



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

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

(22) Data de depozit: **29.11.2011**

(41) Data publicării cererii:
30.08.2013 BOPI nr. **8/2013**

(71) Solicitant:
• **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 A DE ARIEȘ NR.2, BL.7, AP.2,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **TRANDAFIR INNA GEORGETA,
STR. 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, DOBROIEȘTI, 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. 35A, SC. C, ET. 4, AP. 59,
PLOIEȘTI, PH, RO;**
• **CIMPEAN ANIȘOARA,
STR. ILEANA COSÂNZEANA NR. 10,
BL. P7, 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,
BUCUREȘTI, B, RO**

(54) **COMPOZIȚIE ȘI PROCEDU PENTRU OBTINEREA UNOR
HIDROGELURI DESTINATE REGENERĂRII ȚESUTULUI
ADIPOS**

(57) Rezumat:

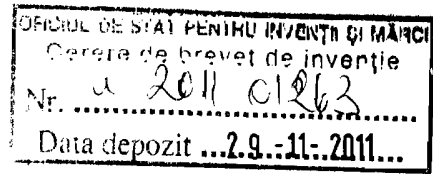
Invenția se referă la o compoziție și la un procedeu de obținere a unor hidrogeluri pe bază de polimeri naturali, destinată regenerării țesutului adipos. Compoziția conform invenției rezultă în urma unei reacții de reticulare ionică a unei soluții 0, 5...2, 5% alginat de sodiu, eventual, în care au fost introduse celule stem, cu soluție de gluconat de sodiu care are o concentrație de 7...11g/l ioni de calciu. Procedeu conform invenției constă în aceea că ionii reticulați vin în contact cu polimerul prin difuzie controlată, ca

urmare a trecerii soluției acestora printr-un mediu cu porozitate controlată, iar reticularea are loc în condiții de incubare la temperatura de 37°C, în atmosferă umedă, cu 5% CO₂, timp de 3..4 h, după care hidrogelul conținând celule rezultat se spală cu ser fiziologic și se acoperă cu mediu de cultură specific tipului celular utilizat.

Revendicări: 4
Figuri: 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).





COMPOZITIE SI PROCEDEU PENTRU OBTINEREA UNOR HIDROGELURI DESTINATE REGENERARII TESUTULUI ADIPOS

DESCRIERE

Inventia se refera la o compozitie si la un procedeu de obtinere a unor hidrogeluri destinate regenerarii tesutului adipos.

Hidrogelurile se pot prepara pe baza de polimeri naturali si / sau sintetici. Hidrogelurile derivate din polimeri naturali au fost frecvent utilizati in medicina reparatorie datorita proprietatilor lor similare cu cele ale ECM natural [1,2]

Hidrogelurile pe baza de compusi macromoleculari (naturali si sintetici) poseda o serie de proprietati care fac posibila utilizarea ca suporturi in ingineria tesuturilor. Proprietatile se refera la: continutul ridicat de apa, similar tesuturilor, capacitatea de a incapsula in mod omogen celule, un eficient transfer de masa si o minima actiune invaziva. Hidrogelurile inalt hidratate pot mima foarte bine proprietatile fizice si chimice ale matricei extracelulare (ECM). Proprietatile fizice ale multor tipuri de hidrogeluri sunt usor de manipulat [1 - 3]. Din motivele enumerate mai sus rezulta ca hidrogelurile reprezinta un mediu ideal pentru suportul, proliferarea si diferentierea [3, 4, 5].

Biomaterialele naturale manifesta o excelenta bioactivitate datorita prezentei in structura lor a componentilor ECM. Cu toate acestea hidrogelurile provenite din polimeri naturali sufera o rapida degradare dupa contactul cu mediul sau cu fluidele corpului. Din aceste motive, o strategie care pare foarte atractiva este incorporarea speciilor bioactive (ex. celule, factori de crestere, peptide sau proteine) intr-un matrial sintetic, rezultand un hidrogel suport biomimetic avand functii bioactive pentru un raspuns celular optim. Polimerii naturali reprezentativi sunt: colagenul, gelatina, chitosanul, acidul hialuronic, agaroza, alginatul, fibrina, poli-L - lizina.

