



(12)

## CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2009 01018

(22) Data de depozit: 04.12.2009

(41) Data publicării cererii:  
30.06.2011 BOPI nr. 6/2011

(71) Solicitant:  
• UNIVERSITATEA TEHNICĂ "GHEORGHE  
ASACHI" DIN IAȘI,  
BD.PROF.D.MANGERON NR. 67, IAȘI, IS,  
RO

(72) Inventatori:  
• MAIER STELIAN SERGIU,  
STR.FĂNTĂNILOR NR.37, BL.B2, ET.7,  
AP.69, IAȘI, IS, RO;

• MAIER VASILICA, STR.FĂNTĂNILOR  
NR.37, BL.B2, ET.7, AP.69, IAȘI, IS, RO;  
• PRUNEANU MELINDA,  
STR.VASILE LUPU NR.83, BL.D1, SC.C,  
ET.9, AP.33, IAȘI, IS, RO;  
• IGNAT CRISTINA MIHAELA,  
STR. ȘTEFAN CEL MARE NR.20, BL.32,  
SC.B, AP.14, HUȘI, VS, RO

(54) **PROCEDEU PENTRU EXTRAȚIA ȘI PURIFICAREA  
ATELOCOLAGENULUI BIOLOGIC ACTIV**

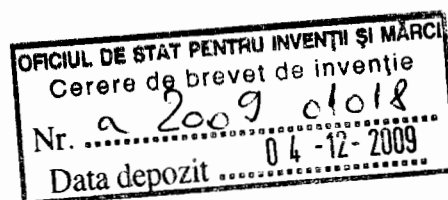
(57) Rezumat:

Prezenta invenție se referă la un procedeu pentru extracția și purificarea atelocolagenului de tip I, biologic activ, din tendoane ale călcâiului mamiferelor tinere, prin: preprocesarea tendoanelor, ca surse tisulare de collagen, prin defibrare fizico-mecanică; defibrilarea fizico-chimică a tendoanelor; solubilizarea enzimatică a atelocolagenului biologic activ; purificarea primară a atelocolagenului, incluzând un tratament alcalin pentru eliminarea eventualilor prioni; purificarea prin micro-

fibrilare; condiționarea finală a atelocolagenului biologic activ. Pe parcursul desfășurării etapelor, procedeu face apel la trei enzime diferite: tripsina, pentru eliminarea dreabriurilor celulare și tisulare, condroitinaza ABC, pentru eliminarea glicoz-amino-glicanilor, și pepsina, pentru solubilizarea collagenului prin scindarea telopeptidelor.

Revendicări: 8





## Procedeu pentru extracția și purificarea atelocolagenului biologic activ

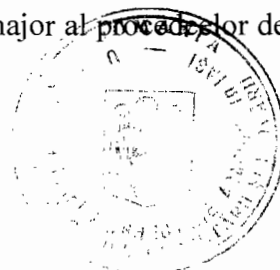
**Invenția se referă la un procedeu pentru extracția și purificarea atelocolagenului biologic activ**, caracterizat prin aceea că asigură obținerea de soluții coloidale cu înalt conținut de specii colagenice cvasi-native, capabile de renaturare după solicitări slab denaturante și apte a reconstitui structuri fibrilare similare celor din țesuturile conjunctive. În virtutea acestor proprietăți, speciile colagenice citate pot fi încorporate rapid în țesuturile vii și pot susține, *in vivo* și *in vitro*, activitatea biologică a celulelor și a lanțurilor enzimaticice specifice țesuturilor conjunctive. Procedeu descris permite obținerea unor cantități de soluții coloidale de atelocolagen biologic activ de ordinul zecilor sau sutelor de litri per șarjă, fiind aplicabil la nivel semiindustrial. **Soluțiile coloidale obținute conform procedeuului descris sunt destinate** aplicațiilor din ingineria tisulară, medicina reconstitutivă și regenerativă, chirurgia plastică și cosmetica farmaceutică, de întreținere și curativă, precum și pentru includerea în compozite utile pentru realizarea de biomateriale cu componentă scleroproteică.

Caracterul de specie scleroproteică biologic activă al atelocolagenului obținut conform procedeuului descris este asigurat prin starea minimal alterată fizico-chimic și structural a macromoleculilor colagenice, acestea aflându-se în stare unimeră sau slab multimerizată în soluția coloidală rezultată în urma extracției și purificării avansate. Fiind lipsit de tronsoanele telopeptidice care consolidează edificiul triplu helical al colagenului nativ, atelocolagenul poate suferi procese de denaturare termică și fizico-chimică, transformându-se în forme biologic inactive, lipsite de abilitatea de a se asambla supramolecular în structuri fibrilare. Procedeu descris reduce mult posibilitatea de denaturare a atelocolagenului pe durata



proceselor de obținere și de purificare, asigurând randamente ridicate în specii biologic active, chiar atunci când se lucrează în șarje cu volum ridicat, iar procesarea se extinde mult în timp.

