



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2010 01216**

(22) Data de depozit: **26/11/2010**

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

(41) Data publicării cererii:
30/08/2012 BOPI nr. **8/2012**

(73) Titular:
• **UNIVERSITATEA "ȘTEFAN CEL MARE"**
DIN SUCEAVA, STR. UNIVERSITĂȚII NR. 13,
SUCEAVA, SV, RO

(72) Inventatori:
• **HAGIU BOGDAN-ALEXANDRU,**
BD. DIMITRIE CANTEMIR NR. 3, BL. P 4,
SC. B, ET. 3, AP. 15, IAȘI, IS, RO;
• **SANDU ION, STR. SF. PETRU MOVILĂ**
NR. 3, BL. L 11, SC. C, ET. 3, AP. 3, IAȘI, IS,
RO;
• **VASILACHE VIOLETA,**
BD. GAVRIL TUDORAȘ NR. 22, BL. C 4,
SC. A, AP. 7, SUCEAVA, SV, RO;

• **ȚURA VASILE, STR. VASILE LUPU NR. 83,**
BL. D 1, SC. A, ET. 10, AP. 37, IAȘI, IS, RO;
• **MANGALAGIU IONEL, STR. CRIȘULUI**
NR. 12, IAȘI, IS, RO;
• **MUNGIU OSTIN-COSTEL,**
STRADELA SĂRĂRIE NR. 6, IAȘI, IS, RO;
• **FILOTE CONSTANTIN,**
BD. GEORGE ENESCU NR. 12,
BL. BELVEDERE, SC. D, ET. 5, AP. 17,
SUCEAVA, SV, RO;
• **SANDU ANDREI-VICTOR,**
ALEEA TUDOR NECULAI NR. 37, BL. 959,
SC. C, ET. 2, AP. 10, IAȘI, IS, RO

(56) Documente din stadiul tehnicii:
RO 126087 B1; RO 125083 B1

(54)

PROCEDU DE OBTINERE A UNEI NANODISPERSII ULEIOASE CU CAPACITATE REGENERATIVĂ

Examinator: **biochimist EREMIA LAURA**



Orice persoană are dreptul să formuleze în scris și motivat, la OSIM, o cerere de revocare a brevetului de invenție, în termen de 6 luni de la publicarea mențiunii hotărârii de acordare a acesteia

RO 127723 B1

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unei nanodispersii uleioase cu capacitate regenerativă a țesuturilor, datorită stimulării celulelor stem mezenchimale și ale foliculilor piloși.

Se știe că nanoparticulele de argint în concentrații între 2,5 și 5 ppm stimulează culturile de celule STEM mezenchimale [Greulich C., Kittler S., Eppe M., Muhr G., Koller M., *“Studies on the biocompatibility and interaction of silver nanoparticles with the human mesenchymal stem cells”* (hMSCs), Langbeck's Archives of Surgery, 394, 3, 2009, pp. 495-502]. De asemenea, argintul nanometric inclus în materiale nanofibrilare biocompatibile, implantate subcutanat, are ca efect geneza unor noi foliculi piloși, ce provin din celulele stem ale celor vechi, sau din celulele stem mezenchimale, regenerarea cutanată având loc prin acțiunea noilor celule stem [Tura V., Hagiu B. A., Mangalagiu I., *“Hair follicles stimulation effects of gelatin nanofibers containing silver nanoparticles”*, Journal of Biomedical Nanotechnology, 6, 2, 2010, pp. 192-197; Hagiu B. A., Tura V., Ciobanu C., Mihăilă D., Fântânu M., Mungiu O. C., *“Studiu privind biocompatibilitatea unui material compozit din nanofibre de poliuretane funcționalizate cu nanoparticule de argint”*, Medicina modernă, vol XVI, Iași 2009, ISSN 1223-0472, pp. 77-79; Hagiu B. A., Burtan L. C., Mihailovici Maria Sultana, Tura V., Ciobanu C., Ferariu D., *„On the biocompatibility of poly (urethaneurea) doped with Silver nanoparticles”*, în Lucrări Științifice, seria Medicină Veterinară, 49 (8), 2006, p. 97-101; Hagiu B. A., Solcan Carmen, Floristean V., Nastasa V., Ciobanu C., Tura V., *“The biocompatibility and regenerative properties of polyurethaneurea doped with silver nanoparticles”*, în Lucrări Științifice, seria Medicină Veterinară, 50 (9), 2007, p. 61-64; Hagiu B. A., Solcan C., Ciobanu C., Tura V., Burghilea, D., *„Efectele unui biopoliuretan dopat cu nanoparticule de argint asupra cicatrizării și regenerării tisulare”*, în Revista Medico-Chirurgicală a Societății de Medici și Naturaliști din Iași, 111 (2), Supliment nr. 1, 2007, p. 123-126; Hagiu B. A., Tura V., Ciobanu C., Isac R. M., Mihailovici M. S., Ferariu D., Ionescu C. R., *“The Potential of Silver Nanoparticles Doped Poly(urethaneurea) to Induce Proliferation of the Hair Follicle Cells”*, in Drugs: use, abuse and dependency, (editor O. Mungiu), "Gr. T. Popa" Publishing House, Iași, 2008, p. 33-36;]. Particulele de argint prezintă și o remarcabilă acțiune antibacteriană [F. Tofoleanu, T. Balau Mândru, F. Brânză, N. Sulitanu, I. G. Sandu, D. Răileanu, V. Floristean, B. A. Hagiu, C. Ionescu, I. Sandu, V. Tura., 2008, *“Electrospun gelatin nanofibers functionalized with silver nanoparticles”*, Journal of optoelectronics and advanced materials, vol 10, no 12, December 2008, ISSN: 1454-4164, pp. 3512-3516].