Polimerii sintetici sunt atractivi pentru obtinerea hidrogelurilor destinate ingineriei reparative a tesuturilor, datorita proprietatilor lor fizice si chimice , care in mod specific sunt mult mai controlabile si mai reproductibile decat cele ale polimerilor naturali. Comparate cu hidrogelurile polimerilor naturali, hidrogelurile polimerilor sintetici, ofera un control mai bun asupra arhitecturii matricei si compozitiei chimice, dar in acelasi timp au o mai mica eficacitate biologica.

In scopul realizarii de hidrogeluri **se cunoaste o compozitie si un procedeu** conform caruia se obtine un hidrogel care este pe baza de carboximetil celuloza sodica si care este destinat eliberarii controlate de indometacin [6].

In scopul realizarii de hidrogeluri se mai cunoaste o compozitie conform careia hidrogelul este de tip compozit pe baza de colagen, copolymer pe baza de anhidrida maleica / stiren sau acetat de vinil sau acrilonitril sau metacrilat sau acid acrylic etc [7]. Aceasta compozitie prezinta dezavantajul ca nu este destinat regenerarii tesutului adipos.



In scopul obtinerii de hidrogeluri se mai cunoaste un procedeu pe baza de celuloza si xantan [8]. Acest procedeu prezinta dezavantajul ca este destinat utilizarii in domeniul farmaceutic (eliberare controlata de medicamente) si medical fara a se revendica un domeniu.

Se mai cunoaste o compozitie conform careia se obtine un material nanostructurat pe baza de nanoparticule magnetice si hidrogel pe baza de chitosan si acid hialuronic [9]. Compozitia prezinta dezavantajul ca nu se foloseste pentru regenerarea tesutului adipos.

Se mai cunoaste un hidrogel care se foloseste pentru tratarea ranilor si care se bazeaza pe o compozitie formata dintr-un alcool polyvalent, un polimer natural ales dintre collagen, gelatin, pectin, un copolymer sintetic si agenti de reticulare de tipul chelatilor metalici [10]. Dezavantajul acetui hidrogel este ca nu se foloseste la regenerarea tesutului adipos.

Problema tehnica pe care o rezolva inventia consta in realizarea unor hidrogeluri pe baza de polimeri naturali care sunt destinate regenerarii tesutului adipos.

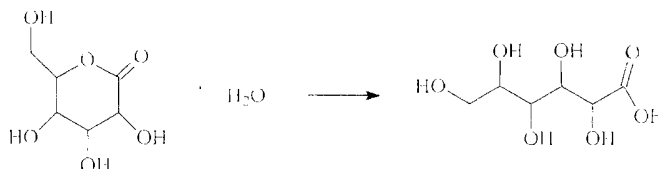
Hidrogelurile realizabile conform inventie inlatura dezavantajele procedeeilor cunoscute prin aceea ca se obtin prin reticularea unei solutii de (0.5 – 3) % alginate de sodium in apa cu un exces de gluconat de sodium iar reticulantul vine in contact cu polimerul din solutie prin difuzie.

Compozitie si procedeu pentru realizarea unor hidrogeluri destinate regenerarii tesutului adipos **prezinta urmatoarele avantaje:**