**Din literatura de specialitate și din cea de brevete, este cunoscut faptul că** formele colagenice aparținând tipurilor I, II și III sunt admise și utile în aplicații biomedicale, farmaceutice și cosmetice [1], cu condiția respectării restricțiilor privind caracteristicile sursei tisulare [2] și a reducerii drastice a potențialului imunogenic [3]. La ora actuală, pentru obținerea de soluții coloidale ale speciilor colagenice biologic active, se practică două clase de procedee de extracție din surse tisulare: (i) solubilizarea fracției de colagen nereticulat, prezentă în țesuturile conjunctive sănătoase ori afectate de latirism indus pe cale chimică, respectiv (ii) solubilizarea hidrolitică protejată a colagenului fibrilar din structurile de agregare supramoleculară, consolidate prin punți de reticulare covalente. Prima clasă de procedee implică utilizarea unor volume ridicate de soluții ale unor electroliți salini sau slab acizi și furnizează forme colagenice intacte structural, asemănătoare tropocolagenului, dar asigură randamente de extracție reduse [4], [5]. De aceea, respectivele procedee nu sunt fezabile decât la nivel de laborator. O variantă îmbunătățită prin prisma randamentelor de extracție face apel la agenți liotropi neionici [6], dar impune lucrul cu concentrații ridicate ale acestora, fapt care crează probleme semnificative la tratarea apelor uzate. Din acest motiv nici această variantă nu este fezabilă la nivel semiindustrial. Cea de-a doua clasă de procedee implică scindarea hidrolitică a punților de reticulare intermoleculară, ori a tronsoanelor în care acestea sunt localizate, conducând întotdeauna la obținerea de forme colagenice cvasi-native, de regulă lipsite de telopeptide, numite convențional atelocolagen. Macromoleculele de atelocolagen prezintă o relativă polidispersitate a caracteristicilor compoziționale, structurale și morfologice, urmare a gradului variabil în care edificiul macromolecular le este afectat în cursul tratamentelor de scindare hidrolitică. Atunci când formele atelocolagenice au abilitatea de a se renatura, adică de a reface și menține structura triplu-helică pe întregul tronson central al macromoleculei, ele posedă un grad de cvasi-nativitate suficient pentru a deveni utile în aplicații biomedicale, farmaceutice și cosmetice, precum și în ingineria tisulară. Solubilizarea pe cale hidrolitică a macromoleculelor de atelocolagen din agregatele supramoleculare fibrilare se poate realiza utilizând agenți chimici energici, bazici și / sau reducători [7], [8], ori enzime proteolitice nespecifice colagenului [9], [10]. Accelerarea și extinderea amplitudinii proceselor hidrolitice se poate realiza prin energizare ultrasonică [11], astfel încât randamentele globale de solubilizare pot fi crescute fără diminuarea semnificativă a capacității de renaturare a atelocolagenului. Dezavantajul major al procedurilor de obținere a



atelocolagenului prin solubilizare hidrolitică rezidă în faptul că, atunci când sunt aplicate la nivel semiindustrial, oferă randamente deosebit de scăzute în forme biologice active, iar în plus, conduc la o polidispersitate ridicată a caracteristicilor macromoleculare ale atelocolagenului. Drept consecință, în vederea separării eficiente și a purificării avansate a formelor de atelocolagen biologic active, trebuie să se pornească de la volume mari de soluții coloidale astfel obținute, fapt care diminuează sever randamentele economice ale respectivelor procese.

**Problema pe care o rezolvă invenția** este legată de obținerea, în condiții de lucru la nivel semiindustrial, a unor soluții coloidale concentrate de atelocolagen biologic activ, care pot fi ușor purificate, astfel încât randamentele chimice de ansamblu ale proceselor de extracție și purificare se apropie de cele atinse la nivel de laborator, iar randamentele economice de ansamblu sunt net superioare celor asigurate de alte procedee de extracție prin solubilizarea hidrolitică a atelocolagenului.

