



(12) **CERERE DE BREVET DE INVENȚIE**

(21) Nr. cerere: **a 2017 00641**

(22) Data de depozit: **13/09/2017**

(41) Data publicării cererii:
27/04/2018 BOPI nr. **4/2018**

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

(72) Inventatori:
• **DOBRE ANA-MARIA,
ALEEA DEALUL MĂCINULUI NR.1 BL.A44B,
SC.1, ET.3, AP.12, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **RUGINĂ ALEXANDRINA MARIA,
STR.LUICĂ NR.21, BL.7, SC.2, AP.67,
SECTOR 4, O.P.7, BUCUREȘTI, B, RO;**

• **IONIȚĂ LARISA-NICOLETA,
STR.VIRTUȚII, NR.7, BL.R3, SC.1, AP.13,
ET.4, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **TOADER ANDREEA-CĂTĂLINA-LAVINA,
DRUMUL TABEREI NR. 138, BL. 715, SC. 1,
ET. 8, AP. 23, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B,
RO;**
• **STAN LIGIA FLORENTINA,
STR.TG.NEAMȚ, NR.10, BL.TD 23, SC.1,
AP.13, ET.2, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B,
RO;**
• **IORDĂCHEL CĂTĂLIN, STR.NOVACI
NR.11, BL.P 33, SC.2, AP.48, ET.5,
SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **BRATOSIN DANIELA, STR. TRESTIANA
NR. 5, BL. 9, SC. 1, ET. 6, AP. 24,
SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO**

(54) **BIOMATERIAL CU ROL HEMOSTATIC CU APLICAȚII
MEDICALE**

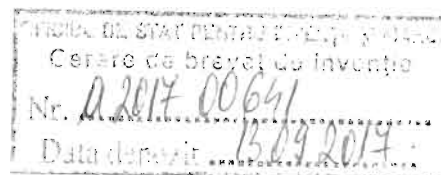
(57) **Rezumat:**

Invenția se referă la un material cu efect hemostatic, utilizat în cazul plăgilor hemoragice externe. Materialul, conform invenției, este constituit în părți de greutate din 100 părți soluție de collagen de tip I sau tip III, obținut din tendoane și piele bovină prin tratament enzimatic uzual, având o concentrație de 0,5...1% și masă moleculară medie 400000... 500000, conținând 15...40 părți din unități expirate de concentrat trombocitar

standard (0,5x10¹¹ plachete/40...60 ml plasmă) (hPL-e), eventual, 0,1...0,5% glutaraldehidă 25% ca agent de reticulare, materialul fiind sub formă de membrană cu grosimea de 0,5...1 mm.

Revendicări: 1
Figuri: 3





DESCRIEREA INVENȚIEI

Biomaterial cu rol hemostatic cu aplicații medicale

Prezenta cerere de brevet de invenție se referă la un produs hemostatic utilizabil în cazul plăgilor hemoragice externe obținut prin imobilizarea pe suport de collagen a plachetelor sanguine din Concentrat Trombocitar Standard după cele 5 zile de conservare, produsul având atât proprietăți hemostatice dar și regenerative, utilizabil pentru coagularea sângelui și cicatrizarea plăgilor tegumentare.

Problema propusă spre rezolvare de prezenta cerere de brevet de invenție constă în tratarea plăgilor hemoragice și a leziunilor dermice cauzate de acestea. Soluția oferită de prezenta cerere de brevet constă în utilizarea de plachete imobilizate pe un suport de collagen, folosind plachete obținute din unități de transfuzie din băncile de sânge aflate la sfârșitul perioadei de stocare, care nu mai sunt utilizate în transfuzii și în mod normal sunt irosite.

Folosind plachete din băncile de sânge apare avantajul major de a folosi celule care sunt deja testate pentru contaminări virale și bacteriene și au încă activitate hemostatică locală.

În practica actuală, perioada maximă de stocare pentru concentratele plachetare izolate prin afereză din sângele integral este limitată la 5 zile, perioadă în care plachetele suferă schimbări majore numite "leziuni de stocare a plachetelor", cum ar fi: activarea plachetelor cu eliberarea de granule (Fijnheer colab., 1990; Rinder *et al*, 1992; George *et al*, 1988), modificarea morfologiei (Kunicki *et al*, 1975), externalizarea fosfatidilserinei (Shapira *et al*, 2000), scăderea pH-ului plasmatic și creșterea volumului PLT (MPV). Aceste schimbări duc la un timp de supraviețuire mai scurt al plachetelor stocate, comparativ cu plachetele proaspete (Rinder *et al*, 1991; AuBuchon *et al*, 2004; Dumont *et al*, 2002; Solheim *et al*, 2004).

