



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2011 01263**

(22) Data de depozit: **29/11/2011**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30/03/2016** BOPI nr. **3/2016**

(41) Data publicării cererii:

30/08/2013

BOPI nr. **8/2013**

(73) Titular:

• **INSTITUTUL NAȚIONAL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU
CHIMIE ȘI PETROCHIMIE - ICECHIM,
SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR.202,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO**

(72) Inventatori:

• **DIMONIE OLGA DOINA AFINA,
ALEEA BAI DE ARIEȘ NR.2, BL.7, AP.2,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **TRANDAFIR INNA GEORGETA,
STR.SERG.PAMFIL NĂSTASE NR.53,
BL. 29, AP.14, SECTORUL 2, BUCUREȘTI,
B, RO;**
• **NICOLAE CRISTIAN ANDI,
CALEA CRÂNGAȘI NR.14, BL.40, SC.A,
ET.5, AP.17, SECTORUL 6, BUCUREȘTI, B,
RO;**

• **GABOR AUGUSTA RALUCA,
SAT FUNDENI, COMUNA DOBROEȘTI, IF,
RO;**

• **CONSTANTIN VIRGIL, STR. TULNICI
NR.10, BL.40, SC.2, ET.2, AP.72,
SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO;**

• **PETRACHE MARIUS, STR. LAURILOR
NR.2, BL.35 A, SC.C, ET.4, AP.59,
PLOIEȘTI, PH, RO;**

• **CÎMPEAN ANIȘOARA,
STR.ILEANA COSÂNZEANA NR.10, BL.P 7,
SC.3, ET.3, AP.78, SECTOR 5,
BUCUREȘTI, B, RO;**

• **GĂLĂȚEANU BIANCA, STR.HUEDIN
NR.11, BL.11, SC.2, ET.2, AP.79,
SECTORUL 4, BUCUREȘTI, B, RO;**

• **COSTACHE MARIETA, STR.TELIȚA
NR.12, BL.56, SC.4, ET.1, AP.46,
SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO**

(56) Documente din stadiul tehnicii:

**CN 102020777 (A); RO 123143 B1;
RO 122393 B1**

(54)

**COMPOZIȚIE ȘI PROCEDEU PENTRU OBTINEREA UNOR
HIDROGELURI DESTINATE REGENERĂRII ȚESUTULUI
ADIPOS**



Invenția se referă la o compoziție și la un procedeu de obținere a unor hidrogeluri destinate regenerării țesutului adipos.

Hidrogelurile se pot prepara, în general, pe bază de polimeri naturali și/sau sintetici. Hidrogelurile derivate din polimeri naturali au fost frecvent utilizate în medicina reparatorie, datorită proprietăților lor similare cu cele ale ECM natural [Tan H., Gong Y., Lao L., Mao Z., Gao C., **Gelatin/chitosan/hyaluronan ternary complex scaffold containing basic fibroblast growth factor for cartilage tissue engineering**, J. Mater. Sci., Mater: Med., 2007, 18, 1961-1968] și [Awad H. A., Wickham M. Q., Leddy H. A., Gimble J. M., Guilak F., **Chondrogenic differentiation of adipose-derived adult stem cells in agarose, alginate, and gelatin scaffolds**, Biomaterials, 2004, 25, 3211-3222].

Hidrogelurile pe bază de compuși macromoleculari, naturali și sintetici, posedă o serie de proprietăți care fac posibilă utilizarea ca suporturi în ingineria țesuturilor. Proprietățile se referă la: conținutul ridicat de apă, similar țesuturilor, capacitatea de a încapsula în mod omogen celule, un transfer de masă eficient și o acțiune invazivă minimă. Hidrogelurile înalt hidratate pot mima foarte bine proprietățile fizice și chimice ale matricei extracelulare (ECM). Proprietățile fizice ale multor tipuri de hidrogeluri sunt ușor de manipulat. Din motivele enumerate mai sus rezultă că hidrogelurile reprezintă un mediu ideal pentru suport, proliferare și diferențiere [Nicodemus G. D., Bryant S. J., **Cell encapsulation in biodegradable hydrogels for tissue Engineering applications**, Tissue Eng., 2008, 14, 149-165], [Lee K. Y., Mooney D. J., **Hydrogels for tissue engineering**, Chem. Rev., 2001, 101, 1869-1879] și [Drury J. L., Mooney D. J., **Hydrogels for tissue engineering: Scaffold design variables and applications**, Biomaterials, 2003, 24, 4337-4351].

