



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2011 00910**

(22) Data de depozit: **16.09.2011**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **29.03.2013** BOPI nr. **3/2013**

(41) Data publicării cererii:
29.06.2012 BOPI nr. **6/2012**

(73) Titular:
• **INSTITUTUL NAȚIONAL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU
ȘTIINȚE BIOLOGICE,
SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR.296,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO**

(72) Inventatori:
• **MOLDOVAN LUCIA,
BD.CONSTRUCTORILOR NR.24, BL.19,
SC.A, AP.13, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B,
RO;**
• **CRĂCIUNESCU OANA,
BD.NICOLAE GRIGORESCU NR.33,
BL.A 1, SC.3, AP.33, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO;**

• **TRIF MIHAELA, STR.PROMETEU NR.29,
BL.16 G, SC.3, AP.34, SECTOR 1,
BUCUREȘTI, B, RO;**

• **ZĂRNESCU OTILIA, BD.IULIU MANIU
NR.59, BL.10, SC.1, AP.17, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;**

• **MOISEI MAGDALENA,
STR.MATEI BASARAB NR.94, BL.L 120,
SC.B, AP.23, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B,
RO;**

• **GASPAR ALEXANDRA, ȘOS.COLENTINA
NR.55, BL.83, SC.1, AP.17, SECTOR 2,
BUCUREȘTI, B, RO**

(56) Documente din stadiul tehnicii:
**RO 122949 B1; WO 03000191 A2;
US 5639738 A**

(54) **MATERIAL BIOCOMPATIBIL POROS PENTRU STIMULAREA
REGENERĂRII CARTILAJULUI, ȘI PROCEDEU DE
OBTINERE A ACESTUIA**



Invenția se referă la un material biocompatibil, poros, pe bază de colagen, condroitin sulfat și compuși biologic activi, din extracte vegetale de arnică și/sau urzică, incluși în lipozomi, destinat tratării defectelor țesutului cartilajinos și la un procedeu de obținere a acestuia.

Compușii utilizați în compoziția acestui biomaterial, colagenul și condroitin sulfatul, sunt constituenți naturali, care intră în compoziția cartilajului articular, respectiv, a matricei extracelulare a acestuia, caracteristică ce face ca acest produs să mimeze structura țesutului nativ. De asemenea, produsul conține compuși biologic activi (polifenoli, polizaharide), cu acțiune antiinflamatoare, incluși în nanostructuri lipozomale, biocompatibile și biodegradabile, pentru eliberarea controlată a acestora la locul aplicării. Lipozomii obținuți din fosfolipide naturale, prezente în fluidul sinovial și active în procesul de lubrifiere a articulațiilor, asigură distribuția uniformă a substanțelor active într-o matrice glicoproteică stabilizată. Materialul condiționat sub formă de matrice poroase asigură o structură tridimensională, optimă pentru stimularea creșterii și diferențierii condrocitelor, celule implicate în sinteza noului țesut cartilajinos.

Se cunoaște că țesutul cartilajinos articular este un țesut biologic hidratat, care are, ca funcții de bază, distribuirea stresului în zonele de rezistență și reducerea fricțiunii în timpul mișcării articulației. Odată lezat, cartilajul are capacitate limitată de autoregenerare, datorită lipsei vaselor de sânge și absenței celulelor nediferențiate pentru refacere (Anderson A. S., Loeser R. F., *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*, 24, 15-26, 2010).

Colagenul este cea mai abundentă proteină a organismului uman, fiind componentul major al osului, cartilajului, pielii, ligamentului și al tendonului. În plus, această proteină formează o rețea structurală pentru alte țesuturi precum vasele de sânge. Unitatea de bază a structurii colagenului este o peptidă, constând din secvențe repetitive de aminoacizi Gly-Pro-Hyp, care se combină cu alte 12 peptide, pentru a forma structura de tip helix a colagenului. Până în prezent, au fost identificate, în organismul uman, 22 tipuri de colagen, dar cele mai răspândite sunt tipurile I, II, III și IV. Colagenul tip II este componenta principală a matricei extracelulare cartilajinoase, iar suporturile pe bază de colagen sunt un grup atractiv de materiale cu utilizări în repararea cartilajului. Acest tip de colagen este relativ ușor de obținut din țesuturi cartilajinoase animale, induce un răspuns imun foarte scăzut, poate fi condiționat în diferite forme (burete tridimensional, hidrogel) și se amestecă ușor cu alte componente, cu agenți reticulanți (de exemplu, glutaraldehidă, carbodiimidă) sau este supus unor tratamente fizice (iradiere UV, încălzire, liofilizare), pentru a modifica proprietățile mecanice ale suportului final.

