



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2022 00027**

(22) Data de depozit: **26/01/2022**

(41) Data publicării cererii:
28/07/2023 BOPI nr. 7/2023

(71) Solicitant:
• UNIVERSITATEA POLITEHNICA DIN
BUCUREȘTI, SPLAIUL INDEPENDENȚEI
NR.313, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:
• FICAI DENISA, STR. RAHOVEI NR. 30-32,
SC. 2, ET. 1, AP. 11, BRAGADIRU, IF, RO;
• ILIEV ANDREEA, STR. GHIRLANDEI
NR.56, BL.75, AP.8, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;
• FICAI ANTON, STR. RAHOVEI NR. 30-32,
SC. 2, ET. 1, AP. 11, BRAGADIRU, IF, RO;
• TRUSCA VIOLETA GEORGETA,
STR.GH.DUCA NR. 3-11, BL.B, SC.B, ET.4,
AP.41, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;

• GAFENCU ANCA VIOLETA,
STR.ANTON PANN NR.48A, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO;
• BUCATĂRIU SANDA-MARIA,
STR.MIRCEA ELIADE NR.11, SC.B, AP.9,
BACĂU, BC, RO;
• FUNDUEANU CONSTANTIN GHEORGHE,
ALEEA TUDOR NECULAI NR.57, BL.975,
SC.A, ET.3, AP.15, IAȘI, IS, RO;
• SIMIONESCU MAYA,
STR. LOUIS PASTEUR NR. 16, SECTOR 5,
BUCUREȘTI, B, RO;
• ANDRONESCU ECATERINA,
CALEA PLEVNEI NR. 141B, BL. 4, ET. 1,
AP. 1, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO

(54) VEZICULE ȘI TUBURI POLIMERICE ȘI TEHNOLOGIE DE OBTINERE A ACESTORA

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere microveziculelor și a tuburilor pe bază de alginat, chitosan, collagen, sau alte substanțe polimerice, încărcate sau nu cu substanțe biologic active în interior sau în perețele acestora, destinate aplicațiilor medicale. Procedeu de obținere conform invenției are următoarele etape:

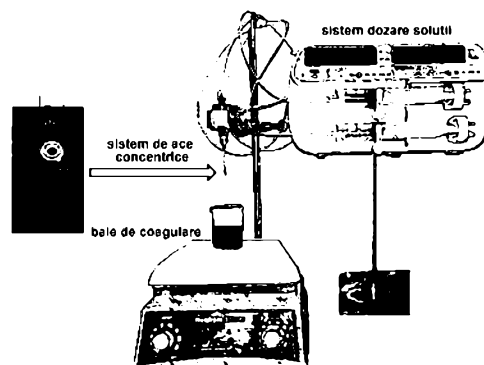
a) prepararea soluției polimerice prin obținerea soluțiilor de alginat sau de alți polimeri de concentrație 3...5% prin dizolvarea acestora în apă distilată sub agitare magnetică timp de 24...48 ore,

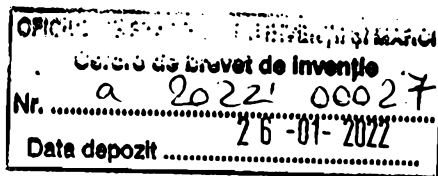
b) prepararea agentului de reticulare care este o soluție apoasă de CaCl_2 pentru alginat și glutaraldehidă pentru chitosan, în concentrații cuprinse între 0,5...10%,

c) trecerea soluției polimerice printr-un sistem de ace coaxiale concentrice cu raportul dintre diametre de 13/16, 11/15, 17/21, 15/20, sau alte dimensiuni, pentru obținerea de tuburi sau vezicule cu diametre și de grosimi dorite, prin acul exterior fiind trecută o soluție de alginat de sodiu, chitosan sau collagen iar prin acul interior este trecută o soluție de CaCl_2 , soluțiile având concentrații cuprinse între 1...10%, în procesul de obținere viteza de curgere a celor două soluții putând varia astfel: pentru CaCl_2 $v = 40...150$ ml/h iar pentru alginat $v = 35...100$ ml/h, iar distanța dintre vârful acului și nivelul soluției de CaCl_2 în care au fost colectate tuburile/veziculele de alginat variază între 8...1.5 cm, iar după obținerea structurilor li se aplică un câmp electric care duce la scăderea considerabilă a diametrului acestor structuri și

d) consolidarea prin reticulare a tuburilor și veziculelor polimerice prin dozarea agentului de reticulare prin acul interior urmat de trecerea acestora printr-o baie de reticulare.