Biomaterialele naturale manifestă o excelentă bioactivitate datorită prezenței în structura lor a componentelor ECM. Cu toate acestea, hidrogelurile provenite din polimeri naturali suferă o rapidă degradare după contactul cu mediul sau cu fluidele corpului. Din aceste motive, o strategie care pare foarte atractivă este încorporarea speciilor bioactive (de exemplu, celule, factori de creștere, peptide sau proteine) într-un material sintetic, rezultând un hidrogel suport biomimetic având funcții bioactive pentru un răspuns celular optim. Polimerii naturali reprezentativi sunt: collagenul, gelatina, chitosanul, acidul hialuronic, agaroză, alginatul, fibrina, poli-L-lizina.

Polimerii sintetici sunt atractivi pentru obținerea hidrogelurilor destinate ingineriei reparative a țesuturilor, datorită proprietăților lor fizice și chimice, care, în mod specific, sunt mult mai controlabile și mai reproductibile decât cele ale polimerilor naturali. Comparate cu hidrogelurile polimerilor naturali, hidrogelurile polimerilor sintetici oferă un control mai bun asupra arhitecturii matricei și compoziției chimice, dar în același timp au o mai mică eficacitate biologică.

În scopul realizării de hidrogeluri, se cunosc o compoziție și un procedeu conform căruia se obține un hidrogel care este pe bază de carboximetil celuloză sodică, și care este destinat eliberării controlate de indometacin [Brevet RO 122393].

În scopul realizării de hidrogeluri, se mai cunoaște o compoziție conform căreia hidrogelul este de tip compozit pe bază de collagen, copolimer pe bază de anhidridă maleică/stiren sau acetat de vinil sau acrilonitril sau metil metacrilat sau acid acrilic etc. [Brevet RO 112883]. Această compoziție prezintă dezavantajul că nu este destinată regenerării țesutului adipos.

În scopul obținerii de hidrogeluri, se mai cunoaște un procedeu pe bază de celuloză și xantan [Brevet RO 123143]. Acest procedeu prezintă dezavantajul că este destinat utilizării în domeniul farmaceutic (eliberare controlată de medicamente) și medical, fără a se revendica un domeniu.