Condroitin sulfatul este un glicozaminoglican prezent în matricea extracelulară și pe suprafața celulară a țesuturilor conjunctive animale și în țesuturile cartilajinoase. În acest țesut, condroitin sulfatul face parte din structura proteoglicanilor mari, de tipul agrecanului, cu rol în menținerea elasticității matricei cartilajinoase și a proteoglicanilor mici de tipul decorinei și biglicanului, implicați în metabolismul și adeziunea condrocitelor.

Nanostructurile lipidice cunoscute și sub denumirea de nanozomi sau lipozomi, datorită compoziției lor lipidice, a proprietăților fizico-chimice și a compatibilității cu organismul viu, au calități reale de lubrifiere a articulațiilor cartilajului și de a funcționa ca transportori selectivi în procesul de eliberare controlată a medicamentelor (Castor T. P., *Current Drug Delivery*, 2, 329, 2005). Lipozomii sunt utilizați pentru introducerea în celule a substanțelor farmacologic active, deoarece ei pot capta atât compuși hidrosolubili cât și hidrofilici, în compartimentul lor intern apos, cât și substanțe hidrofobe în bistratul lipidic (Torchilin V. P., *Nat. Rev. Drug Discov.*, 4, 145-160, 2005). Majoritatea cercetărilor privind interacția lipidelor cu biopolimerii s-au limitat la asocierea lipozomilor cu ADN-ul (Khalil I. A.,

Kogure K., Akita H., Harshima H., <i>Pharmacol. Rev.</i> , 58, 32-45, 2006), microtubuli (Raviv U., Needleman D. J., Li Y., Miller H. P., Wilson L., Safinya C. R., <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> , 102, 11167-11172, 2005) și substanțe naturale de tip glicozaminoglicani (RO 122949 B1 , 2010). WO 03000191 A2 se referă la o compoziție și la o metodă pentru tratamentul artritei, care cuprinde unul sau mai mulți glicozaminoglicani în combinație cu unul sau mai mulți inhibitori ai hialuronidazei.	1 3 5
Compușii biologic activi de origine vegetală, de tipul polifenolilor și polizaharidelor, prezintă proprietăți antiinflamatoare, care au la bază capacitatea acestora de a inhiba activitatea radicalilor liberi, implicați în patogeneza diferitelor procese precum inflamația țesuturilor cartilaginoase, îmbătrânirea și cancerul (Hazra B., Biswas S., Mandal N., <i>BMC Complem. Altern. M.</i> , 8, 63-65, 2008). În condiții normale, celulele articulațiilor - sinoviocitele și condrocitele - produc radicali liberi, care sunt implicați în activarea unor cascade de semnalizare intracelulare importante (Roman-Blas J. A., et al., <i>European Journal of Pharmacology</i> , 623, 125-131, 2009). În condiții de poluare, producția de specii reactive de oxigen depășește activitatea antioxidantă disponibilă și se produce un dezechilibru între oxidant și antioxidant, ceea ce conduce la stres oxidativ, un eveniment catabolic care dă naștere la moarte celulară și la degradarea matricei extracelulare implicate în boli degenerative ale cartilajului (osteoartita, artrita reumatoidă etc.) (Migdal C., Serres M., <i>Medecine Sciences</i> , Paris, 27, 405-412, 2011).	7 9 11 13 15 17 19
În ultimul deceniu, cercetările în domeniul obținerii de biomateriale pentru repararea cartilajului articular au căpătat o importanță sporită, datorită, pe de o parte, creșterii longevității populației, care a determinat o incidență mărită a osteoartritelor și osteoartrozelor și, pe de altă parte, accidentelor sporite, survenite în rândul populației tinere.	21 23
Sunt cunoscute biomaterialele utilizate la repararea cartilajului pe bază de collagen, agaroză, alginat/chitosan (Galois et al., <i>Biorheology</i> , 41, 433-443, 2004), singuri sau în asociere cu polimeri sintetici (polietilenglicol, poliuretani, alcool polivinilic, acid poliglicolic), care acționează ca o rețea biocompatibilă și biodegradabilă în repararea cartilajului. Principalii glicozaminoglicani ai matricei extracelulare cartilaginoase - acid hialuronic și condroitin sulfat - sunt deja comercializați ca agenți condroprotectivi, pentru tratamentul osteoartritei (US 5914322 ; Prabhakar V., Sasisekharan R., <i>Chem. Biol.</i> , 12, 267-277, 2005). De asemenea, există preparate comerciale conținând acid hialuronic, precum HYALGAN (Fidia S.p.A.) și SYNVISIC (Biomatrix), destinate tratamentului osteoartritic prin injectare intraarticulară. Evaluarea <i>in vitro</i> a unui hidrogel compozit din acid hialuronic și alginat de calciu a evidențiat proliferarea condrocitelor din cultură și producerea de collagen tip II. Mai mult, aceste hidrogeluri implantate într-o leziune osteocondrală de șoarece au arătat o bună toleranță și o biocompatibilitate ridicată (Dausse Y. et al, <i>Osteoarthritis & Cartilage</i> , 11, 16-28, 2003).	25 27 29 31 33 35 37
Problema pe care o rezolvă invenția constă în realizarea unui material biocompatibil, poros, pentru stimularea regenerării cartilajului și a unui procedeu de obținere a acestuia.	39
Materialul biocompatibil, poros, pentru stimularea regenerării cartilajului, conform invenției, este constituit din 30...40% lipozomi cationici, cu diametrul mediu cuprins între 50 și 200 nm, 1...10% extract de plante, ales între arnică și/sau urzică, conținând 5...20 mg/ml polifenoli și/sau 1...10 mg/ml polizaharide, 30...45% collagen tip II acido-solubil, cu greutatea moleculară medie 300...330 kDa și conținut în collagen mai mare de 85% și 20...30% condroitin sulfat cu greutatea moleculară medie de 15...40 kDa și conținut în acizi uronici de minimum 27%, părțile fiind exprimate în greutate.	41 43 45