Revendicări: 3
Figuri: 1





Domeniul tehnic în care poate fi folosită invenția:

Invenția se referă la realizarea de sisteme de tip vezicule (capsule goale) sau tuburi destinate, spre exemplu, aplicațiilor medicale, de mediu, etc. În cazul aplicațiilor medicale, veziculele se pot utiliza în regenerare tisulară asigurând eliberarea controlată a diverselor clase de substanțe biologice active (la vitamine, ioni, substanțe medicamentoase la celule viabile și produșii lor de secreție normale). Capsulele astfel dezvoltate se pot de asemenea exploata pentru administrarea orală de substanțe biologice active care în acest mod să fie ferite de acțiunea nefastă a sucului gastric. Capsulele obținute pot să asigure eliberarea controlată de substanțe antimicrobiene atât pentru aplicații domestice (spre exemplu, menținerea calității apelor din bazine, piscine, etc.), medicale, de mediu, etc. În cazul tuburilor, dintre cele mai de interes aplicații se referă la aplicațiile cardiovasculare, inclusiv dezvoltarea de vase de sânge artificiale clasice sau încărcate cu substanțe biologice active (vitamine, ioni, substanțe medicamentoase) sau cu celule specializate viabile). De asemenea, există un interes deosebit în încărcarea cu bacterii benefice (pentru repopularea florei bacteriene distruse ca urmare a administrării prelungite de antibiotice), ovule sau spermatozoizi (pentru protecția și păstrarea lor și eliberarea controlată în locul de interes, unele din polimerii menționați având o remarcabilă aderență pe membranele biologice).

Descrierea studiului actual

Producerea de sisteme care să asigure un beneficiu țintit asupra unui organ, țesut, mucoase, specii, mediu etc. și care să își poată îndeplini scopul pe termen mai lung decât un panaceu universal prezintă un interes real pentru societatea actuală. În acest context s-au studiat diverse amestecuri de geluri (cel mai utilizat fiind alginatul de sodiu) cu substanțe de interes (mai des folosite în amestecuri sunt diverse specii de drojdii). Tehnicile folosite pentru obținerea capsulelor de alginat constă în pulverizarea alginatului peste soluția de clorură de calciu, sau cea a picurării amestecului în soluție de clorură de calciu și implicit reticularea ionotropă a sistemului pe bază de alginat (Yuxing, 2013, Park Heui Dong, 2017a, Park Heui Dong, 2017b, Park Heui Dong, 2017c). În amestecul de alginat se poate include practic orice tip de substanță biologică activă de interes.

Micro-încapsularea este exploatată în terapia medicală deoarece permite eliberarea țintită a unor compuși de secreție, inclusiv proteine. Capsulele care găzduiesc aceste celule se pot clasifica în 3 categorii așa cum reiese din Tabelul 1. Dintre acestea, categoria 1 este cea mai bine reprezentată și implică predominant hidrogeluri pe bază de alginat. Îmbunătățirile majore efectuate au presupus purificarea avansată a polimerilor; optimizarea compoziției și a tehnicii de generare a micro-capsulelor, sau dezvoltarea de acoperiri ale acestor micro-capsule. Dezvoltarea de sisteme veziculare (sisteme ce conțin în interior lichide adecvate, propice pentru ~~celule~~) a permis o mai bună producție de proteine și o creștere a ratei de supraviețuire a celulelor (categoria a doua) însă odată cu avansul tehnic au fost propuse și tehnici de încapsulare a celulelor (categoria a treia).