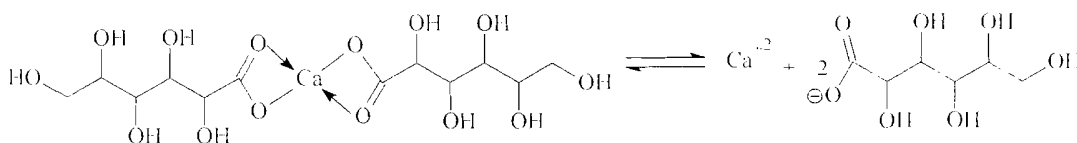
- Hidrogelurile au fost astfel concepute incat timpul de reticulare sa nu fie mai mic decat cel necesar inglobarii celulelor ;
 - Hidrogelurile au proprietati de utilizare (modulul dinamo – mecanic de stocare, modulul dinamo – mecanic de pierderi, consistenta,) adecvate utilizarii pentru regenerarea tesutului adipos;
 - Dimensiunea ochiurilor care definesc celula elementara a hidrogelurilor este de 100 – 600 μm si de aceea permit cresterea si proliferarea celulara;
 - Hidrogelurile au consistenta care permite manipulare in timpul testelor in vitro, circulatia nutrientilor la celule, si care asigura celulelor spatiu suficient de proliferare;
 - Hidrogelurile au moduli elastici de la 600 Pa la 8000 kPa si moduli de pierderi de la 100 Pa la 1000 Pa.
 - Hidrogelurile sunt biocompatibile, lipsite de toxicitate, modelabile pe baza unor proceduri diverse, in multe tipuri de structuri reticulate, usor accesibile, si au un pret de cost mai scazut decat hidrogelurile realizate din cei mai multi polimeri biodegradabili naturali;
 - Hidrogelurile au aspect corespunzator daca se realizeaza in conditii de temperatura si agitare prestabilite prin brevet;
 - Hidrogelurile au proprietati elastice si consistenta necesara scoaterii cu usurinta din godeurile placilor utilizate pentru testari in vitro;
 - Hidrogelurile nu sunt citotoxice, au timp de gelifiere de 30 min. – 72 ore, au un continutul de apa de 98 %, sunt stabile in timp, in conditii de solicitare dinamica, la temperatura testarii in vitro de 37 °C cca. 21 zile;
 - Hidrogelurile au morfologie uniforma si proprietati foarte bune de transport masa si se pot steriliza prin filtrare si /sau, cu radiatii UV si se folosesc cu succes la proliferarea celulelor stem provenite din tesutul adipos;
- Gelifierea hidrogelului se produce in prezenta cationilor bivalenti de Ca^{2+} , Mg^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} care interactioneaza cu grupurile carboxyl ale unitatilor de acid glucuronic formand puncti ionice.



Gelurile de alginat folosite pentru incapsulari 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 viteză foarte mare a reacției de gelificare care din aceasta cauza 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 baza este înlocuirea CaCl_2 , total disociată în mediu apos, cu o altă combinație de Ca care disociază parțial (gluconatul de Ca). Practic se pornește de la glucono delta lactona 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.



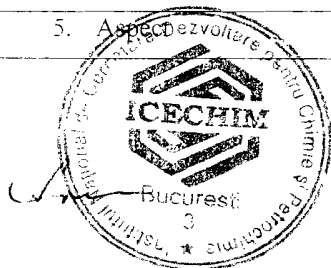
Echilibrul este lent și mult deplasat spre stânga (forma nedisociată).

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 mili-Q. Alginatul de sodiu este provenit din alge brune și are masă 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 95g / 1000 ml uz farmaceutic ZENTIVA. Peste hârtie se adaugă 1 ml soluție gluconat de calciu. Placa biologică se introduce în etuva la temperatura de 37 °C timp 2 ore. Hidrogelul rezultat are proprietăți conforme cu tabelul 1.

Tabelul 1

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



Exemplul 2

Se prepara solutie 1. 5% alginat de sodiu in ser fiziologic de uz medical in care se introduc celule stem derivate din tesutul adipos uman astfel incat sa rezulte o concentratie de $7 * 10^5$ celule / ml. Alginatul de sodiu este provenit din alge brune si are masa moleculara medie. Intr-o placa biologica se introduce in fiecare din cele 24 de godeuri, 1 ml. solutie de alginat cu celule stem. Pe suprafata solutiei de alginat de sodiu din fiecare godeu se aseaza cate o rondela de hartie de filtru banda albastra, umectata cu solutie de gluconat de calciu 95g / 1000 ml uz farmaceutic ZENTIVA. Peste hartie se adauga 1 ml solutie gluconat de calciu. Placa biologica se introduce in incubator cu 5 % CO₂, atmosfera umeda. la temperatura de 37 °C. timp 1 ore. Se aspira apoi gluconatul de calciu nereactionat. se spala hidrogelul cu ser fiziologic si se acopera cu mediu de cultura specific tipului celular utilizat. Hidrogelul rezultat are proprietati conforme cu tabelul 2