1 Procedeul de obținere a produsului definit în revendicarea 1, caracterizat prin aceea
că se amestecă 30...60 părți compoziție I, constând dintr-o soluție formată din 5...15%
3 lipozomi cationici cu diametrul cuprins între 50 și 200 nm în care s-a înglobat 1...10% extract
de plante, ales între arnică și/sau urzică, cu 40...70 părți compoziție II, constând din 50...70%
5 soluție vâscoasă de collagen tip II nedenaturat cu concentrație 5...20 mg/ml și greutate
moleculară medie de 300...350 kDa, și 30...50% soluție apoasă de sulfat de condroitin de
7 concentrație 10...20 mg/ml cu greutatea moleculară medie de 15...25 kDa și un conținut de
acizi uronici de 30%, cele două compoziții se amestecă cu agitare puternică, timp de 30...60
9 min, la temperaturi sub 30°C, gelul rezultat se liofilizează prin înghețare la o temperatură de
-20...-40°C, și uscare la o temperatură de 20...30°C, timp de 36...72 h, materialul poros
11 rezultat se taie la dimensiuni uniforme și se sterilizează cu radiații gamma.

 Produsul, având în compoziție principalele componente ale țesutului cartilajinos
13 (colagen tip II, condroitin sulfat, lipozomi) și substanțe naturale cu efect antiinflamator
(polifenoli, polizaharide), este eficient în refacerea țesutului cartilajinos în procesele
15 inflamatorii, reumatismale și leziuni traumatice.

 Produsul conform invenției reprezintă un material poros, biocompatibil și resorbabil,
17 constituit din 30...40% lipozomi cationici, cu diametrul mediu cuprins între 50 și 200 nm,
1...10% extract de plante, ales între arnică și/sau urzică, conținând 5...20 mg/ml polifenoli
19 și/sau 1...10 mg/ml polizaharide, 30...45% collagen tip II acidosolubil, cu greutatea
moleculară medie 300...330 kDa și conținut în collagen mai mare de 85% și 20...30%
21 condroitin sulfat cu greutatea moleculară medie de 15...40 kDa și conținut în acizi uronici de
minimum 27%, părțile fiind exprimate în greutate.