Tabelul 1. Variante de micro-capsule

Categorie	Miez (core)	Înveliș (shell)
1	Matrice *	Film
2	Lichid *	Film
3	Celula	Film

* pot conține celule sau alte substanțe biologice active

În cererea de brevet WO 2016/087636 (RENAUD et al., 2016) se revendică dreptul de proprietate asupra tehnologiei de obținere precum și a unor sisteme/microcapsule pe bază de alginat și chitosan de dimensiuni de 100 – 900 μm care pot fi încărcate cu medicamente analgezice non-steroidiene de tipul diclofenac, ibuprofen, piroxicam, anestezice precum lidocaina, bupivacaina; analgezice opioide precum codeina, morfina; corticosteroizi precum dexametazona și prednisona, agenți antitumorali precum metotrexat, agenți antivirali precum aciclovir, vidarabina, anticorpi monoclonali precum humira sau infliximab. De asemenea, pentru administrare intra-articulară microparticulele pot fi încărcate adecvat cu celule, proteine, ADN sau ARN, minerale adecvate seleniu, stronțiu), vitamine sau alți agenți naturali precum curcumina (RENAUD et al., 2016).

Formarea microcapsulelor de alginat este optimizată în TW20100106581 20100308 (GWO-BIN et al.). Astfel, inventatorii propun utilizarea unor ace conectate la un sistem vibrant care să asigure desprinderea picăturilor iar gelifierea este asigurată de trecerea picăturilor de gel prin intermediul unui strat de ulei (pentru a se obține particule sferice perfecte) într-o soluție de CaCl_2 .

În CN201410747327 20141209 (XIAOJUN et al.) se prezintă metoda de preparare secvențială a hidrogelurilor pe bază de alginat de calciu încărcate cu celule și factori, proteine și matrice extracelulară provenite de la alte celule.

Microsferele de alginat pot fi utilizate în scopul adsorbției de substanțe active din reziduuri alimentare precum reziduurile de coacăze permițând astfel valorificarea compușilor activi din aceste reziduuri. Bittencourt si colab. (Bittencourt et al., 2018) prin gelifiere ionotropă au încapsulat derivați naturali (compuși fenolici cu capacitate antioxidantă) proveniți din resturile din industria de prelucrare a coacăzului. În acest caz, încărcarea compușilor fenolici se face prin adsorbție din soluție (gradul de reținere fiind de 67.01%). Mai mult, odată încapsulați, acești compuși activi se pot elibera în timp, gradul de recuperare *in vitro* la 2h fiind de 68.2% iar mecanismul de eliberare este de tip Baker & Lonsdale.

De asemenea, microcapsulele de alginat pot fi utilizate în scopul eliberării prelungite de fertilizanți și pesticide (Joshi and Auad, 2017). În WO 2017/042833 A1 (RANKA) sunt prezentate câteva formulări de biofertilizanți cu dimensiuni de 0.01 – 100 μm ce conține cel puțin bacterii sau fungi într-o masă polimerică.

Problema tehnică

Metodele de obținere a microsferelor de alginat utilizate frecvent sunt cele care folosesc amestecuri omogene între alginatul de sodiu cu substanțe biologice active (vitamine, minerale, substanțe medicamentoase, celule sau suspensii de celule, bacterii, fungi, etc.). În multe astfel de cazuri, înglobarea celulelor, bacteriilor, microorganismelor vii are unele dezavantaje (pierderea viabilității celulare ca urmare a constrângerilor induse de încapsularea în matricea polimerică) motiv pentru care dezvoltarea de vezicule în care microorganismele vii sunt găzduite în interiorul unei cavități ce favorizează viața acestora (conțin inclusiv nutrienți dizolvați) reprezintă o soluție viabilă care suplimentar, poate permite eliminarea microorganismelor atunci când nu mai este nevoie de prezența lor. În cazul multor aplicații cardiovasculare, există nevoie de dispozitive tubulare protetice care să poată substitui porțiuni de vase sanguine. În ambele cazuri, problemele tehnice țin de optimizarea parametrilor de procesare, compoziția membranei polimerice și a fluidului din interior dar și a soluției de gelifiere.

Soluția tehnică

Soluția tehnică propusă pentru obținerea de micro-vezicule (încărcate sau nu cu substanțe biologice active în interior sau în perete) precum și a tuburilor realizate din materiale polimerice (în special alginat, chitosan, collagen, etc.) implică utilizarea unor sisteme de ace coaxiale de diametre adaptate nevoilor și dozarea adecvată a fluidelor în scopul asigurării parametrilor de procesare vizați.

