:  $82 \pm 3 \%$ ;



- asigură matricelor obținute următoarele caracteristici compoziționale: substanță uscată:  $84 \pm 1$  %, conținut de lactoferină:  $0,2 \div 0,8 \pm 0,05$  mg/cm<sup>3</sup> raportat la substanța uscată a matricei, conținut total de colagen:  $86 \pm 2,1$  %, conținut de colagen nativ:  $79,5 \pm 1,6$  % din conținutul total de colagen;
- permite formularea nuanțată a compoziției matricelor, în oricare dintre etapele de preparare a precursorilor, de condiționare fizico-chimică și de asociere cu sisteme fizice cu rol de atașare la suprafața tegumentelor, formulare dependentă de aplicațiile vizate, de factură biomedicală sau dermato-cosmetică.

2. Procedeu conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** în etapa de preparare a soluțiilor concentrate de atelocolagen precursor ( $6 \div 9$  g/L), pH-ul acestora se aduce la o valoare slab acidă (5,1) prin diafiltrare contra acidului boric (în soluție 0,1 M), un acid de tip Lewis care nu eliberează protoni în mediul apos, dar care va menține lactoferina în stare complet protonată și deci biologic activă, prin consumarea ionilor hidroxil generați dinamic în soluțiile coloidale precusoare formării matricei solide microporoase.

3. Procedeu conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** în etapa de preparare a formei de înglobare a lactoferinei, aceasta se dizolvă într-o soluție apoasă a aceluiași acid boric (0,1 M), până la un raport masic de amestecare de  $1 : 50 \div 1 : 200$  față de soluția acidă, apoi în soluție se dozează o sare complexă ferică ( $Fe^{3+}$ ) sau feroasă ( $Fe^{2+}$ ), cu rol stabilizant al conformației lactoferinei, sare aleasă din gama: citrat feric amoniacal, citrat feric monohidrat, gluconat feric, gluconat feros, fumarat feros, ascorbat feros, bis-glicinat feros, în raport masic de  $1 : 30 \div 1 : 150$  față de lactoferină, iar soluția rezultată se maturează la trei temperaturi diferite ( $30 \div 35$  °C,  $1 \div 6$  °C,  $18 \div 22$  °C), pentru durate diferite, și apoi se centrifughează pentru eliminarea eventualelor precipitate formate.

4. Procedeu conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că**, în vederea formulării compoziției fluide precusoare, se utilizează două categorii de adjuvanți: hidrosolubili (ascorbil-fosfatul de sodiu, hemi-pantotenat de calciu, acid trans-ferulic și alantoina), respectiv hidrofobi ( $\alpha$ -tocoferol, retinol și  $\beta$ -caroten), fiecare dintre aceștia selectați pentru a seconda, potența, complementa sau extinde acțiunea lactoferinei în aplicația biomedicală sau dermato-cosmetică vizată.

5. Procedeu conform revendicărilor 1 și 4, **caracterizat prin aceea că** adjuvanții hidrosolubili se dizolvă succesiv în  $200 \div 500$  % apă deionizată liberă de pirogeni, degazată și încălzită la  $20 \div 30$  °C, începând cu ascorbil-fosfatul de sodiu în raport masic de  $1 : 30 \div 1 : 90$  față de lactoferină, continuând cu hemi-pantetonatul de calciu

în raport masic de 1 : 10 + 1 : 60 față de lactoferină, alantoină în cantitatea necesară pentru a atinge concentrația de 2,5 + 10 mg/L în soluția coloidală precursoră și încheind cu acidul trans-ferulic în cantitate de 0,1 + 0,5 mg/mL față de volumul soluției apoase de precursori hidrosolubili, dizolvat fiind soluție de acid boric 0,1 M, iar la final, soluția astfel preparată se diluează 1 : 1 cu soluție de acid boric 0,1 M.

