



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2016 00786**

(22) Data de depozit: **03/11/2016**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30/07/2021** BOPI nr. **7/2021**

(41) Data publicării cererii:
30/06/2017 BOPI nr. **6/2017**

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

(72) Inventatori:
• **OPRIȚA ELENA IULIA,
STR.VALEA IALOMIȚEI NR.6, BL.C 10,
ET.9, SC.C, AP.184, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;**

• **CRACIUNESCU OANA,
BD. NICOLAE GRIGORESCU NR. 33,
BL. A1, SC. 3, AP. 33, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **MOLDOVAN LUCIA,
BD.CONSTRUCTORILOR NR.24A, BL.19,
SC.A, ET.2, AP.13, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO**

(56) Documente din stadiul tehnicii:
US 9180223 B2; US 10406261 B2

(54) **BIOMATERIAL CONDIȚIONAT SUB FORMĂ
DE HIDROGELURI ȘI PROCEDEU DE OBTINERE
A ACESTUIA**



Invenția se referă la biomateriale condiționate sub forma de hidrogeluri pe bază de componente ale matricei extracelulare (colagen, condroitin sulfat) și polizaharide (chitosan, alginat) cu acțiune în tratarea și vindecarea defectelor osteocondrale și la procedeul de obținere al acestora.

În general, defectele osteocondrale nu se limitează numai la stratul superficial al cartilajului și se extind în adâncime afectând și osul subcondral de dedesubt. Defectele osteocondrale apar frecvent datorită unor boli (osteocondrita, osteonecroze, etc) sau în urma leziunilor traumatiche ale articulațiilor. Datorită capacității limitate a organismului de a repara aceste defecte, are loc degradarea cronică și de cele mai multe ori este necesară intervenția chirurgicală (Vijayan S., Bentley G., Briggs T.W.R., Skinner J.A., Carrington R.W.J., Pollock R., Flanagan A.M., *Cartilage repair: A review of Stanmore experience in the treatment of osteochondral defects in the knee with various surgical techniques*, Indian J. Orthop 2010;44: 238-245). Grefele osteocondrale autologe sunt frecvent folosite pentru tratamentul defectelor osteocondrale, dar aceste tehnici prezintă dezavantaje, datorită dificultății de manipulare și depind de cantitatea de țesut necesară, de integritatea incompletă dintre țesutul gazdă și țesutul grefă, de degradarea țesutului grefat etc.

În ultimii ani, există un interes crescut privind realizarea de biomateriale compozite în vederea utilizării lor în repararea defectelor osteocondrale, care să înlocuiască metodele clinice tradiționale.

Se cunoaște rolul colagenului, glicozaminoglicanilor, chitosanului, alginatului și combinații ale acestora în obținerea diferitelor suporturi pentru regenerarea osului (RO 126014 B1/30.08.2013) și cartilajului (RO 130042 (A0)/27.02.2015; RO 127486 B1/29.03.2013; RO 122949 B1/28.05.2010).

Este recunoscut faptul că utilizarea suporturilor stratificate constituite din straturi multiple cu compoziții distincte pentru regenerarea unor tipuri diferite de țesut în interiorul aceluiași suport și aceeași locație anatomică (leziuni osteocondrale și ale interfețelor tendon-os) este fezabilă (Atesok și colab., 2014; WO 2014149279 A1/25.09.2014; WO 2005030726 A2/21.04.2005).

US10406261 B2/11.08.2016 descrie metode pentru producerea unei rețele de nanocompozit bifazic care cuprinde nanosfere cu nucleu acoperit pe bază de polimeri, prin atașarea fizică și chimică a două materiale polimerice disparate a căror compoziție poate fi modificată ușor cu nanomateriale specifice cu țesuturi și produse create folosind astfel de metode. Nanosferele personalizate sunt construite prin electropulverizare umedă co-axială și pot fi folosite pentru a furniza compuși la materialele polimerice.

De asemenea, este cunoscut faptul că, în ultima decada, s-au intensificat studiile de explorare privind suporturile bifazice și mulți stratificate cu rol în vindecarea osteocondrală. Levingstone și colab. (2014) au dezvoltat un nou construct care imită structura țesutului osteocondral sănătos conținând un strat de os format din colagen tip I și hidroxiapatită, un strat intermediar format din colagen tip I, colagen tip II și hidroxiapatită și o regiune cartilaginoasă formată din colagen tip I, colagen tip II și acid hialuronic. Proprietățile materialului au fost concepute pentru a oferi indiciile biologice necesare pentru a stimula infiltrarea celulelor gazdă din măduva osoasă, în timp ce proprietățile mecanice au fost proiectate pentru a oferi un mediu optimizat pentru inițierea diferențierii acestor celule în direcția celulară necesară pentru fiecare regiune.