În vederea obținerii de tuburi se recurge la un sistem de ace coaxiale prin care trec două fluide distincte. În cazul în care se lucrează cu alginat de sodiu prin acul interior se va alimenta o soluție ce

conține sare de Ca, Mg, Zn, Cu, etc. de concentrație adecvată care să permită reticularea gelului de alginat dinspre interiorul tubului. În cazul în care se dorește obținerea de microvezicule, se lucrează cu aceleași tipuri de fluide însă trebuie optimizate debitele de alimentare ale fluidelor, eventual se recomandă adăugarea fluidului din acul interior (sare de Ca, Mg, etc.) sacadat, generând astfel echivalentul de goluri. În cazul microveziculelor, un interes deosebit revine și încărcării de substanțe biologice active în interiorul acestora, minerale, vitamine, substanțe medicamentoase, microorganisme, celule, etc.). Atât tuburile cât și microveziculele procesate prin sistemul de ace coaxiale sunt culese într-o soluție de sare de Ca, Mg, Zn, Cu, etc. de concentrație similară sau diferită de concentrația anterioară.

În condiții similare, tehnologia propusă se poate adapta pentru obținerea de tuburi sau microvezicule pornind de la alte materiale polimerice (colagen, chitosan, PLA, ...) sau compozite aferente acestora. În aceste cazuri însă, evident se va utiliza un agent de reticulare adecvat (aldehide, taninuri, etc.).

Avantajele invenției în raport cu studiul tehnicii

- Aplicarea invenției prezintă următoarele avantaje:
- ✓ Permite obținerea facilă de microvezicule sau tuburi cu caracteristici predefinite;
 - ✓ Caracteristicile tuburilor și a microveziculelor se controlează în funcție de diametrele acelor coaxiale, de viteza de curgere a materiilor prime utilizate, intensitatea câmpului magnetic aplicat, etc
 - ✓ În interiorul veziculelor se pot încărca substanțe biologice active variate, de la minerale, vitamine la substanțe medicamentoase sau chiar microorganisme sau celule;
 - ✓ Substanța de interes sau produșii sintetizați de microorganisme/celule se eliberează controlat, viteza de eliberare putând fi controlată prin dimensiunea porilor sau grosimea peretelui microveziculelor;
 - ✓ Substanța de interes încapsulată în microvezicule este astfel protejată și ulterior eliberată la nivelul zonei de interes;
 - ✓ Tuburile obținute pot fi exploatate ca dispozitive tubulare protetice (vase de sânge, catetere dar și ca sisteme implantabile) prin care să se administreze substanțe de interes, în acest caz încărcarea fiind realizată la nivelul peretelui tubului.

Descrierea detaliată a invenției

Ca principiu metoda este utilizată pentru obținerea de vezicule și tuburi cu diametre variabile în funcție de sistemul de ace co-axiale utilizate. Pentru crearea “golului” central, sferic (în cazul veziculelor) și cilindric (în cazul tuburilor), prin acul interior se injectează cu un debit prestabilit o soluție (agent de reticulare) care să ducă la consolidarea structurii polimerice/compozite dorite, conform Tabelului 1 în timp ce prin acul exterior se va injecta soluția de polimer sau material compozit.

Tabelul 1. Agenți de reticulare uzuali pentru câțiva polimeri de interes

Nr. crt.	Polimer (Fluid 2)	Agent de reticulare (Fluid 1)
1	Alginat	Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ba^{2+} , Sr^{2+} , etc.
2	Colagen	Aldehide, taninuri, etc.
3	Chitosan	Glutaraldehida, vanilină, genipin, tampon de pH, etc
4	Dextran	Epiclorohidrină,

În cazul veziculelor, alimentarea fluidului din interior se face continuu sau secvențial astfel încât se induce formarea bulelor în interiorul structurii polimerice. În acest caz, în anumite condiții, fluidul poate conține și celule sau microorganisme viabile care pot să trăiască încapsulați și să secrete produși de excreție activi care se eliberează controlat prin peretele veziculelor sau sunt eliberați din vezicule după ce părăsesc, spre exemplu, stomacul unde aceste microorganisme/celule ar fi distruse de pH-ul inadecvat sau de amestecul de enzime digestive. În cazul în care se dorește încapsularea acestor microorganisme/celule, fluidul trebuie să conțină și surse de nutrienți și, evident, concentrația de agenți de reticulare nu trebuie să atingă doza toxică.