În principiu, procedeul pentru extracția și purificarea atelocolagenului biologic activ pornind de la tendoane de bovine, procedeul care face obiectul prezentei invenții, implică parcurgerea următoarelor etape (acolo unde nu se specifică în mod expres, operațiile se efectuează la temperatura ambientală, care nu va depăși însă plaja  $15 \div 25$  °C):

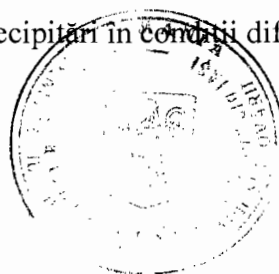
- i. - prelevarea sursei tisulare de colagen matur*, reprezentată de tendoanele călcâiului bovinelor tinere sau de tendonul flexor al degetelor piciorului de găină;
- ii. - formarea de loturi cu mase egale*, care vor parcurge apoi în paralel operațiile de preprocesare, solubilizare hidrolitică și purificare;
- iii. - tratarea loturilor cu agenți de sterilizare generală*, în vederea stopării activității microorganismelor prezente în eșantioanele de țesut; se utilizează antibiotice și / sau azidă de sodiu;
- iv. - congelarea în vederea stocării*, realizată prin imersarea în amestec crioprotector, urmată de subrăcire la  $-20$  °C;
- v. - decongelarea în vederea procesării*, prin imersare în soluție apoasă tamponată în plaja neutră sau slab alcalină;
- vi. - deshidratarea superficială controlată I*, în vederea înlesnirii curățării fasciilor epitendonare, prin menținere în amestec de săruri solide, la rece, timp de  $3 \div 5$  ore;
- vii. - îndepărtarea mecanică a fasciilor epitendonare*, prin periere energetică utilizând perii rotative cu fire din material plastic;
- viii. - spălarea cu soluție alcoolică 20 %*, în vederea îndepărtării aderențelor și a



*[Handwritten signature]*

eventualelor materii grase;

- ix. - strivirea mecanică** prin trecerea printre tamburi metalici, în vederea labilizării fasciculelor colagenice reținute în tecile epi- și endo-tenoanelor;
- x. - maturarea în stare strivită**, la rece, în vederea relaxării mecanice a țesutului;
- xi. - destructurarea mecanică prin periere**, utilizând perii rotative cu fire din oțel inoxidabil, soldată cu eliberarea fizică a fasciculelor de tendon;
- xii. - spălarea cu soluție alcoolică 20 %**, în vederea îndepărtării impurităților și a porțiunilor excesiv franjurate;
- xiii. - deshidratarea superficială controlată II**, în vederea înlesnirii defibrării chimice a fasciculelor de fibre colagenice ale tendonului, realizată prin menținere în soluție de alcool etilic, și tensioactiv neionogen biotolerabil;
- xiv - rehidratarea prin șocuri succesive hiper- și hipo-tonice**, în vederea inițierii defibrării chimice și a solubilizării componentelor necolagenice, prin tratamente repetate în soluție salină urmate de spălare abundentă în soluție de inhibitori enzimatici și antibiotice;
- xv. - solubilizarea proteinelor nestructurate și a colagenului denaturat**, prin hidroliză enzimatică utilizând o protează nespecifică;
- xvi. - eliminarea debriurilor celulare și tisulare**, prin tratament oxidant în mediu puternic acid și în prezența tensioactivilor neionogeni nondenaturanți;
- xvii. - defibrarea fizico-chimică prin relaxare tisulară sub salturi succesive de pH**, realizată prin tratarea fasciculelor de tendon, alternant, în soluții tampon cu pH-uri slab alcaline și slab acide, situate în plaja pH-ului izoelectric al colagenului;
- xviii. - eliminarea glicoz-amino-glicanilor** prin tratament enzimatic, utilizând condroitinaza ABC (EC 4.2.2.4, extrasă din *Proteus vulgaris*);
- xix. - umflarea acidă a fasciculelor de tendon**, în vederea suprahidratării și a expandării maxim posibile a structurilor colagenice fibrilare, pentru pregătirea solubilizării rapide și eficiente a colagenului;
- xx. - obținerea atelocolagenului prin solubilizare enzimatică** utilizând o protează nespecifică, de tipul pepsinei, papainei sau pronazei, aptă a scinda telopeptidele la nivelul cărora se regăsesc punțile covalente de reticulare intermoleculară în colagenul matur;
- xxi. - separarea avansată a atelocolagenului astfel obținut**, prin tehnici de precipitare selectivă, urmată de resuspendări și reprecipitări în condiții diferite, până la



izolarea fracțiilor biologice active, de interes;

**xxii. - purificarea avansată prin microfibrilare controlată**, în vederea separării efective a fracțiilor atelocolagenice capabile de restructurare;

**xxiii - resolubilizarea atelocolagenului microfibrilat**, pentru generarea de soluții coloidale cu caracteristicile impuse de gama de aplicații vizată;

**xxiv. - condiționarea biochimică finală a soluției coloidale de atelocolagen biologic activ**, în vederea stocării și / sau a pregătirii pentru utilizare în sferile ingineriei tisulare, biomedicală, farmaceuticii ori cosmeticii.