În baza acestor cercetări fundamentale, în tratamentele cicatrizante și regenerative ale tegumentelor acoperite cu păr s-au utilizat o serie de sisteme pe bază de pansamente, cu nanofibre din diverse materiale polimerice, naturale sau artificiale, având o comportare specifică sistemelor microporoase, aero-difuzive care conțin, pe lângă argint, sub diversele forme biologice active (metal, cation sau oxid), și alte substanțe cu efect hemostatic și cicatrizant [Hagiu B. A., Tura V., Balau-Mîndru T., Sandu I., Balau-Mîndru I., Sandu A. V., *“Pansament compozit cu nanofibre funcționalizate cu metale nobile”*, Dosar OSIM A/00293/10.06.2008]. De asemenea, sunt utilizate, ca suport matriceal pentru nanoparticulele de argint, fibrina sau trombina uscată liofilizată, în scopul obținerii unor pudre cu efect hemostatic și regenerativ [Hagiu B. A., Sandu, A. V., Tura, V., Sandu, I. G., Mungiu, O. C., Sandu, I., *„Pudră cu capacitate hemostatică, cicatrizantă și regenerativă”*, Dosar OSIM A/00685/07.09.2009; Hagiu, B. A., Sandu, A. V., Lupascu T., Chirazi M., Mangalagiu I., Sandu, I., Ciobanu M., Vasilache V., *„Pudră cu capacitate*

hemostatică și regenerativă", Dosar AGEPI A2010.00131/30.07.2010]. Dintre materialele polimerice naturale, utilizate în acest scop, fibrina - o proteină fibroasă, obținută din fibrinogen (produs de ficat), care favorizează vindecarea plăgilor - este des indicată în hemoragii capilare de suprafață, plăgi atone, arsuri întinse etc. [Fries D, Innerhofer P, Schobersberger W, **"Time for changing coagulation management in trauma-related massive bleeding"**. *Current Opinion in Anaesthesiology* 22 (2), 2009, p. 267-274]. Dintre adjuvanți sau excipienți, alături de argintul coloidal, în literatura de specialitate figurează utilizarea sulfamidelor, chimioterapicelor și antibioticelor cu administrare topică, lactoza pudră, sulfatul de magneziu etc., ca atare sau sub formă de sisteme disperse sinergice [Cross, P. E., Arrowsmith J. E., **"Process for production of derivatives of indan sulphamid and medical compositions containing them"**, Patent HU 50320 (A2)/1990, Shimi I., **"New sulphamide derivatives, process for producing them and their application as medicaments"**, Patent FR 2650275 (A1)/1991. Bama Geve SA Lab, **"Silver sulphamide salt preparation"**, Patent ES 8702349 (A1)/1987. Kazuko M., Tomoyuki W., **"Solid medicinal preparation containing mannitol or lactose"**, Patent CA 2672134 (A1)/2008; Walz M., Ossadnik S., Trunk M., Kreher C., **"Novel medicament in powder form comprising tiotropium and salmeterol, and lactose as excipient"**, Brevet WO 2009013244 (A1)/2009; Zhao C., **"Pharmaceutical compositions for emergency treatment and process for preparing the same"**, Patent RO 122394 (B1)/2009; No Hi Ok, **"Antibiotics dinner set having silver-nano coating layer"**, Patent KR 20060108034/2006; Ouyang W., Xu L., **"Tinidazole compound nano silver microemulsion antibacterial medicine"**, Brevet CN 101229126 (A)/2008].

Aceste sisteme pe bază de materiale polimerice naturale, amestecate cu adjuvanți sau excipienți prezentați mai sus, au o serie de dezavantaje legate de compatibilitatea chimică, uniformitatea microstructurală și dispunerea componentelor în suportul de fibrină ca sistem matricial. Mai mult, sistemele compozite, obținute prin liofilizare, gelifiere sau amestecare în stare solidă, semifluidă sau pastă, au dezavantajele neuniformității distribuției principiilor active, utilizării unor principii biologice active incompatibile chimic, higroscopicității ridicate și altele, reducând astfel efectul sinergic al unor componente.