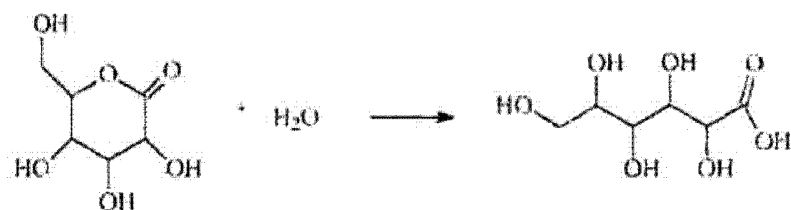
Se mai cunoaște o compoziție conform căreia se obține un material nanostructurat pe bază de nanoparticule magnetice și hidrogel pe bază de chitosan și acid hialuronic [Brevet RO 122017]. Compoziția prezintă dezavantajul că nu se folosește pentru regenerarea țesutului adipos.	1
Se mai cunoaște un hidrogel care se folosește pentru tratarea rănilor, și care se bazează pe o compoziție formată dintr-un alcool polivalent, un polimer natural, ales dintre collagen, gelatină, pectină, un copolimer sintetic și agenți de reticulare de tipul chelaților metalici. Dezavantajul acestui hidrogel este că nu se folosește la regenerarea țesutului adipos.	5
Problema tehnică pe care o rezolvă invenția constă în realizarea unor hidrogeluri pe bază de polimeri naturali, care sunt destinate regenerării țesutului adipos, și a unui procedeu de obținere a acestora.	9
Compoziția de hidrogeluri destinate regenerării țesutului adipos, conform invenției, este constituită din 0,5...2,5% alginat de sodiu provenit din alge brune, cu masa moleculară medie, în ser fiziologic sau apă pură mili - Q, cu conținut de $5 \cdot 10^4 \dots 7 \cdot 10^5$ celule stem derivate din țesut adipos uman/ml și 95 g/1000 ml soluție de gluconat de calciu.	13
Procedeu de obținere a unor hidrogeluri destinate regenerării țesutului adipos este următorul: se prepară o soluție de 0,5...2,5% alginat de sodiu în ser fiziologic sau apă pură mili - Q, în care se introduc celulele stem derivate din țesutul adipos uman, astfel încât să rezulte o concentrație de $5 \cdot 10^4 - 7 \cdot 10^5$ celule/ml, după care în fiecare din godeurile unei plăci biologice se adaugă câte 1 ml soluție de alginat cu celule stem în concentrație prestabilită, după care, pe suprafața soluției de alginat de sodiu din fiecare godeu, se așază câte o rondă de hârtie de filtru de porozitate 1...4 μm , peste care se adaugă 1 ml soluție gluconat de calciu, placa biologică astfel pregătită introducându-se în incubator, în atmosferă umedă și 5% CO_2 , la temperatura de 37°C, timp 3 h, după care se aspiră gluconatul de calciu nereacționat, se spală hidrogelul format cu ser fiziologic, și se acoperă cu mediu de cultură specific tipului de celule încorporate, iar după 21 de zile se estimează capacitatea de proliferare celulară.	15
Aplicarea compoziției de hidrogel obținută prin procedeul conform invenției, pentru regenerarea țesutului adipos, prezintă următoarele avantaje:	17
- hidrogelurile au fost astfel concepute astfel încât timpul de reticulare să nu fie mai mic decât cel necesar înglobării celulelor;	19
- hidrogelurile au proprietăți de utilizare (modulul dinamo-mecanic de stocare, modulul dinamo-mecanic de pierderi, consistență) adecvate utilizării pentru regenerarea țesutului adipos;	21
- dimensiunea ochiurilor care definesc celula elementară a hidrogelurilor este de 100...600 μm și, de aceea, permit creșterea și proliferarea celulară;	23
- hidrogelurile au o consistență care permite manipularea în timpul testelor <i>in vitro</i> , circulația nutrienților la celule, și care asigură celulelor spațiu suficient de proliferare;	25
- hidrogelurile au moduli elastici de la 600 Pa la 8000 kPa, și moduli de pierderi de la 100 Pa la 1000 Pa;	27
- hidrogelurile sunt biocompatibile, lipsite de toxicitate, modelabile pe baza unor proceduri diverse, în multe tipuri de structuri reticulate, ușor accesibile, și au un preț de cost mai scăzut decât hidrogelurile realizate din cei mai mulți polimeri biodegradabili naturali;	29
- hidrogelurile au aspect corespunzător dacă se realizează în condiții de temperatură și agitare prestabilite prin brevet;	31
- hidrogelurile au proprietăți elastice și consistența necesară scoaterii cu ușurință din godeurile plăcilor utilizate pentru testări <i>in vitro</i> ;	33

- hidrogelurile nu sunt citotoxice, au timp de gelifiere de 30 min...72 h, au un conținut de apă de 98%, sunt stabile în timp, în condiții de solicitare dinamică, la temperatura testării *in vitro* de 37°C, circa 21 zile;

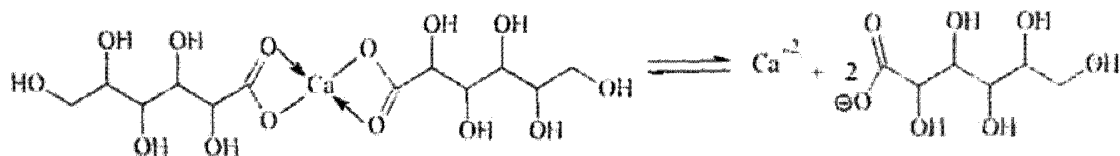
- hidrogelurile au morfologie uniformă și proprietăți foarte bune de transport masă, se pot steriliza prin filtrare și/sau cu radiații UV, și se folosesc cu succes la proliferarea celulelor stem provenite din țesutul adipos.

Gelifierea alginatului se produce în prezența cationilor bivalenți de Ca^{2+} , Mg^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} care interacționează cu grupările carboxil ale unităților de acid glucuronic, formând punți ionice.

Gelurile de alginat folosite pentru încapsulări se realizează în mod obișnuit prin picurarea unei soluții de alginat într-o baie cu soluție de CaCl_2 . Principalul dezavantaj al acestui sistem este viteza foarte mare a reacției de gelifiere, care, din această cauză, devine, practic, imposibil de controlat. Rezultă un gel cu structură neuniformă, rigidă și dificil de modelat. Scăderea vitezei de reacție în limite dorite se poate realiza prin controlul concentrației de ioni de Ca. Ideea de bază este înlocuirea CaCl_2 , total disociată în mediu apos, cu o altă combinație de Ca, care disociază parțial, cum este gluconatul de Ca. Practic, se pornește de la glucono delta lactonă și carbonat de calciu (insolubil în apă); în condițiile de lucru (temperatura camerei, mediu apos), glucono lactona hidrolizează încet la acid gluconic.