Conform prezentei invenții, stabilirea concentrației de forme biologice active în soluția atelocolagenică purificată, se realizează prin evaluarea abilității de reconstituire a edificiilor microfibrilare, precum și prin determinarea cantitativă a fracției de atelocolagen triplu-helical, apelând la tehnica legării coloranților afini pentru colagenul nativ.

Formele de atelocolagen biologic activ, obținute conform descrierii din prezenta invenție, își mențin neschimbate caracteristicile timp de cel puțin un an, dacă sunt stocate la  $4 \pm 8$  °C, în condiții sterile, la întuneric și în absența vibrațiilor ori șocurilor mecanice.

**Procedeeul de obținere a atelocolagenului biologic activ, conform prezentei invenții, prezintă următoarele avantaje:**

- asigură concentrații ale formelor atelocolagenice biologice active, triplu-helicale, de peste 92 % în soluția finală; valorile medii obținute uzual sunt de  $95 \pm 2,2$  %;
- asigură randamente masice de peste 21 %, calculate raportând substanța proteică a soluției finale la substanța proteică a sursei colagenice (tendonul de la care se pornește); valorile medii uzuale ale randamentului masic pentru procedeul descris sunt de  $24 \pm 1,8$  %;
- asigură eliminarea fracțiilor proteice necolagenice, polizaharidice și lipidice prezente în țesutul de start;
- asigură eliminarea efectelor cito-toxice ale componentelor soluției finale, făcând-o aptă utilizărilor în ingineria tisulară și în medicina regenerativă;
- asigură eliminarea efectelor imunogene, patogene și inflamatorii ale soluției finale, făcând-o aptă utilizărilor bio-medicale;
- asigură menținerea caracteristicilor formelor atelocolagenice triplu-helicale cvasi-native pe o durată de cel puțin un an, în condiții adecvate de stocare.



*[Handwritten signature]*

### Exemple de aplicare a procedurii descrise în invenție

Descrierile ce urmează au titlu exemplificativ din următoarele puncte de vedere:

- natura și cantitățile de specii chimice (reactivi și / sau adjuvanți) utilizate;
- parametrii de operare (timp, temperaturi, pH-uri, regimuri hidrodinamice ale agitării, condiții de precipitare, centrifugare, filtrare / diafiltrare, rapoartele de amestecare, modul de maturare, regimurile de termostatare);
- ordinea, cadența, repetarea proceselor și operațiilor din fluxul de procesare.

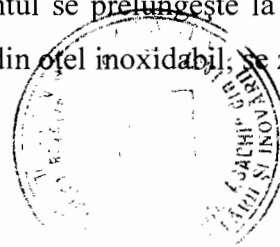
Toate elementele enumerate admit variații ce țin de preprocesarea surselor colagenice, de seriile de specii chimice utilizate (similare acțiunii, rolului și eficacității în raport cu cele incluse în descrierile exemplificative) și de plajele uzuale de lucru.

Exemplele vizează procesarea la nivel semi-industrial și industrial a tendoanelor călcâiului mamiferelor tinere, în special al bovinelor sau cabalinelor tinere (cel puțin 2 luni, pentru a avea dimensiunile minime necesare prelucrării și cel mult 18 luni, pentru a avea un conținut redus de proteine necolagenice și de structuri morfologice rezistente la hidroliză). Se preferă tendoanele *tendo calcaneus communis*, *tendo tricipitis surae*, *tendo peronei tertii*, *tendo flexoris digitorum superficialis*, *tendo flexoris digitorum lungus*. Se evită utilizarea tendoanelor puternic dezvoltate, dată fiind fracția ridicată a structurilor morfologice de tipul epi- și endo-tendoanelor. Pentru asigurarea fezabilității procesării la nivel semiindustrial, loturile medii sunt de 20 ÷ 80 kg per șarjă, funcție de dimensiunile medii ale tendoanelor prelevate. Pentru lucrul la nivel pilot, loturile medii vor reprezenta a cincea parte, iar pentru lucrul la nivel de laborator, acestea vor reprezenta a optzecea parte.