 Procedeul de obținere a produsului, conform invenției, constă în aceea că se
23 realizează un biomaterial poros, prin amestecarea a 30...60 părți compoziție I, constituită
dintr-o soluție de 5...15% lipozomi cationici, cu un diametru cuprins între 50 și 200 nm, în
25 care s-au înglobat 1...10% extract apos de plante alese între arnică și urzică, cu un conținut
de 5...20 mg/ml polifenoli și/sau 1...10 mg/ml polizaharide, cu 40...70 părți compoziție II,
27 reprezentând un amestec din 50...70% soluție vâscoasă de collagen tip II nedenaturat, de
concentrație 5...20 mg/ml, cu greutate moleculară medie 300...350 kDa, și o soluție apoasă
29 de 30...50% condroitin sulfat de concentrație 10...20 mg/ml cu greutatea moleculară medie
15...25 kDa și un conținut în acizi uronici de 30%. Soluția de lipozomi din compoziția I se
31 obține prin amestecarea de fosfatidilcolină:diolilefosfatidiletanolamină:colesterol:stearilamină,
în raportul de greutate 4:2:3:1, dizolvate în prealabil în 200...500 ml amestec de cloroform
33 și metanol (95:5, părți în volume), solvenți ce se evaporă ulterior la vid. Înainte de
amestecarea cu compoziția II, compoziția I, conținând extracte vegetale, înglobate în soluția
35 de lipozomi, se depozitează la temperatura camerei, timp de 6...9 h și se omogenizează prin
sonicare, într-un sonicator tip baie, la temperatura de 37°C, în 3...5 reprize a câte 30...60 min,
37 urmată de sonicarea la un sonicator tip sondă, 4...6 reprize a câte 10 s. În vederea obținerii
unor structuri omogene de soluții lipozomi-extracte vegetale, cu diametrul mai mic de
39 200 nm, compoziția I se centrifughează la 2000...5000 rpm, timp de 5...10 min și se filtrează
prin filtrul Millipore de 0,22 μm. Îndepărtarea extractelor vegetale neasociate se face prin
41 centrifugare la 10000...15000 rpm, timp de 30...60 min, după care precipitatele lipozomale
se spală de 2 ori cu tampon fosfat salin pH 7,4. Collagenul tip II, utilizat în compoziția II, se
43 obține din cartilaj traheal bovin, prin extracție cu pepsină, în soluție de acid acetic 0,1...0,5M,
la 4°C, timp de 48...72 h și se purifică prin precipitare cu o soluție de clorură de sodiu 0,7 M,
45 urmată de o dializă excesivă față de apă distilată. Compoziția I se adaugă peste compoziția
II și se amestecă prin vortexare puternică timp de 30...60 min, la temperaturi sub 30°C, după
47 care amestecul obținut sub formă de gel se liofilizează prin înghețare la -20...-40°C și uscare