Acidul gluconic reacționează cu carbonatul de calciu, formând gluconatul de calciu. Gluconatul de calciu are structura unui complex chelat, parțial disociat la echilibru.



Echilibrul este lent și mult deplasat spre stânga (în forma nedisociată).

Se dau în continuare exemple de realizare a invenției.

Exemplul 1

Într-o placă biologică cu 24 de godeuri se introduce, în fiecare godeu, câte 1 ml soluție 1% alginat de sodiu în apă ultrapură, mili-Q. Alginatul de sodiu este provenit din alge brune și are masa moleculară medie. Pe suprafața soluției de alginat de sodiu din fiecare godeu se așază câte o rondelă de hârtie de filtru bandă albastră, umectată cu soluție de gluconat de calciu 95 g/1000 ml, de uz farmaceutic, de la ZENTIVA. Peste hârtie se adaugă 1 ml soluție gluconat de calciu. Placa biologică se introduce în etuvă la temperatura de 37°C, timp 2 h. Hidrogelul rezultat are proprietăți conforme cu cele prezentate în tabelul 1.

Tabelul 1

Proprietate, UM, metoda de determinare	Valoare
1. Modul de stocare, kPa, măsurători DMA	5800
2. Modul de pierderi, kPa, măsurători DMA	670
3. Dimensiunea medie a ochiurilor, μm , morfologie SEM	100-300
4. Capacitate de gonflare, %	50 %
5. Aspect	Conform fig. 1

Exemplul 2

Se prepară o soluție 1,5% alginat de sodiu în ser fiziologic de uz medical, în care se introduc celule stem derivate din țesutul adipos uman, astfel încât să rezulte o concentrație de $7 \cdot 10^5$ celule/ml. Alginatul de sodiu este provenit din alge brune, și are masa moleculară medie. Într-o placă biologică se introduce, în fiecare dintre cele 24 de godeuri, 1 ml soluție de alginat cu celule stem. Pe suprafața soluției de alginat de sodiu din fiecare godeu se așază câte o rondelă de hârtie de filtru bandă albastră, umectată cu soluție de gluconat de calciu 95 g/1000 ml, de uz farmaceutic, de la ZENTIVA. Peste hârtie se adaugă 1 ml soluție gluconat de calciu. Placa biologică se introduce în incubator cu 5% CO_2 , atmosferă umedă, la temperatura de 37°C , timp 1 h. Se aspiră apoi gluconatul de calciu nereacționat, se spală hidrogelul cu ser fiziologic și se acoperă cu mediu de cultură specific tipului celular utilizat. Hidrogelul rezultat are proprietățile conforme cu cele prezentate în tabelul 2.

Tabelul 2

Proprietate, UM, metoda de determinare	Valoare
1. Modul de stocare, kPa, măsurători DMA	7800
2. Modul de pierderi, kPa, măsurători DMA	540
3. Dimensiunea medie a ochiurilor ⁸ , μm , morfologie SEM	100-500
4. Capacitate de gonflare, %, $[(\text{Masa hidrogel gonflat} - \text{masa hidrogel uscat})/\text{masa hidrogel gonflat}] \cdot 100$	48
5. Aspect	Conform fig. 2
6. Capacitate de proliferare celulară	Conform fig. 4

⁸Conform fig. 3

3 1. Compoziție de hidrogeluri destinate regenerării țesutului adipos, **caracterizată prin**
5 **aceea că** este constituită din 0,5...2,5% alginat de sodiu provenit din alge brune, cu masa
moleculară medie, în ser fiziologic sau apă pură mili - Q, cu conținut de 5×10^4 ... 7×10^5
celule stem derivate din țesut adipos uman/ml și 95 g/1000 ml soluție de gluconat de calciu.

7 2. Procedeu de obținere a unor hidrogeluri destinate regenerării țesutului adipos,
9 **caracterizat prin aceea că** se prepară o soluție de 0,5...2,5% alginat de sodiu în ser
fiziologic sau apă pură mili - Q, în care se introduc celulele stem derivate din țesutul adipos
uman, astfel încât să rezulte o concentrație de 5×10^4 - 7×10^5 celule/ml, după care în fiecare
11 dintre godeurile unei plăci biologice se adaugă câte 1 ml soluție de alginat cu celule stem în
concentrație prestabilită, după care pe suprafața soluției de alginat de sodiu din fiecare
13 godeu se așază câte o rondea de hârtie de filtru de porozitate 1...4 μm , peste care se
adaugă 1 ml soluție gluconat de calciu, placa biologică astfel pregătită introducându-se în
15 incubator, în atmosferă umedă și 5% CO_2 , la temperatura de 37°C, timp 3 h, după care se
aspiră gluconatul de calciu nereacționat, se spală hidrogelul format cu ser fiziologic, și se
17 acoperă cu mediu de cultură specific tipului de celule încorporate, iar după 21 de zile se
estimează capacitatea de proliferare celulară.