Brevetul US 9180223 B2/10.11.2015 descrie un suport cilindric, bifazic osteocondral constituit într-un capăt dintr-un suport spiralat condrogenic constituit din cel puțin un glicozaminoglican (acid hialuronic și condroitin sulfat), iar în celălalt capăt dintr-un suport spiralat

osteogenic constituit din policaprolactone (PCL) și acid polilactic glicolic (PLGA) și material ceramic (hidroxiapatita). Fiecare suport spiralat este constituit din nanofibre a căror compoziție a fost selectată pentru a iniția fixarea și proliferarea tipurilor celulare dorite. Nanofibrele fiecărui suport spiralat sunt aliniate pentru a orienta celulele fixate astfel încât să reconstituie structura țesutului nativ.

Problema pe care o rezolvă invenția este un biomaterial condiționat sub forma de hidrogeluri, pe baza de componente ale matricei osoase și cartilaginease și polizaharide, cu capacitatea de vindecare a defectelor osteocondral și un procedeu de obținere a biomaterialului condiționat sub forma de hidrogeluri.

Biomaterialul condiționat sub forma de hidrogeluri conform invenției înlătură dezavantajele de mai sus prin aceea că este constituit dintr-un strat osos constituit din 40...80% collagen tip I, cu greutatea moleculară medie de 300...330 kDa, 20...60% chitosan și 10...40% fosfat tricalcic și un strat superficial cartilagos compus din 40...70% collagen tip II, cu greutatea moleculară medie 300...330 kDa, 10...40% alginat și 20...40% condroitin sulfat cu greutatea moleculară medie de 10...30 kDa.

Procedeu de obținere a unui biomaterial condiționat sub forma de hidrogeluri conform invenției înlătură dezavantajele de mai sus prin aceea că, un strat cartilagos obținut prin amestecarea a 20...60 părți soluție vâscoasă de collagen tip II cu concentrația 0,5...1% cu 5...20 părți soluție de alginat cu concentrația 1,5...4%, dizolvat în prealabil în apă distilată cu agitare continuă, și 10...30 părți soluție de condroitin sulfat 2...5%, amestecarea se realizează la temperatura camerei cu agitare continuă, după care se reticulează compoziția cu EDC de concentrație 10...30 mM, timp de 2...4 h, la temperatura camerei și se gelifică acest amestec prin suspendare într-o soluție de clorură de calciu 0,1 M, timp de 20...40 min la temperatura de 37°C, după care gelul obținut se spală de 2...3 ori cu tampon fosfat salin, fiecare spălare realizându-se la 37°C, timp de 24 h, se suprapune, în cantități egale, peste stratul osos (I) obținut prin amestecarea a 40...80 părți soluție vâscoasă de collagen tip I cu concentrația 0,4...1% cu 20...40 părți soluție de chitosan cu concentrația 0,5...1%, dizolvat în prealabil în acid acetic 0,2 M, cu agitare continuă și 10...30 părți fosfat tricalcic 1...8%, amestecarea se realizează la temperatura camerei cu agitare continuă, după care se reticulează compoziția cu etil dimetilaminopropil carbodiimida, 10...30 mM, timp de 2...4 h, la temperatura camerei și se gelifică acest amestec prin suspendare într-o soluție de hidroxid de sodiu 1N, timp de 20...40 min la temperatura de 4°C, după care gelul obținut se spală de 2...3 ori cu tampon fosfat salin, fiecare spălare realizându-se la 37°C, timp de 24 h și se obține astfel biomaterialul bistratificat care se sterilizează prin expunere la radiații UV timp de 8...12 h.

Prezenta invenție prezintă următoarele avantaje:

- suporturile obținute prezintă o eficiență mare în tratarea și vindecarea defectelor osteocondrale, conținând în compoziția lor componente care mimează matricea extracelulară osoasă și cartilagineasă (collagen, fosfat tricalcic, condroitin sulfat);
- adăugarea de chitosan și alginat asigură proprietăți de creștere a biocompatibilității și de formare a structurii de gel, măbind capacitatea de vindecare a țesuturilor lezate;
- condiționarea sub formă de hidrogeluri bistratificate îi conferă biomaterialului o structură tridimensională care servește ca matrice suport atât pentru celulele cartilajului (condrocite), cât și pentru cele ale osului (osteobalste);
- produsul realizează un contact strâns cu zona lezată și facilitează influxul celulelor normale din zona neafectată înconjurătoare, precum și creșterea și proliferarea acestora;
- suporturile sunt bidegradabile, biocompatibile și stabile în timp;

RO 131951 B1

1 - procedeul de obținere este fezabil și nu necesită echipamente cu grad ridicat de
complexitate.