la +20...30°C, timp de 36...72 h. Materialul poros obținut se taie la dimensiuni uniforme (diametrul 4...6 mm și grosimea 3 mm), se ambalează în pungi de polietilenă și se sterilizează prin expunere la radiații gamma, la doze de 15...20 kGy.	1
Prin aplicarea invenției, se obțin următoarele avantaje:	3
- suportul compozit obținut prezintă o eficiență mare în tratarea afecțiunilor cartilaginoase (afecțiuni inflamatorii, reumatismale, tratarea cartilajului lezat etc.) conținând în compoziția sa biopolimeri care se găsesc, în mod natural, în țesutul cartilagin.	5
Înglobarea principiilor active cu acțiune antiinflamatoare în structurile lipozomale cationice permite redarea controlată și prelungită a acestora la locul aplicării;	7
- datorită structurii sale poroase, produsul realizează un contact strâns cu zona lezată, facilitând, astfel, influxul celulelor din țesutul neafectat înconjurător și proliferarea acestora;	9
- produsul obținut poate servi și ca matrice suport pentru celulele cartilajului (condrocite), oferind acestora o rețea tridimensională, asemănătoare matricei extracelulare, condiție esențială pentru menținerea fenotipului celular;	13
- suportul este biocompatibil și biodegradabil în timp, asigurând, astfel, substratul ideal pentru formarea de țesut nou, în timp ce produsul este degradat;	15
- produsul este stabil în timp, nu creează antigenicitate în contact cu organismul;	17
- procedeul de obținere este fezabil și nu necesită instalații cu grad ridicat de complexitate.	19
Se prezintă, în continuare, două exemple de realizare a invenției.	21
Exemplul 1. Într-un vas de inox, prevăzut cu agitator, cu un volum util de 10 l, se prepară compoziția lipidică prin amestecarea a patru lipide: 60 g fosfatidilcolină, 30 g dioleilfosfatidil-etanolamină, 20 g colesterol și 15 g stearilamină, dizolvate în prealabil în 0,500 l amestec de cloroform și metanol (95:5, raport de volume). Îndepărtarea solvenților organici în care s-au dizolvat lipidele se realizează prin evaporare la vid, în atmosferă inertă de azot, într-un vas de sticlă cu fund rotund. Peste soluția lipidică din vasul din sticlă, se introduc 0,1 l extract apos de arnică, cu un conținut de 6 mg/ml polifenoli și 5 mg/ml polizaharide, și se amestecă la temperatura camerei, sub agitare continuă. Pentru a facilita procesul de includere, emulsia rezultată se incubează la temperatura camerei, timp de 7 h și se omogenizează într-un sonicator tip baie, la 37°C, în 3 reprize a câte 30 min fiecare, urmată de sonicarea la un sonicator tip sondă, în 4 reprize a câte 10 s fiecare. Suspensia se răcește la temperatura de 5°C, într-o baie de gheață, timp de 30 min și se centrifughează la 2000 rpm, timp de 10 min.	23
În vederea obținerii unor structuri omogene, cu particule cu diametrul mai mic de 200 nm, soluția obținută după sonicare și centrifugare se filtrează prin filtrul Millipore de 0,22 μm. Îndepărtarea extractelor vegetale neasociate se face prin centrifugare la 13000 rpm, timp de 60 min, după care precipitatele lipozomale se spală de 2 ori cu tampon fosfat salin, pH 7,4. Sarcina pronunțată negativă a principiilor active folosite (polifenoli, polizaharide) a permis o includere în lipozomi cu randament ridicat, peste 82%.	25
Separat, într-un vas de inox, prevăzut cu agitator, cu un volum util de 20 l, se obține colagenul tip II, din cartilaj traheal bovin mărunțit în prealabil, prin extracție cu pepsină, în soluție de acid acetic 0,5M, la 4°C, timp de 48 h. Soluția de colagen sub formă de gel se purifică prin precipitare cu o soluție de clorură de sodiu 0,7 M, după care se dializează excesiv față de apă distilată, pentru îndepărtarea urmelor de sare. Soluția de colagen astfel obținută, de concentrație 10 mg/ml, se amestecă cu o soluție de condroitin sulfat 5 mg/ml, cu greutatea moleculară medie 15 kDa și conținut în acizi uronici 30%, prin agitare continuă, în raport de combinare soluție de colagen:condroitin sulfat 1:1 (raport de volume).	27
	29
	31
	33
	35
	37
	39
	41
	43
	45
	47

1 Compoziția obținută din extracte vegetale înglobate în lipozomi se adaugă peste
amestecul de collagen și condroitin sulfat, în raportul de combinare 1:1 (v/v) și se vortexează
3 puternic timp de 30 min, pentru o bună omogenizare. Amestecul obținut, sub formă de gel,
se liofilizează prin înghețare la -40°C și uscare la +20°C, timp de 48 h.

5 Materialul poros, obținut după liofilizare, se taie la dimensiuni de 6x3 mm, se
ambalează în pungi de polietilenă și se sterilizează prin expunere la radiații gamma, la doze
7 de 15 kGy.

Exemplul 2. Se utilizează același procedeu și instalație ca la exemplul 1, cu
9 deosebirea că amestecul de lipozomi și extracte vegetale (compoziția I) se prepară din 100 g
compoziție lipidică și 50 g extract apos de urzică. Amestecul de cloroform și metanol din
11 compoziția lipidică se evaporă la vid, iar peste soluția de lipozomi se adaugă 50 g extract
apos de urzică, cu un conținut de 20 mg/ml polifenoli și 10 mg/ml polizaharide. După
13 depozitarea compoziției I la temperatura camerei, timp de 9 h, se realizează sonicarea, cu
ajutorul unui sonicator tip baie, la 37°C, în 5 reprize a câte 40 min fiecare. În urma
15 centrifugării și filtrării acestui amestec, conform exemplului 1, se obțin structuri lipozomale,
cu diametrul de 150 nm, în care sunt înglobați polifenolii și polizaharidele din extractul de
17 urzică. După îndepărtarea excesului de componente vegetale prin centrifugare la 15000 rpm,
timp de 10 min și spălare cu tampon fosfat salin, pH 7,4, se realizează amestecarea
19 compoziției I cu 500 g compoziție II (amestec collagen tip II și condroitin sulfat), preparată
conform exemplului 1. Soluția vâscoasă, omogenă, obținută se condiționează sub formă
21 solidă, prin liofilizare (temperatura de înghețare -35°C și temperatura de uscare +30°C), timp
de 36 h. Produsul spongios, obținut după liofilizare, se ambalează etanș în pungi de
23 polietilenă, se sterilizează prin expunere la radiații gamma, la o doză de 18 kGy.