6. Procedeu conform revendicărilor 1 și 4, **caracterizat prin aceea că** adjuvanții hidrofobi se dozează sub formă de microemulsie, preparată pornind de la cantități care să asigure în produsul final concentrațiile de 9 + 15  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$  retinol, 20 + 80  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$   $\beta$ -caroten și 60 + 90  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$   $\alpha$ -tocoferol, dizolvându-i inițial într-un solvent organic adecvat și apoi emulsionându-i, prin intermediul unui amestec de n-dodecanoil-sucroză și 1,2-propilen-glicol în raport masic de 3 : 1 + 12 : 1, mai întâi cu 300 + 900 : 1 acid boric 0,1 M și apoi, sub vortexare, cu încă 300 + 500 % soluție a aceluiași acid, microemulsia rezultată maturându-se la 40 + 45 °C, timp de 60 + 90 minute, sub agitare eficientă.

7. Procedeu conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** în etapa de preparare și formulare a compozițiilor fluide precursoră ale matricelor, soluția coloidală concentrată de atelocolagen în acid boric se malaxează mai întâi, la 5 + 15 °C, cu soluția de lactoferină formulată conform revendicării 3, apoi se amestecă, prin laminare în regim du-te-vino, cu formele lichide ale celor două tipuri de adjuvanți preparate conform revendicărilor 5 și 6, pompată fiind de 30 + 50 de ori prin duze înseriate ce au orificii cu diametre diferite, menținând temperatura amestecului la 5 + 15 °C, iar la final aplicând amestecului o maturare la aceeași temperatură, timp de 8 + 12 ore.

8. Procedeu conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** în etapa de generare a matricelor microporoase solide, amestecul fluid precursor se distribuie în casete din oțel ioxidabil, se subrăcește la 0 + -8 °C timp de 3 + 8 ore, evitând congelarea, apoi se congelează în liofilizator până la -40 + -60 °C sub depresiune (30 + 50 mbar), cu o pantă de 1 + 3 °C/minut, după care se supune uscării primare în regim izoterm, la 0,1 + 0,15 mbar timp de 2 + 6 ore, continuată cu uscarea secundară în regim izobar și la temperaturi crescătoare cu o pantă de 1,5 + 3,0 °C/oră, până la +40 °C, operația de uscare prin liofilizare încheindu-se prin inundarea cu azot gazos uscat a incintei utilajului, înainte de extragerea matricelor solide microporoase astfel obținute.

9. Procedeu conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** în etapa de condiționare fizico-chimică a matricelor solide microporoase, acestea se supun maturării timp de 3 + 18 ore, în incintă climatizată, la temperatura de 25 ± 1 °C și umiditate relativă a aerului de 55 ± 3 %, sub un flux de aer steril recirculat de 5 + 8 m<sup>3</sup>/oră pentru fiecare metru cub al volumului incintei, iar apoi unei ventilări cu aer steril

proaspăt, timp de 20 ÷ 40 minute, la un debit de 15 ÷ 30 m<sup>3</sup>/oră pentru fiecare metru cub al volumului incintei.

**10.** Procedeu conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** în etapa de post-procesare fizico-mecanică, matricele condiționate se supun opțional compactării prin aplatizare la rece, între folii din Mylar<sup>®</sup> tip A, cu grosimea de 0,5 mm, utilizând o presă hidraulică a cărei închidere se limitează la 0,8 ÷ 2,2 mm, pentru timpi de menținere de 5 ÷ 15 secunde; la finalul operației de aplatizare, matricele solide încă flancate de foliile din Mylar<sup>®</sup> se decupează după forme și la arii corespunzătoare aplicațiilor vizate.

**11.** Procedeu conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** în etapa de asociere a matricelor anterior alpatizate și decupate, cu sistemele fizice destinate atașării lor prin adeziune temporară la suprafața tegumentelor, acestea se îmbibă superficial, opțional, prin pulverizare fină cu o soluție de 1-butanol în care s-au dizolvat 8 ÷ 12 % lactat de butil în 2-propanol, 0,2 ÷ 0,6 mg/mL pantotenat de calciu și 0,1 ÷ 0,5 mg/mL acid nicotinic, pentru a le favoriza contactul intim cu porțiunile de tegument pe care urmează a se aplica.

**12.** Procedeu conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că**, după ambalarea corespunzătoare aplicațiilor vizate, matricele se supun sterilizării prin iradiere gamma, la doze administrate de 15 kGy, timp de 45 minute, în cazul celor destinate utilizărilor dermato-cosmetice, respectiv la doze de 25 kGy, timp de 15 minute, în cazul celor destinate aplicațiilor biomedicale.