3 Prezenta propunere de invenție se ilustrează prin următoarele exemple:

Exemplul 1

5 Etapa I:

7 Colagenul tip I a fost extras din tendon bovin prin metoda enzimatică prin utilizarea
pepsinei dizolvată în acid acetic 0,5 M (raport enzimă:țesut 1:10) timp de 48 h, apoi purificat
prin precipitare cu NaCl cristalizată și în final dializat față de apa distilată până la îndepărtarea
9 totală a sării.

11 Colagenul tip II s-a obținut din țesut traheal bovin mărunțit în prealabil, prin extracție
cu pepsina în soluție de acid acetic 0,5 M, la 4°C, timp de 48 h. Purificarea s-a realizat prin
precipitare cu NaCl cristalizată 0,7 M și în final s-a dializat excesiv față de apa distilată pentru
13 îndepărtarea urmelor de sare.

15 Etapa II:

Prepararea stratului osos (I)

17 Într-un vas de inox prevăzut cu agitator, se toarnă 400 ml soluție de collagen tip I, de
concentrație 0,5% cu greutatea moleculară medie de 300 kDa, peste care se adaugă 200 ml
soluție chitosan (1%); chitosanul s-a dizolvat în prealabil într-o soluție de acid acetic 0,2 M,
19 cu agitare continuă la temperatura camerei. Separat, într-un vas de sticlă s-a preparat o
soluție de fosfat tricalcic 5% din care s-au măsurat 40 ml care s-au adăugat peste amestecul
21 de collagen și chitosan, sub agitare intensă. Compoziția astfel obținută s-a amestecat apoi
cu agentul de reticulare constituit din etil dimetilaminopropil carbodiimida (EDC), de
23 concentrație de 10 mM, timp de 2 h, la temperatura camerei. Pentru gelifierea compoziției
obținute, acest amestec se suspenda într-o soluție de hidroxid de sodiu 1N, timp de 20 min
25 la temperatura de 4°C.

27 Ulterior gelul astfel obținut se spală cu tampon fosfat salin, timp de 24 h la tempe-
ratura de 37°C, operație care se repetă de cel puțin 2 ori.

Prepararea stratului cartilaginos (II)

29 Într-un vas de inox prevăzut cu agitator se amestecă se obține prin amestecarea a
500 ml soluție vâscoasă de collagen tip II cu concentrația 0,5% cu 40 ml soluție de alginat
31 cu concentrația 3%, dizolvat în prealabil în apă distilată, cu agitare continuă, la temperatura
camerei. Separat, într-un alt vas, se prepară 100 ml soluție de condroitin sulfat 2%, care se
33 adaugă peste compoziția de collagen și alginat, amestecarea se realizează la temperatura
camerei cu agitare continuă.

35 Amestecul astfel obținut se reticulează cu o soluție de EDC de concentrație 10 mM,
timp de 3 h, la temperatura camerei și se gelifică prin suspendare într-o soluție de clorură
37 de calciu 0,1M, timp de 30 min prin incubare la temperatura de 37°C. Gelul obținut se spală
cu tampon fosfat salin în aceleași condiții ca cele de la stratul I.

39 Într-un vas de sticlă, se toarnă mai întâi hidrogelul I, apoi se adaugă hidrogelul II, se
obține astfel biomaterialul bistratificat care se sterilizează prin expunere la radiații UV timp
41 de 8 h.

Exemplul 2

43 Se utilizează soluțiile vâscoase de collagen tip I și collagen tip II obținute ca în
exemplul 1, etapa I. Procedeul de obținere al biomaterialului stratificat și instalația necesară
45 sunt similare cu cele de la exemplul 1, cu deosebirea că stratul osos se prepară din ames-
tecarea a 500 ml soluție de collagen tip I, cu greutatea moleculară medie de 330 kDa și
47 concentrația 0,6% cu 300 ml soluție de chitosan 0,8% și 150 ml soluție de fosfat tricalcic de
concentrație 2%. Stratul cartilaginos se prepară identic cu cel de la exemplul 1. Etapele de