Produsul obținut, conform exemplelor de mai sus, a fost testat din punct de vedere
25 al biocompatibilității atât *in vitro*, cât și *in vivo*.

Evaluarea efectului antiinflamator al variantelor de produs s-a realizat pe un model
27 experimental *in vitro*, utilizând culturi primare de condrocite umane, tratate cu peroxid de
hidrogen, pentru inducerea de leziuni celulelor. Expunerea celulelor la peroxid de hidrogen
29 produce apoptoza celulelor, peroxidarea lipidică inhibă sinteza de componente ale matricei
extracelulare. În acest context, s-au investigat viabilitatea celulară, proliferarea celulară și
31 morfologia celulelor lezate și crescute în prezența produsului realizat, comparativ cu doi
martori (celule netratate și celule tratate cu peroxid de hidrogen). Rezultatele obținute prin
33 metode cantitative (spectrofotometrie) și calitative (microscopie optică) au demonstrat că
produsul realizat a avut o acțiune antiinflamatoare crescută, evidențiată prin favorizarea
35 proliferării și viabilității celulelor și păstrarea morfologiei normale a condrocitelor în cazul
tratării acestora cu variantele de produs, comparativ cu celulele tratate numai cu peroxid de
37 hidrogen care au prezentat o viabilitate redusă și o morfologie modificată.

Biocompatibilitatea *in vivo* a produsului poros a fost demonstrată pe animale de
39 laborator (șobolani Wistar) cărora li s-au implantat subcutanat probe din produs. La 5 zile și
la 6 săptămâni de la implantarea subcutanată, s-a recoltat implantul, împreună cu țesutul
41 înconjurător, care a fost procesat pentru microscopie optică. Observațiile histologice au
arătat că la 5 zile de la implantare, în jurul produsului poros, se formează un țesut de
43 granulație, care conține celule inflamatorii și vase de sânge ce apar, în mod normal, în urma
unei leziuni tisulare. La 6 săptămâni de la implantare, s-a evidențiat formarea unei capsule
45 conjunctive fibroase, care înconjoară produsul. Studiile histologice au demonstrat că pe toată
perioada implantării, materialul poros a fost bine tolerat de țesutul gazdă și nu a determinat
47 efecte adverse, aspect care demonstrează o bună biocompatibilitate.

1. Material biocompatibil, poros, pentru stimularea regenerării cartilajului, **caracterizat prin aceea că** este constituit din 30...40% lipozomi cationici, cu diametrul mediu cuprins între 50 și 200 nm, 1...10% extract de plante, ales între arnică și/sau urzică, conținând 5...20 mg/ml polifenoli și/sau 1...10 mg/ml polizaharide, 30...45% collagen tip II acidosolubil, cu greutatea moleculară medie 300...330 kDa și conținut în collagen mai mare de 85%, și 20...30% condroitin sulfat cu greutatea moleculară medie de 15...40 kDa și conținut în acizi uronici de minimum 27%, părțile fiind exprimate în greutate. 3 5 7 9
2. Procedeu de obținere a produsului definit în revendicarea 1, **caracterizat prin aceea că** se amestecă 30...60 părți compoziție I, constând dintr-o soluție formată din 5...15% lipozomi cationici cu diametrul cuprins între 50 și 200 nm, în care s-a înglobat 1...10% extract de plante, ales între arnică și/sau urzică, cu 40...70 părți compoziție II, constând din 50...70% soluție vâscoasă de collagen tip II nedenaturat cu concentrație 5...20 mg/ml și greutate moleculară medie de 300...350 kDa și 30...50% soluție apoasă de sulfat de condroitin de concentrație 10...20 mg/ml cu greutatea moleculară medie de 15...25 kDa și un conținut de acizi uronici de 30%, cele două compoziții se amestecă cu agitare puternică, timp de 30...60 min, la temperaturi sub 30°C, gelul rezultat se liofilizează prin înghețare la o temperatură de -20...-40°C, și se usucă la o temperatură de 20...30°C, timp de 36...72 h, materialul poros rezultat se taie la dimensiuni uniforme și se sterilizează cu radiații gamma. 11 13 15 17 19
3. Procedeu de obținere a produsului definit în revendicarea 1, **caracterizat prin aceea că** soluția de lipozomi cationici din compoziția I se obține prin amestecarea fosfatidilcolinei:diolilfosfatidiletanolaminei:colesterolului:stearilaminei, în raportul de greutate 4:2:3:1. 21 23