Tabelul 2

Proprietate, Um Metoda de determinare	Valoare
1. Modul de stocare, kPa, masuratori DMA	7800
2. Modul de pierderi, kPa, masuratori DMA	540
3. Dimensiunea medie a ochiurilor ⁸ , μm, morfologie SEM	100 - 500
4. Capacitate de gonflare, %. [(Masa hidr.gonflat - masa hidrogelului uscat) : masa hidrogonflat] * 100	48
5. Aspect	Cfm. Fig.2
6. Capacitate de proliferare celulara.	Cfm.fig.4

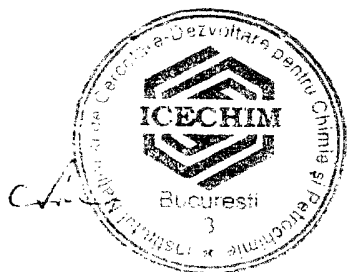
⁸ Cfm.fig.3



COMPOZITIE SI PROCEDEU PENTRU OBTINEREA UNOR HIDROGELURI DESTINATE REGENERARII TESUTULUI ADIPOS

REVEDICARI

1. Compozitie si procedeu pentru obtinerea unor hidrogeluri destinate regenerarii tesutului adipos caracterizata prin aceea ca se prepara solutie de (0,5 – 2, 5)% alginat de sodiu in ser fiziologic sau apa mili – Q, in care se introduc celule stem derivate din tesutul adipos uman astfel incat sa rezulte o concentratie de $5 * 10^4 - 7 * 10^5$ celule / ml. Se introduce in fiecare din godeurile unei placi biologice cate 1 ml. solutie de alginat cu celule stem in concentratia dorita. Pe suprafata solutiei de alginat de sodiu din fiecare godeu se aseaza cate o rondela de hartie de filtru. Peste hartie se adauga 1 ml solutie gluconat de calciu. Placa biologica se introduce in incubator cu 5 % CO₂, atmosfera umeda, la temperatura de 37 °C, timp 1 ore dupa care se aspira gluconatul de calciu nereactionat, se spala hidrogelul cu ser fiziologic si se acopera cu mediu de cultura specific tipului celular utilizat. Dupa 21 de zile se estimeaza capacitatea de proliferare celulara.
2. Compozitie conform revendicarii 1 caracterizat prin aceea ca alginatul de sodiu este provenit din alge brune si are masa moleculara medie:
3. Compozitie conform revendicarii 1 caracterizata prin aceea ca hartia de filtru este tip banda albastra:
4. Compozitie conform revendicarii 1 caracterizata prin aceea ca solutie de gluconat de calciu 95g 1000 ml.