Datorită perioadei scurte de stocare o cantitate mare de concentrat plachetar este irosită, deoarece acestea nu pot fi utilizate după expirarea valabilității.

Nevoia de produse cu activitate hemostatică/procoagulantă apare din necesitatea de a vindeca leziunile însoțite de hemoragii, ținând cont de faptul ca o sângerare severă care nu este



tratată în mod corespunzător poate duce la moarte, controlul rapid al sângerării fiind o procedură de salvare a unei vieți.

De exemplu, s-a raportat că peste 2.500 de soldați au murit în timpul Războiului din Vietnam din cauza faptului că au sângerat până la moarte. Există de asemenea date militare, care indică faptul că în aproximativ 50% din cazuri pacienții mor din cauza hemoragiilor, la maxim 30 de minute după survenirea acestora. În plus, s-a estimat că anual, la urgențe, se prezintă peste 70 milioane de cazuri cu hemoragii. Astfel, hemoragia sau hemoragia acută reprezintă o cauză principală a decesurilor în rândul populației civile și este clar că un control rapid și eficient al acestora salvează vieți (US 2010/0158989 A1).

Variabilitatea severității leziunilor cu hemoragii justifică necesitatea diferiților agenți hemostatici, însă indiferent de statutul sau originea lor, produsele hemostatice care există în prezent, nu sunt întotdeauna eficiente (Dougnon *et al*, 2012) și se depun eforturi pentru a găsi un produs hemostatic mai bun, care ar putea îmbunătăți gestionarea hemoragiilor în toate disciplinele medicale.

În timp de mulți ani, oamenii au folosit diverse metode pentru controlarea hemoragiei și vindecarea rănilor, chiar dacă este vorba despre utilizarea cărnii crude de către egiptenii antici sau despre utilizarea plasmei uscate în timpul Primului Război Mondial (Bergel S., 1909).

Mai recent, alte tehnici au fost dezvoltate pentru controlarea hemoragiei cum ar fi: tehnicile mecanice (presiune directă, suturi, legarea cu cleme, capse, tampoane textile, tifon, bureți, componente ale sângelui/terapie de substituție), termale (electrocauterizare, bisturiu hemostatic, laser) sau chimice.

În cazul tehnicilor chimice, sunt incluse farmacoterapia (anestezia hipotensivă, epinefrina, vitamina K, protamina, desmopresina, acidul aminocaproic, acidul tranexamic); hemostatice locale (colagen, celuloza, gelatine, trombine) și materiale de etanșare și adezivi locali (etanșanți de fibrină, cleiuri sintetice), factori de coagulare ai sângelui, precum trombina după cum este arătat în US Patent 4,515,637/1985.

Unele dintre ele sunt de origine umană, animală, vegetală sau sintetică și se administrează local, pe cale orală sau prin injectare (Abaut *et al*, 2008).

Problema pe care o rezolvă prezenta invenție este obținerea unui biomaterial cu aplicații medicale sub formă de membrană biocompatibilă suplimentată cu lizat plachetar din unitățile plachetare expirate, cu rol hemostatic, de oprire a sângerărilor cutanate.



Conform invenției, biomaterialul este constituit din 100 părți soluție de collagen (tip I) obținut din tendoane bovine prin tratamentul enzimatic cunoscut și utilizat în domeniu, cu o concentrație de 0,5-1% și masa moleculară medie 400.000 – 500.000 conținând 15-40 părți din unități expirate de Concentrat Trombocitar Standard ($0,5 \cdot 10^{11}$ plachete/40-60ml plasmă) (hPL-e).