Sistemul nanodispers cel mai apropiat de invenția prezentă este cel pe bază de argint coloidal obținut prin reducerea cationului de $\text{Ag}^+_{(\text{aq})}$ din soluții apoase de azotat de argint, în prezența aminoalcoolilor (dietanolamină sau trietanolamină) [Kimitaka S., et al., **"Method for producing silver nanoparticle"**, Brevet JP 2009102716/14.05.2009;] și respectiv a gelului semisolid pe bază de argint coloidal (precipitat tot în soluții apoase) în concentrație de 0,001...1% și diverși adjuvanți ce măresc efectul terapeutic în aplicații topice [Khandelwal S., et al., **"Silver Nanoparticle Dispersion Formulation"**, Patent US 2010203088/12.08.2010]. Aceste sisteme au dezavantajul că se bazează doar pe acțiunea argintului coloidal în aplicații topice, folosit doar pentru tratarea leziunilor tegumentelor și mucoaselor, fiind exclusă administrarea injectabilă pentru pregătirea preoperatorie a țesuturilor, prin acțiunea antimicrobiană, sau pentru regenerarea profilactică a rupturilor interne, închise, ale acestora.

Scopul invenției este de a prepara un sistem dispers uleios, cu capacitate antibacteriană și regenerativă, pe bază de nanoparticule de argint stabilizate steric și electrostatic, care să permită administrarea injectabilă pentru pregătirea preoperatorie a țesuturilor, sau pentru favorizarea refacerii mușchilor după rupturi, prin stimularea celulelor stem mezenchimale, și pentru tratarea diverselor forme de alopecie, prin generarea de noi foliculi piloși.

Problema pe care o rezolvă invenția constă într-un procedeu de obținere a unei nano-dispersii biocompatibile de argint în ulei, cu acțiune antibacteriană și regenerativă, care să permită administrarea injectabilă pentru pregătirea preoperatorie a țesuturilor, sau pentru regenerarea leziunilor musculare și tratarea alopeciilor.

Procedeu de obținere a unei nanodispersii uleioase cu capacitate regenerativă a țesuturilor, conform invenției, înlătură dezavantajele de mai sus prin aceea că se dispersează în suportul matriceal de ulei de floarea-soarelui, pentru uz injectabil, până la o concentrație de 2,5...5,0 ppm și agitare la 300 rot/min:

a) argint coloidal cu granulație de 5...10 nm, care a fost peliculizat superficial în prealabil, cu polivinilpirolidonă, sau

b) nanoparticule de argint obținute din azotat de argint, prin precipitare cu citrat de sodiu și stabilizate în sistem apos, în prezența polivinilpirolidonei, obținându-se nanodispersii uleioase care se înfiolează în fiole de sticlă de 1,0, 2,0 și 3,0 g, care se păstrează la temperaturi sub 10°C, în cutii originale, ferite de lumină, care se agită înainte de utilizare ca produs injectabil.

Prin aplicare, invenția aduce o serie de avantaje, cum ar fi:

- administrarea pe cale injectabilă, care permite o remanență în țesuturi timp îndelungat, în comparație cu nanodispersiile apoase;

- o înaltă biocompatibilitate cu țesuturile lezate;

- absorbția predominant locală permite utilizarea în scop profilactic sau terapeutic a unei cantități mici de nanodispersie, în comparație cu tratamentele pe cale orală;

- permite o regenerare rapidă a țesuturilor, lipsită de reacții adverse, întrucât prin stimularea celulelor stem mezenchimale se poate reface orice țesut;

- permite formarea precoce a țesutului de granulație, efect care îl face util și în ingineria tisulară, pentru pregătirea țesuturilor pentru grefare;

- în cazul tegumentelor acoperite cu păr, administrarea subcutanată realizează un efect terapeutic scontat pentru toate formele de alopecie;

- are un efect sinergic cu alți componenți regenerativi, cu mod de administrare topică;

- fiabilitate ridicată și eliberare graduală a argintului la o doză optimă procesului regenerativ;

- un cost scăzut de fabricare.

În continuare se prezintă două exemple de realizare a invenției.

Exemplul 1

Pentru obținerea unui kilogram de nanodispersie uleioasă pe bază de argint coloidal, se procedează în felul următor: se iau 1000 g ulei de floarea-soarelui rafinat injectabil, care, în prealabil, a fost neutralizat și sterilizat, în care se dispersează intim, prin agitare mecanică, la 600 rot/min, 5 mg pulbere de nanoparticule de argint, cu dimensiunile cuprinse în intervalul 5...10 nm și peliculizate superficial cu polivinilpirolidonă, care permite stabilizarea microsistemului uleios nanodispers.