Indiferent dacă se dorește obținerea de tuburi sau vezicule, acestea sunt culese într-o baie de coagulare/reticulare care induce consolidarea structurală a gelului. De asemenea, fluidul interior conține același agent de reticulare/consolidare, de concentrație similară sau diferită.

În funcție de concentrația gelului de polimer se poate controla porozitatea peretelui și implicit rata de transfer a substanțelor active prin membrană, în timp ce, diametrul golurilor (sferice sau cilindrice) se ajustează prin utilizarea unui raport adecvat al diametrelor celor două ace și debitul de alimentare și vâscozitatea polimerului utilizat.

Exemplul 1

Tuburi polimerice pe bază de alginat (sau alți polimeri sau compozite pe baza acestor polimeri) se face utilizând sistemul de ace coaxiale prezentat în Figura 1 având rapoartele dintre diametre adecvat (spre exemplu, perechile de ace pot fi 13/16, 11/15, 17/21, 15/20, 11/15/20, etc.) ajustate pentru obținerea de tuburi cu pereți de grosimea dorită. În cazul tuburilor de alginat, modul de lucru presupune trecerea unei soluție de CaCl_2 (de concentrații variabile, de regulă 1-10%) prin acul interior în timp ce prin acul exterior se trece o soluție de alginat de sodiu (de concentrații variabile 1 – 10%). Tuburile astfel obținute sunt colectate într-o soluție de CaCl_2 10%. În procesul de obținere au fost variate viteza de curgere a celor 2 fluide/soluții (CaCl_2 40-150 ml/h și alginat 35 - 100 ml/h) dar și distanța dintre vârful acului și nivelul soluției de CaCl_2 (8-1.5 cm) în care au fost colectate tuburile de alginat. Alegerea acestor condiții de procesare se face ținând seama de vâscozitatea soluției polimerice dar și de caracteristicile agentului de reticulare utilizat (atât la nivelul soluției din baia de coagulare cât și prin acul interior).

Exemplul 2

Condițiile de dozare a celor două soluții se pot adapta în scopul obținerii de vezicule / capsule. În aceste cazuri se face alimentarea secvențială a soluției de CaCl_2 prin acul intern și, eventual, se utilizează un sistem vibrant care să asigure desprinderea picăturilor veziculare. Diametrul acelor și debitele de alimentare a celor două soluții se ajustează ținând seama de vâscozitatea polimerului și de concentrația agentului de reticulare (atât din baia cât și a soluției ce se alimentează prin acul interior).

Exemplul 3

În ambele cazuri sus menționate, în soluția polimerică se pot îngloba substanțe biologice active de tipul mineralelor, vitaminelor, substanțelor medicamentoase dar și microorganisme sau chiar celule viabile. În funcție de caracteristicile peretelui veziculelor sau tuburilor (natura polimerului, grosimea sau porozitatea) acestea se eliberează în timp (în cazul microorganismelor/celulelor există interesul ca doar produșii lor de secreție să se elibereze) inducând anumite proprietăți.

Astfel de sisteme se pot folosi pentru a introduce în capsulă diverse substanțe de tipul vitamine, aminoacizi, minerale, antibiotice sau alte clase de medicamente, celule sau suspensii de celule, bacterii etc. care au ca scop eliberarea lor în diferite zone de interes. Eliberarea acestora se realizează treptat prin intermediul porilor de la nivelul învelișului extern reprezentat de alginat. În acest caz se pot crea și canale de pori prin utilizarea unor porogeni adecvați care se vor adăuga în soluția polimerică și care, odată dizolvate vor permite o eliberare mai rapidă.