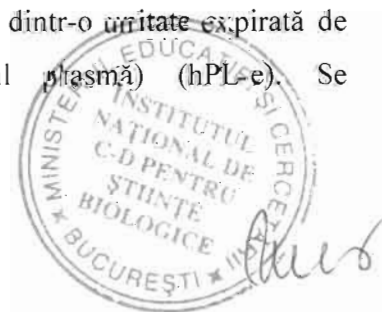
Avantajele invenției constau în următoarele:

- Prin combinarea collagenului cu un agent hemostatic activ - plachetele, sunt sporite utilitatea și eficacitatea produsului final. Produsul obținut are activitate hemostatică mare datorită imobilizării plachetelor și menține, de asemenea, beneficiile collagenului de facilitare a regenerării și cicatrizării.
- Prin folosirea plachetelor din centrele de transfuzii aflate la sfârșitul perioadei de conservare, după cum am mai menționat anterior, vom elimina riscul contaminării cu hepatită sau HIV, deoarece aceste produse sunt deja testate. Totodată, apare și avantajul costului de producție scăzut, deoarece se vor utiliza componente ce în mod normal nu mai pot fi folosite pentru transfuzii și sunt aruncate.
- Bioprodusul asigură un control rapid și eficient al hemoragiei, având capacitatea de a face un contact eficient cu suprafața leziunii datorită compoziției suportului, este sigur și ușor de manevrat și, în plus, este biodegradabil putând fi degradat și absorbit de la sine. Deoarece nu este necesară îndepărtarea lui vom elimina riscul de a afecta cheagul format și de a redeclanșa sângerarea.
- Structura este capabilă să absoarbă sângele și secrețiile leziunii, să promoveze agregarea plachetară, regenerarea țesutului lipsă și minimizarea cicatricii. Suportul de collagen are, de asemenea, efect hemostatic prin activarea factorului trombocitar și a sistemului anti-fibrinolitic cu rol în hemostază.

Se dau în continuare exemple de realizare a invenției cu titlul „*Biomaterial cu rol hemostatic cu aplicații medicale*”.

Exemplul 1

Se prepară o soluție de collagen (tip I) obținut din tendoane bovine prin tratamentul enzimatic cunoscut utilizat în domeniu, cu o concentrație de 0,5-1% și masă moleculară medie 400.000 – 500.000, pH 5,5-7,5. Într-un amestecător sau agitator planetar de laborator se amestecă 100 părți soluție collagen 0,5 – 1% și se adaugă 25 ml dintr-o unitate expirată de Concentrat Trombocitar Standard ($0,5 \cdot 10^{11}$ plachete/40-60ml plasmă) (hPL-e). Se



omogenizează timp de 2 ore. După omogenizarea completă se scade turația aparatului și se continuă agitarea până la dezaerare completă, se depun pe suprafețe plane de polietilenă sau teflon și se usucă 48 ore la 37°C. Membranele rezultate se ambalează în pungi de polietilenă și se sterilizează la UV.

Exemplul 2

Se procedează ca în exemplul de mai sus, dar amestecul se reticulează cu glutaraldehidă 0,1 – 0,5%. Se omogenizează timp de 2 ore. După omogenizarea completă se scade turația aparatului și se continuă agitarea până la dezaerare completă, se depun pe suprafețe plane de polietilenă sau teflon și se usucă 48 ore la 37°C. Membranele rezultate, sunt intens spălate cu ser fiziologic (SF), se ambalează în pungi de polietilenă și se sterilizează la UV.

Testarea bioprodusului

Pentru a testa capacitatea hemostatică a produsului, peste suporturile hemostatice obținute a fost adăugat ulterior sânge proaspăt recoltat pe heparină, după incubarea timp de 5 minute, eliminându-se prin spălare cu PBS hematiile neaderate la suport.

În toate cazurile, probele au fost analizate prin microscopie optică și electronică de scanare (SEM), toate observațiile microscopice indicând cu claritate posibilitatea utilizării plachetelor expirate din centrele de transfuzii (HPL-e) pentru obținerea unor produse cu proprietăți hemostatice. Combinarea cu un substrat de collagen le conferă în plus capacitate regenerativă și obținerea unor produse peliculare utilizabile în cazul unor leziuni hemoragice la nivelul tegumentului cu real potențial hemostatic. În plus, acesta este în măsură să furnizeze o cantitate eficientă dintr-un agent hemostatic direct la locul leziunii, cu aplicare locală. Mai mult, folosirea agenților hemostatici în suportul ce conține collagen, asigură regenerarea țesutului afectat.

În figura nr. 1 se observă aderarea hematiilor din sânge proaspăt pe membrana colagenică cu plachete expirate (hPL-e).

În figura nr. 2 se observă aderarea hematiilor din sânge proaspăt pe suportul colagenic pelicular cu plachete expirate (hPL-e) imobilizate cu glutaraldehidă.