COMPOZITIE SI PROCEDEU PENTRU OBTINEREA UNOR HIDROGELURI DESTINATE REGENERARII TESUTULUI ADIPOS

FIGURI

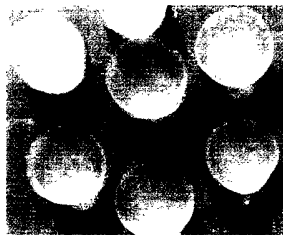


Fig.nr.1

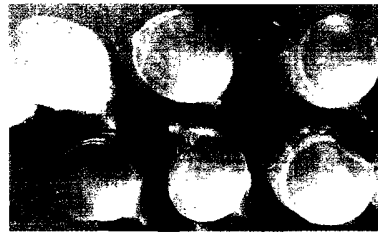


Fig.nr.2

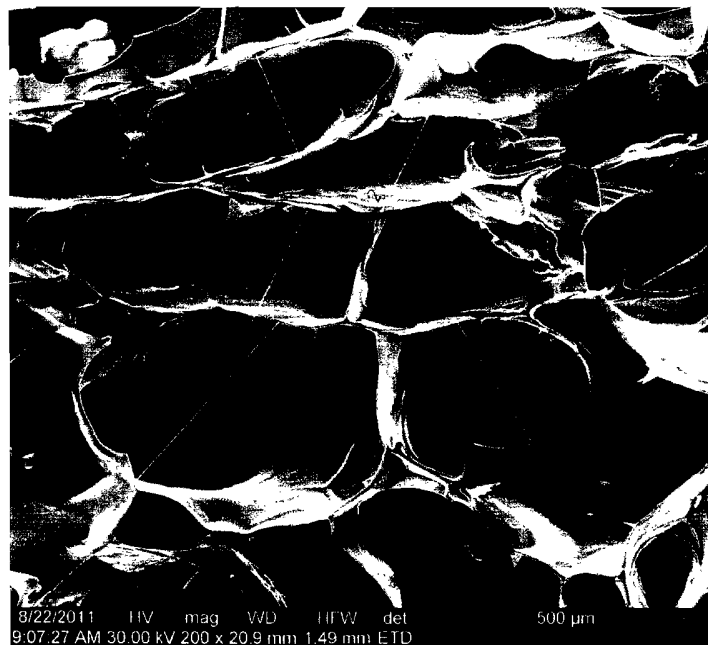
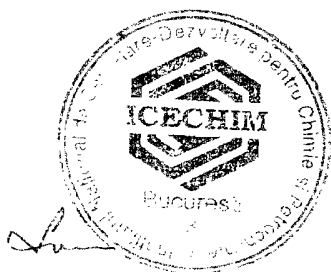


Fig.3



2

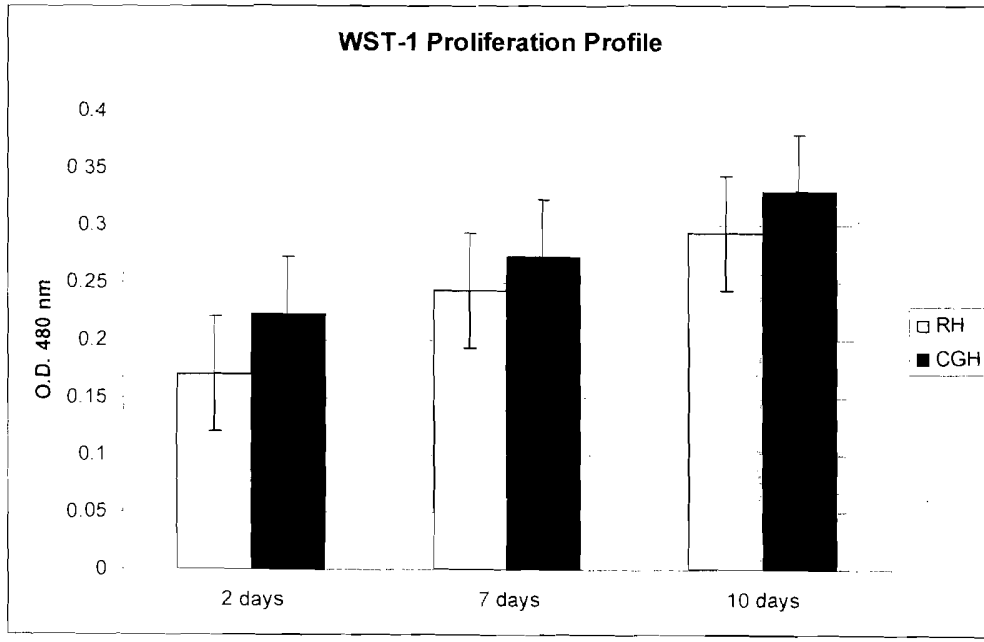


Fig.4