În cazul veziculelor, încapsularea de substanțe biologice active (vitamine, minerale, antibiotice sau alte clase de medicamente, celule sau suspensii de celule, bacterii etc.) se poate realiza în soluția apoasă delimitată de membrana polimerică. În acest caz, membrana polimerică acționează ca o barieră și controlează eliberarea substanțelor active sau a compușilor de secreție. În cazul în care se încapsulează microorganisme sau celule, soluția de coagulare trebuie să aibă o concentrație suficient de scăzută să nu altereze viabilitatea microorganismelor sau a celulelor și de asemenea trebuie să asigure nutrienții necesari (caracteristici). Este de remarcat că în acest caz există premisele pentru o viabilitate mai mare datorită faptului că microorganismele sau celulele se vor putea atașa pe suprafața internă a veziculelor fără a fi constrânse de matricea polimerică ca în cazul încapsulării în perete.

Exemplul 4

În cazul Exemplelor sus menționate, baia de consolidare/reticulare se poate adapta prin adăugarea unui strat de ulei, de grosime variabilă, care permite echilibrarea picăturii/jetului de polimer, în acest fel asigurându-se timpul necesar pentru revenirea la forma cilindrică / sferică a picăturilor polimerice.

Exemplul 5

În toate cazurile sus menționate există posibilitatea ca formarea tuburilor/veziculelor să se realizeze în câmp electric. În acest caz se poate utiliza sistemul de electrofilare care asigura câmpul electric adecvat și dozarea prin sistemul de ace coaxiale. Aplicarea câmpului electric poate duce la scăderea diametrului și astfel obținerea de micro/nanotuburi și respectiv micro/nanovezicule.

Bibliografie

- BITTENCOURT, L. L. D., SILVA, K. A., DE SOUSA, V. P., FONTES-SANT'ANA, G. C. & ROCHA-LEAO, M. H. 2018. Blueberry Residue Encapsulation by Ionotropic Gelation. *Plant Foods for Human Nutrition*, 73, 278-286.
- GWO-BIN, L., SONG-BIN, H. & MIN-HSIEN, W. *Aliginate microbeads, method for forming the same and associated applications*. TW20100106581 20100308.
- JOSHI, P. & AUAD, M. 2017. Synthesis of encapsulated bio-pesticides/fertilizers based on superabsorbent crosslinked alginate microbeads. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society*, 253.
- PARK HEUI DONG, K. D. H., LEE SAE BYUK. 2017a. *Development of Hansenispora uvarum starter by using Ca-alginate bead after air-blast drying*
- PARK HEUI DONG, K. D. H., LEE SAE BYUK. 2017b. *Development of Issatchenkia orientalis starter by using Ca-alginate bead after air-blast drying*.
- PARK HEUI DONG, K. D. H., LEE SAE BYUK. 2017c. *Development of Saccharomyces cerevisiae starter by using Ca-alginate bead after air-blast drying*
- RANKA, A. *BIO-FERTILIZER COMPOSITION*. PCT/IN20 16/050299.
- RENAUD, L., PIERRE, D. & MICKAËL, C. 2016. *HYDROGEL MICROBEAD*. WO2015EP78644 20151204.
- XIAOJUN, M., YANG, L., GUANGWEI, S., HANSI, L., DONGSHENG, S., SHUJUN, W., NAN, Z. & JING, X. *Preparation method of acellular sodium alginate bionic hydrogel*.
- YUXING, G. 2013. *Method for preparation of angiotensin-converting enzyme inhibitory peptide by packed bed reactor*