După stabilizarea prin agitare mecanică, nanodispersia uleioasă se înfiolează în fiole de sticlă de 1,0, 2,0 și 3,0 g și se păstrează la temperaturi sub 10°C, în cutii originale, ferite de lumină. Se agită înainte de utilizare ca produs injectabil.

Argintul coloidal peliculizat cu polivinilpirolidonă, distribuit omogen în nanodispersie, permite o eliberare constantă în timp a principiului bioactiv, care stimulează pe timp îndelungat celulele stem, argintul și ionii de argint, asigurând și o acțiune antimicrobiană, antiinflamatoare și antialergică, ce reduce riscul de infectare a plăgilor, îmbunătățind toleranța firelor de sutură.

Exemplul 2

	1
Pentru obținerea unui kilogram de nanodispersie uleioasă pe bază de argint coloidal,	3
se procedează în felul următor: în 1000 cm ³ ulei de floarea-soarelui injectabil (ulei rafinat	5
care, în prealabil, a fost neutralizat și sterilizat) se dispersează intim, prin agitare mecanică,	7
la 300 rot/min, 200 cm ³ nanodispersie apoasă pe bază de argint, care conține circa 5 mg	9
argint coloidal, obținut prin precipitarea cu o soluție alcoolică de citrat de sodiu a argintului	11
din soluție apoasă de azotat de argint, aditivată cu 1 g de polivinilpirolidonă, ca agent de	13
suprafață. Pentru aceasta, în 200 cm ³ apă bidistilată se dizolvă 10 mg azotat de argint. În	15
această soluție, după încălzirea ei la 60...65°C, se adaugă, sub agitare puternică, 2 cm ³	17
soluție alcoolică de citrat de sodiu 1% și 1 g polivinilpirolidonă, după care sistemul micro-	19
eterogen se agită cu 600 rot/min, timp de 10 min. Nanodispersia rezultată se redispersează	
intim în 1000 cm ³ ulei de floarea-soarelui injectabil, prin agitare mecanică, la 300 rot/min,	
timp de 15...20 min, după care se separă nanodispersia uleioasă, sub forma unei emulsii,	
de sistemul apos, cu ajutorul unei pâlnii de separare. Emulsia astfel obținută se vacuumează,	
sub agitare ușoară, la 0,85 atm și temperatura de 75...80°C, timp de 20...30 min.	
Nanodispersia uleioasă se înfirolează în fiole de sticlă de 1,0, 2,0 și 3,0 g, și se păș-	
trează la temperaturi sub 10°C, în cutii originale, ferite de lumină. Se agită înainte de utiliza-	
rea ca produs injectabil.	
Efectele componentilor sunt asemănătoare cu cele de la exemplul 1.	

Revendicări

1. Procedeu de obținere a unei nanodispersii uleioase, cu capacitate regenerativă a țesuturilor, **caracterizat prin aceea că** se dispersează în suportul matriceal de ulei de floarea-soarelui, pentru uz injectabil, până la o concentrație de 2,5...5,0 ppm și agitare la 300 rot/min, argint sub formă de:

a) argint coloidal cu granulație de 5...10 nm, care a fost peliculizat superficial în prealabil, cu polivinilpirolidonă, sau

b) nanoparticule de argint obținute din azotat de argint, prin precipitare cu citrat de sodiu, și stabilizate în sistem apos, în prezența polivinilpirolidonei, obținându-se nanodispersii uleioase, care se înfiolează în fiole de sticlă de 1,0, 2,0 și 3,0 g, care se păstrează la temperaturi sub 10°C, în cutii originale, ferite de lumină, care se agită înainte de utilizare ca produs injectabil.

2. Procedeu conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că**, în cazul în care se folosesc nanoparticulele de argint de la punctul b), nanodispersia apoasă de argint coloidal este obținută prin precipitarea stoichiometrică a argintului la temperatura de 60...65°C cu o soluție alcoolică de citrat de sodiu 1%, din soluție apoasă de azotat de argint 0,005%, aditivată cu polivinilpirolidonă 0,1%, ca agent de suprafață, în raport volumetric de 1:100 și sub agitare puternică la 600 rot/min, timp de 10 min.

3. Procedeu conform revendicării 2, **caracterizat prin aceea că** nanodispersia uleioasă de argint coloidal stabilizat este obținută prin redispersarea intimă în ulei de floarea-soarelui injectabil, prin agitare mecanică la 300 rot/min, timp de 15...20 min, a soluției apoase de argint coloidal, în raport volumetric de 5:1, după care se separă nanodispersia uleioasă, sub forma unei emulsii, cu ajutorul unei pâlnii de separare, iar emulsia obținută se vacuumează, sub agitare ușoară, la 0,85 atm și temperatura de 75...80°C, timp de 20...30 min.