În figura nr. 3 se observă formarea cheagului de sânge pe suportul colagenic pelicular cu plachete expirate (hPL-e) înglobate în substrat și imobilizate cu glutaraldehidă.

Adăugarea de sânge proaspăt recoltat pe heparină pe biomaterialul conținând plachete imobilizate a demonstrat atașarea hematiilor la trombocite și în concluzie, păstrarea



capacităților de participare la formarea cheagului și în consecință, a capacităților hemostatice a acestora.

Toate aceste observații microscopice indică cu claritate posibilitatea utilizării plachetelor expirate din centrele de transfuzii (HPL-e) pentru obținerea unor produse cu proprietăți hemostatice. Combinarea cu un substrat de colagen le conferă în plus capacitate regenerativă și obținerea unor produse peliculare utilizabile în cazul unor leziuni hemoragice la nivel de piele, cu real potențial hemostatic.



REVENDICĂRI

Prezenta invenție se referă la un biomaterial cu efect hemostatic, cu aplicații medicale, utilizabil în cazul plăgilor hemoragice externe, obținut prin imobilizarea pe suport de collagen a plachetelor sanguine și care se prezintă sub formă de membrane cu grosimea de 0,5 – 1mm, constituită din 100 părți soluție de collagen (tip I) sau (tip III) obținut din tendoane și piele bovină prin tratamentul enzimatic cunoscut, utilizat în domeniu, cu o concentrație de 0,5-1% și masă moleculară medie 400.000 – 500.000 conținând 15-40 părți din unități expirate de Concentrat Trombocitar Standard ($0,5 \cdot 10^{11}$ plachete/40-60ml plasmă) (hPL-e), cu sau fără adăugare de 0,1 – 0,5% glutaraldehidă 25% ca agent de reticulare.



FIGURI

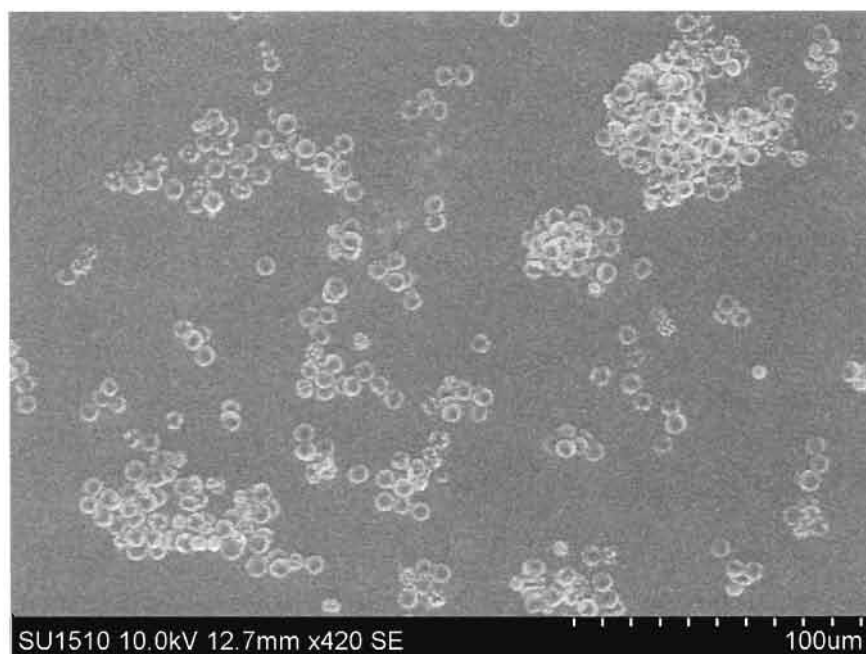


Figura 1. Analiza prin microscopie electronică de scanare a aderării hematiilor din sânge proaspăt pe membrana colagenică cu plachete expirate (hPL-e) (*testarea capacității hemostatice a plachetelor expirate*)