(51) Int.Cl.

C08L 101/06 (2006.01),

C08L 5/00 (2006.01),

A61K 9/00 (2006.01),

A61K 31/405 (2006.01)

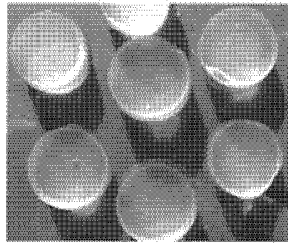


Fig. 1

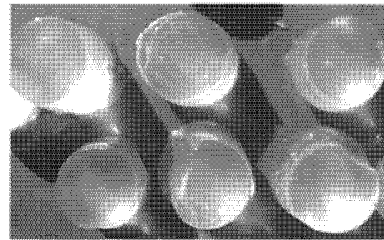


Fig. 2

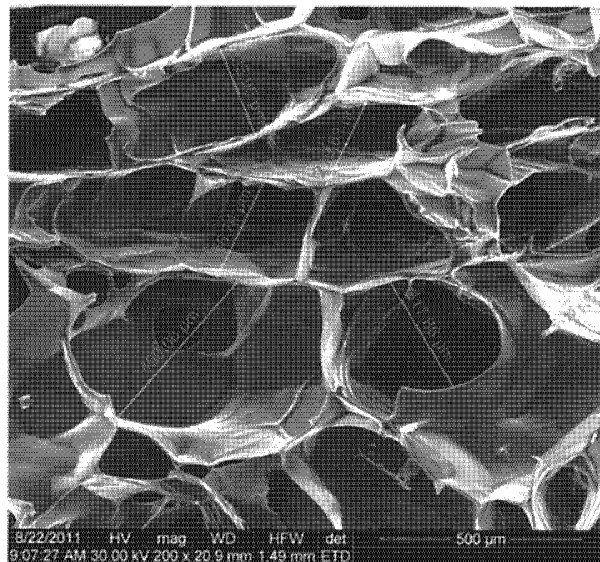


Fig. 3

(51) Int.Cl.

C08L 101/06 (2006.01),

C08L 5/00 (2006.01),

A61K 9/00 (2006.01),

A61K 31/405 (2006.01)

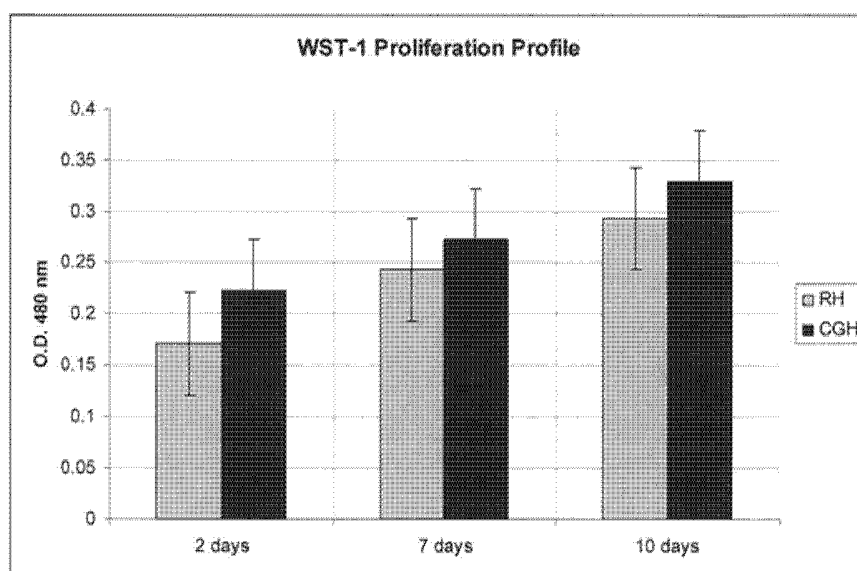


Fig. 4



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM
 Tipărit la: Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci
 sub comanda nr. 158/2016