



(11) **RO 126534 B1**

(51) **Int.Cl.**

A61K 38/39 (2006.01),

A61L 27/24 (2006.01),

A61L 27/54 (2006.01)

(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2010 00147**

(22) Data de depozit: **17.02.2010**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30.01.2015** BOPI nr. 1/2015

(41) Data publicării cererii:
30.08.2011 BOPI nr. 8/2011

(73) Titular:

- **IODĂCHEL RADU**,
STR.JEAN LOUIS CALDERON NR.6, ET.3,
AP.14, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;
- **SÎRBU EMIL**, INTRAREA SOCULUI NR.3,
OTOPENI, IF, RO;
- **IODĂCHEL CĂTĂLIN**, STR.NOVACI
NR.11, BL.P 33, SC.2, AP.48, SECTOR 5,
BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:

- **IODĂCHEL RADU**,
STR.JEAN LOUIS CALDERON NR.6, ET.3,
AP.14, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;

• **SÎRBU EMIL**, INTRAREA SOCULUI NR.3,
OTOPENI, IF, RO;

• **IODĂCHEL CĂTĂLIN**, STR.NOVACI
NR.11, BL.P 33, SC.2, AP.48, SECTOR 5,
BUCUREȘTI, B, RO

(74) Mandatar:

RODALL S.R.L., STR. POLONĂ NR.115,
BLOC 15, SC. A, ET. 4, AP.19, SECTOR 1,
BUCUREȘTI

(56) Documente din stadiul tehnicii:

RO 110780 B; RO 110398 B

(54) **MATRICE NATURALĂ BIOACTIVĂ PELICULOGENĂ**



RO 126534 B1

Invenția se referă la o matrice naturală, peliculogenă, bioactivă, destinată utilizării ca substrat/suport biocompatibil și stimulator, obținut din tendon bovin, cu caracteristici de collagen fibrilar, nativ, tip I, pentru culturi celulare și modele funcționale, experimentale, *in vitro*, în bioingineria celulară, pentru evaluarea citotoxicității unor agenți și produse.

Este cunoscută diversitatea bioproduselor și a aplicațiilor, în special, medicale, ale collagenilor *per se* și, mai ales, prin transformarea chimică a acestora, și formarea de biocompozite cu alți biopolimeri, polimeri sintetici și alte substanțe bioactive (US 516430; 4841482). Se cunosc, de asemenea, unele producții de membrane, fire, fibre, implanturi pentru vindecarea rănilor (US 5110604; RO 83083; RO 95354; RO 110780 B; RO 118118 B1; RO 115693 B1), implanturi (US 4233360), reticulant biologic, cosmetică (US 4320201) etc.

RO 110780 B se referă la un biopreparat peliculogen cu efect protector și cicatrizant și la procedeul de obținere a acestuia. Biopreparatul peliculogen este constituit din 0,8...1,6 părți în greutate soluție 0,3...0,6% de collagen cu greutatea moleculară medie 280000...350000 și puritatea de 80...95%, 0,2...0,5 părți în greutate soluție 0,1...0,3% de glicozaminoglicani cu greutatea moleculară medie 15000...5000 și conținut în hexozamine de 20...35% și 0,002...0,010 părți în greutate glicerină, și este condiționat sub formă de pelicule sterile.

RO 110398 B se referă la un unguent cu efect regenerativ și cicatrizant, destinat utilizării în dermatologie. Unguentul conform invenției este constituit din 4...10 părți collagen cu greutatea moleculară medie 4.000...10.000, 1...5 părți condroitin sulfat, cu greutatea moleculară medie 15.000...30.000, 10...25 părți alcool cetilic, 20...40 părți vaselină farmaceutică, 10...20 părți glicerină farmaceutică, 1...10 părți tween 80, 0,1...0,5 părți nipagin, 0,05...0,3 părți nipasol și 25...60 părți apă distilată, părțile fiind exprimate în greutate.

Problema pe care o rezolvă invenția este de a realiza o matrice naturală, bioactivă, peliculogenă, ca substrat/suport stimulator al dezvoltării celulare *in vitro*.

Matricea naturală, bioactivă, peliculogenă, ca substrat/suport stimulator al dezvoltării celulare *in vitro*, este constituită din 0,6...1% extract de collagen nativ, fibrilar, nedenaturat, de tip I, cu greutate moleculară medie 400.000...500.000 și puritate 80...98%, cu sau fără adăugarea de glicerină 0,5...1%, ca plastifiant, și glutaraldehidă 0,1...0,5%, ca reticulant, sub formă de membrane cu grosimea de 0,3...1 mm.

Prin aplicarea invenției, se obțin următoarele avantaje:

- materia primă și substanțele utilizate sunt accesibile, de proveniență indigenă, iar procedeul de obținere a tipurilor de matrice membranare este simplu, economic și nepoluant (substanțele utilizate sunt, în general, produse naturale, netoxice);

- procedee simple de obținere a unei matrice collagenice, biocompatibile, cu conservarea calităților native ale proteinei structurale și implicarea pozitivă a acestora în procesele de creștere și dezvoltare celulară *in vitro*, de modelare a unor sisteme funcționale experimentale, pentru ingineria tisulară, de evaluare a biocompatibilității unor agenți și produse destinate uzului uman;

- se aplică la orice tip de celule (culturi primare, linii celulare), pentru susținerea și stimularea dezvoltării celulare și formarea de mono și multistratificări celulare, ca etapă de trecere la organizarea structurală, supracelulară.