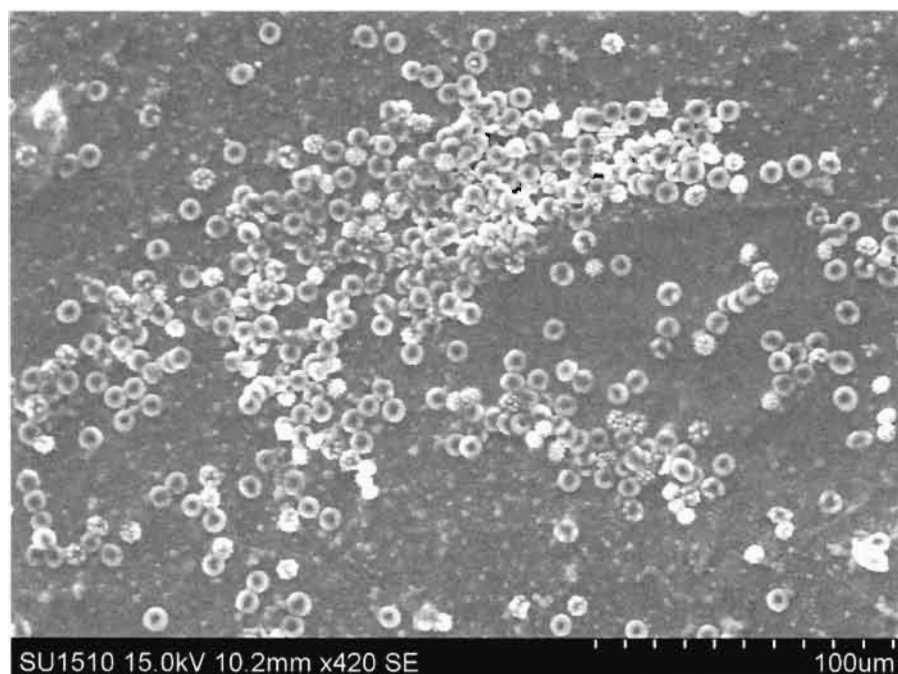


Figura 2. Analiza prin microscopie electronică de scanare a aderării hematiilor din sânge proaspăt pe suportul colagenic pelicular cu plachete expirate (hPL-e) imobilizate cu glutaraldehidă (*testarea capacității hemostatice a plachetelor expirate*)

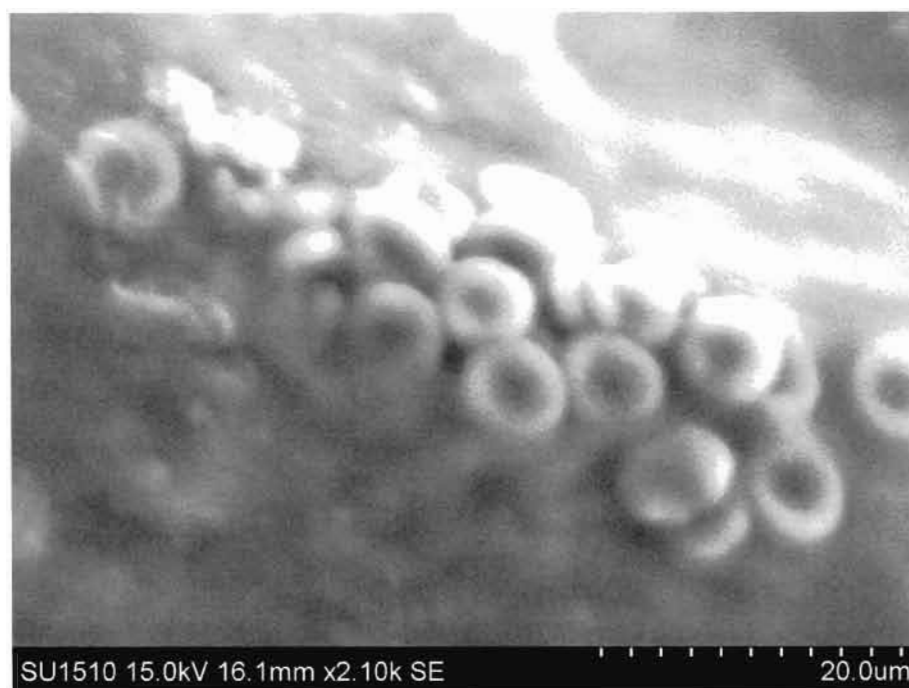


Figura 3. Analiza prin microscopie electronic[de scanare a formării cheagului de sânge pe suportul colagenic pelicular cu plachete expirate (hPL-e) înglobate în substrat și imobilizate cu glutaraldehidă (*testarea capacitatii hemostatice a plachetelor expirate*)