reticulare și gelifiere la fiecare strat în parte sunt cele prezentate în exemplul 1. În final, suporturile compozite bistratificate s-au obținut prin suprapunerea stratului cartilaginos cu stratul osos și sterilizarea acestora prin expunere la radiații UV într-o incintă de sterilizare timp de 10 h.	1 3
Hidrogelurile bistratificate obținute, conform exemplelor de mai sus, au fost analizate și caracterizate din punct de vedere al proprietăților fizico-chimice (compoziție chimică, morfologie, ultrastructură, gradul de gonflare, gradul de biodegradare și gradul de reticulare). Rezultatele au arătat că morfologia suporturile compozite sintetizate descrie o distribuție omogenă a componentelor structurale, gradul de gonflare este mai mare comparativ cu suporturile martor de collagen simplu (I și II) și chitosan, gradul de reticulare este ridicat, de aproximativ 50%, iar gradul de biodegradare al formelor reticulate a fost mai mic, comparativ cu martorii corespunzători nereticulați. Din punct de vedere al ultrastructurii, hidrogelurile osoase reticulate expun o structură compozită cu pori interconectați, cu fibrile de collagen împrăștiate în matricea de chitosan și cu particule de TCP dispuse omogen în structura hidrogelurilor, iar hidrogelurile cartilaginoase prezintă o structură mult mai poroasă cu macro și micropori interconectați. Noile variante de hidrogeluri compozite au fost testate din punct de vedere al efectului lor asupra vindecării osteocondrale folosind modele experimentale <i>in vitro</i> , respectiv teste pe culturi de osteoblaste și condrocite umane. S-au investigat: viabilitatea celulară, proliferarea, aderarea și morfologia acestora în prezența hidrogelurilor conform invenției, comparativ cu hidrogeluri ce conțin numai collagen. Rezultatele obținute au demonstrat că produsul realizat a prezentat proprietăți considerabil îmbunătățite, comparativ cu martorul de collagen, favorizând viabilitatea, proliferarea și aderarea celulelor la suport.	5 7 9 11 13 15 17 19 21 23

Revendicări

1

3

5

7

9

11

13

15

17

19

21

23

25

1. Biomaterial condiționat sub forma de hidrogeluri, **caracterizat prin aceea că**, constă dintr-un strat osos constituit din 40...80% collagen tip I, cu greutatea moleculară medie de 300...330 kDa, 20...60% chitosan și 10...40% fosfat tricalcic și un strat superficial cartilaginos compus din 40...70% collagen tip II, cu greutatea moleculară medie 300...330 kDa, 10...40% alginat și 20...40% condroitin sulfat cu greutatea moleculară medie de 10...30 kDa.

2. Procedeul de obținere al biomaterialului condiționat sub forma de hidrogeluri, **caracterizat prin aceea că**, un strat cartilaginos obținut prin amestecarea a 20...60 părți soluție vâscoasă de collagen tip II cu concentrația 0,5...1% cu 5...20 părți soluție de alginat cu concentrația 1,5...4%, dizolvat în prealabil în apă distilată cu agitare continuă, și 10...30 părți soluție de condroitin sulfat 2...5%, amestecarea se realizează la temperatura camerei cu agitare continuă, după care se reticulează compoziția cu EDC de concentrație 10...30 mM, timp de 2...4 h, la temperatura camerei și se gelifică acest amestec prin suspendare într-o soluție de clorură de calciu 0,1 M, timp de 20...40 min la temperatura de 37°C, după care gelul obținut se spală de 2...3 ori cu tampon fosfat salin, fiecare spălare realizându-se la 37°C, timp de 24 h, se suprapune, în cantități egale, peste stratul osos (I) obținut prin amestecarea a 40...80 părți soluție vâscoasă de collagen tip I cu concentrația 0,4...1% cu 20...40 părți soluție de chitosan cu concentrația 0,5...1%, dizolvat în prealabil în acid acetic 0,2 M, cu agitare continuă, și 10...30 părți fosfat tricalcic 1...8%, amestecarea se realizează la temperatura camerei cu agitare continuă, după care se reticulează compoziția cu etil dimetilaminopropil carbodiimida, 10...30 mM, timp de 2...4 h, la temperatura camerei și se gelifică acest amestec prin suspendare într-o soluție de hidroxid de sodiu 1N, timp de 20...40 min la temperatura de 4°C, după care gelul obținut se spală de 2...3 ori cu tampon fosfat salin, fiecare spălare realizându-se la 37°C, timp de 24 h și se obține astfel biomaterialul bistratificat care se sterilizează prin expunere la radiații UV timp de 8...12 h.