Prezenta invenție se situează în domeniul chimiei și al aplicațiilor materialelor collagenice, și îmbogățește gama bioproduselor, dar în viziunea bioingineriei celulare și tisulare, ca matrice naturale, biocompatibile, sub formă de membrane/pelicule/filme cu rol de suport/substrat stimulator al dezvoltării celulare *in vitro* și inițierea procesului de organizare supracelulară prin mono și pluristratificare.

Collagenul (formulare generală care reunește o familie de peste 21 de tipuri) poate fi obținut din orice organism animal, dar sub aspect economic, se preferă tendoanele și pielea mamiferelor, în special, ale mamiferelor domestice, datorită prezenței în cantitate mare a acestei proteine structurale.

Prezenta invenție se bazează pe obținerea de collagen <i>ex vivo</i> , sub formă de soluție, conținând fibre și fibrile de collagen nativ, tip I, nedenaturat, neimunogen, care poate fi păstrată și utilizată <i>per se</i> sau prin reticularea cu glutaraldehidă.	1
Ca urmare, s-au luat în considerare o serie de procedee de extracție prin tratament enzimatic (US 3131130; 353037; 2934446; RO 96291), în mediu de acid acetic și purificarea prin precipitare cu clorură de sodiu. Se obține o soluție neimunogenă, cu conținut de 0,8% substanță uscată 80...98% collagen și o greutate moleculară medie de 400.000...500.000, care se conservă și se utilizează ca atare sau se folosește la asamblarea de fibrile (micropolimeri fibroși), ca bază pentru matrice naturale, condiționate în stare uscată (membrane/pelicle).	3
Fibrilele de collagen, vizualizate în microscopia electronică și scanning, sunt compuse din subunități structurale (cunoscute ca molecule de collagen) de circa 3000 Å lungime și 15 Å diametru, care conțin trei lanțuri polipeptidice cu configurație tripluhelicoidală.	5
Collagenul nativ, rezultat din purificare, se concentrează variabil (1...20 mg/ml) și soluția liberă de agregate mari se folosește <i>per se</i> , ca bază pentru matrice naturale, condiționale în stare uscată (pelicle/membrane).	7
Prepararea de membrane (pelicle) se realizează cu soluție apoasă de collagen tip I sau reticulat chimic cu glutaraldehidă 0,1...0,5%, adusă la concentrația de 0,01...10% collagen și expusă pe suprafață inertă din polietilenă. Grosimea peliculelor variază între 0,1 și 0,5 mm, iar suprafața membranelor cu rol de substrat/suport este la alegere, în funcție de dimensiunile corespunzătoare condițiilor de cultură celulară <i>in vitro</i> .	9
Se dau, în continuare, două exemple de realizare a matricei celulare, conform invenției.	11
Exemplul 1. Pentru obținerea compoziției pentru membrane din soluția stoc de collagen fibrilar, nativ, tip I, nedenaturat, obținută din tendon bovin, prin procedee biochimice, nedenaturante, se omogenizează la turații între 9.000 și 11.000 x 1000 rpm, se adaugă, treptat, apă distilată, cu reglarea unui amestec cu concentrații de 0,5...2% collagen, raporturile fiind exprimate în greutate.	13
După omogenizarea completă (aspect transparent al soluției), se scade turația aparatului la 0,3...0,1 x 1000 rpm, și se agită continuu, până la dezaerarea completă, și apoi se va turna pe suprafețe plate din polietilenă, care vor fi menținute în hotă cu flux, la circa 33°C.	15
Membranele rezultate se sterilizează la UV sau γ, apoi se ambalează în pungi din plastic, pentru menținerea condițiilor aseptice.	17
Exemplul 2. Cantitatea de soluție stoc, stabilită pentru obținerea de matrice membranare, se omogenizează, folosind o baie de abur și agitare ușoară continuă și o temperatură între 37 și 40°C. În aceste condiții, se realizează dezaerarea compoziției și relaxarea rețelei collagenice. Se amestecă cu volumul de apă distilată, calculată pentru concentrația de collagen dorită, la turație joasă (0,3...0,1 x 1.000 rpm).	19
Soluția finală, obținută prin cele două procedee, este folosită <i>per se</i> , la condiționarea membranelor cu rol de substrat, pentru culturi celulare <i>in vitro</i> . În funcție de scopul urmărit, se pot adăuga, pe parcursul procesării:	21
1. glicerina 0,5...1%, ca plastifiant, și antibiotice, antibacteriene sau alte substanțe biologice, active, la prepararea membranei sau	23
2. la aplicarea membranei prin adăugare imediată, în funcție de utilizare.	25
Altă variantă constă în transpunerea chimică a collagenului, prin reticulare cu 0,1...0,5% glutaraldehidă și prelucrarea soluției conform descrierii anterioare.	27
Față de valorile standard, recomandate pentru compoziția collagenului nativ, tip I, nedenaturat, biocompatibil, membranele se caracterizează și prin: prezența structurii fibrilare specifice, porozitate, rezistență la rupere sau tracțiune, insolubilitate sau solubilitate redusă a collagenului.	29

1

Revendicare

3

Matrice naturală, bioactivă, peliculogenă, **caracterizată prin aceea că** este constituită din 0,6...1% extract de collagen nativ, fibrilar, nedenaturat, de tip I, cu greutate moleculară medie

5

400.000...500.000 și puritate 80...98%, cu sau fără adăugarea de glicerină 0,5...1%, ca

7

plastifiant, și glutaraldehidă 0,1...0,5%, ca reticulant, sub formă de membrane cu grosimea de 0,3...1 mm.



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM
Tipărit la: Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci
sub comanda nr. 10/2015