Revendicări

1. Prin prezenta aplicație de brevet „Vezicule și tuburi polimerice și tehnologie de obținere a acestora” se revendică dreptul de proprietate intelectuală asupra tehnologiei de obținere a microveziculelor și tuburilor pe bază de alginat, chitosan, colagen, etc. caracterizate prin aceea că se obțin utilizând sistemul de ace coaxiale de diametre adecvate aplicației vizate (Fig 1), debitul de alimentare a polimerului (amestecului de polimeri) sau a gelurilor compozite, vâscozitatea acestora, concentrația acestora, diametrul celor două ace, etc. fiind adecvat optimizate în scopul generării de tuburi sau microvezicule.
2. Tehnologia de obținere se caracterizează prin aceea că structurile dezvoltate se consolidează prin reticulare cu agenți adecvați, agentul de reticulare fiind dozat prin acul interior iar structurile dezvoltate prin sistemul de ace coaxiale sunt trecute într-o baie de reticulare similară sau diferită de soluția alimentată prin acul interior. Aplicarea unui câmp electric duce la scăderea considerabilă a diametrului acestor structuri.
3. Dreptul de proprietate intelectuală asupra tuburilor și veziculelor obținute prin tehnologia menționată caracterizate prin aceea că se obțin din geluri polimerice sau compozite (pe bază de alginat, chitosan, colagen, etc.) care înglobează celule, microorganisme, nutrienți, substanțe medicamentoase, etc. atât încapsulați în peretele polimeric/compozit cât sau în cavitatea/golul din interiorul veziculei.

Desene / Figuri

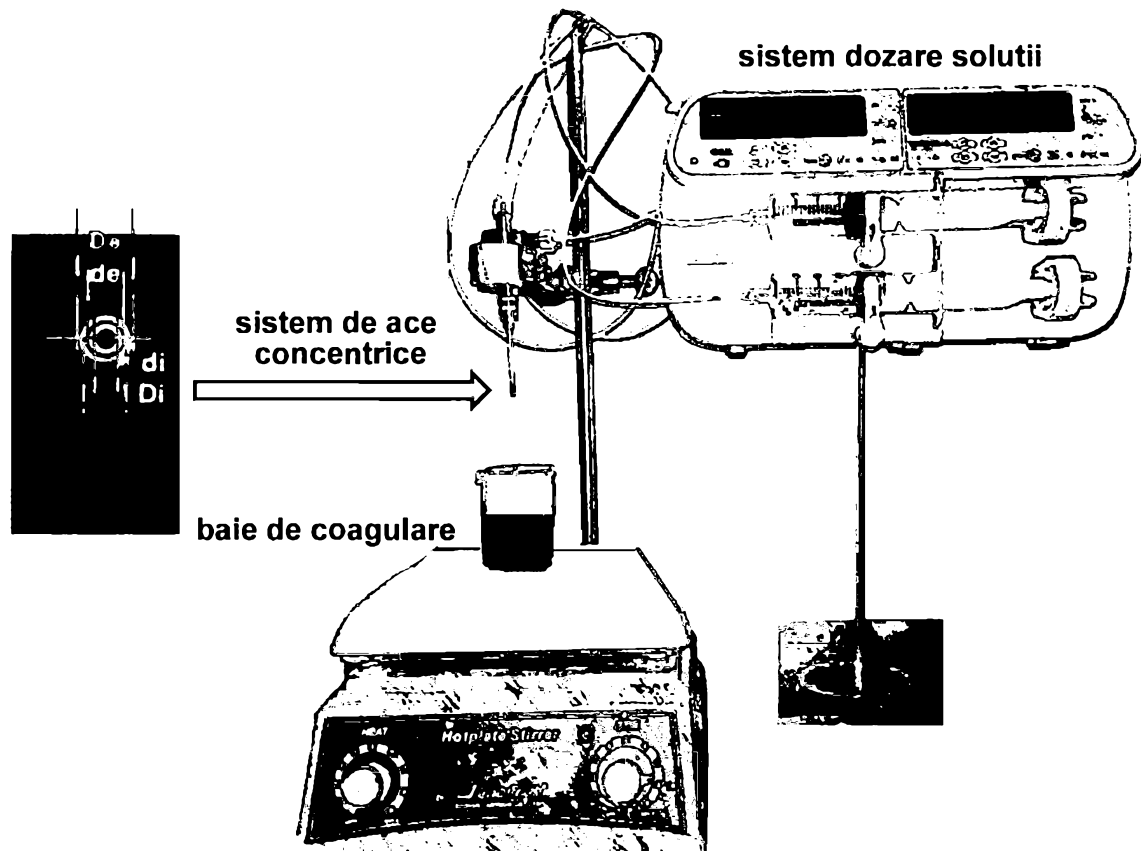


Figura 1. Dispozitiv experimental de obținere a tuburilor sau veziculelor polimerice/compozite