### Exemplul 1 – Obținerea soluțiilor coloidale de atelocolagen tip I, biologic activ

#### Exemplul 1.1. – Fluxul operațiilor de preprocesare a tendoanelor

Se pornește de la tendoane de mamifer tânăr, având masa totală, după prelevare, de circa 4 kg, împărțite în loturi de câte 0,5 kg, în vederea preprocesării. Acestea se supun spălării cu flotă de 400 % soluție de sare industrială, cu concentrația 5 g / L, la 16 ÷ 25 °C, timp de 30 ÷ 60 minute, prin agitare în butoi tăbăcăresc din oțel inoxidabil. Dacă se prevede stocarea tendoanelor prelevate, într-o nouă flotă salină cu aceleași caracteristici, se adaugă 0,3 g / L Na<sub>4</sub>EDTA, 10000 IU / L Penicilină G, 100 mg / L Streptomicină și 0,25 mg / L Amfotericina B complex cu polivinilpirolidonă, iar tratamentul se prelungește la 6 ore, sub agitare. După scurgerea flotei, tendoanele, depuse pe grătare din oțel inoxidabil, se zvântă prin

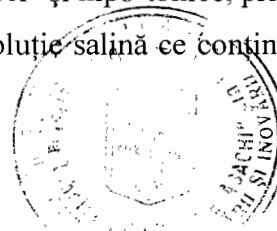


sufolare cu aer rece. În vederea stocării prin congelare, loturile de tendoane se închid sub vid, în pungi din polietilenă, alături de 100 % v/m amestec crioprotector ce conține apă : glicerină : alcool etilic în rapoartele 50 : 30 : 20, urmând a fi subrăcite la - 20 °C. În stare congelată, tendoanele astfel procesate se pot stoca 3 până la 6 luni. În vederea decongelării, loturile de tendoane se inersează în soluție de 7 g / L acetat de amoniu și se mențin la 4 °C, timp de 36 ÷ 48 ore, după care se clătesc de trei ori cu 400 % apă deionizată, iar apoi se zvântă, depuse fiind pe grătare din oțel inoxidabil, prin suflare cu aer rece.

Tendoanele zvântate se curăță de porțiunile inutile ale capetelor și se presară abundant cu un amestec solid de 30 % NaCl, 60 % Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> și 10 % acetat de amoniu, menținându-se apoi la 4 °C, timp de 3 ÷ 5 ore. În continuare, fasciile superficiale ale tendoanelor se îndepărtează prin periere cu perii rotative având fire semirigide din material plastic. Tendoanele curățate se spală apoi în 400 % flotă de 20 % alcool etilic, prin agitare timp de 30 ÷ 45 minute. Flota alcoolică se recuperează și se filtrează, în vederea utilizării în operația ulterioară. Tendoanele curățate se supun strivirii între valțuri metalice din oțel inoxidabil, sub jet de flotă alcoolică recuperată, cu recircularea acesteia din urmă. Tendoanele astfel strivite se mențin 16 ÷ 36 ore, la 4 °C, acoperite cu folie din polietilenă, iar apoi se zvântă prin suflare cu aer rece. Tendoanele zvântate se destructurează individual, prin periere energetică utilizând perii rotative cu fire de oțel inoxidabil, sub jet intens de apă răcită la 2 ÷ 5 °C. Fasciculele rezultate în urma destructurării se spală abundant cu apă deionizată, pe site din oțel inoxidabil, iar apoi se presează, se cântăresc și se suspendă în 600 % flotă de 20 % alcool etilic, menținându-se sub agitare lentă, la 4 °C, timp de 3 ÷ 6 ore. În continuare, suspensia se decantează, se filtrează pe site din oțel inoxidabil, iar fracția reținută se spală pe sită utilizând flota alcoolică recuperată, care, anterior, a fost filtrată peste filtre ceramice cu pori având diametrul echivalent de 200 microni. Aceeași soluție alcoolică se recuperează din nou, se filtrează în aceleași condiții, i se ajustează volumul la 600 % cu soluție alcoolică de 20 %, i se adaugă 1 % Triton X 100 și 0,8 % Na<sub>4</sub>EDTA și apoi în ea se introduc fasciculele destructurate din tendon, suspensia menținându-se apoi sub agitare moderată, timp de 3 ÷ 9 ore, la temperatura ambientală.

### **Exemplul 1.2. – Fluxul operațiilor de defibrare fizico-chimică**

Suspensia obținută la finalul fluxului prezentat în exemplul 1.1, se decantează, se centrifughează, iar apoi fracției solide i se aplică șocuri hiper- și hipo-tonice, prin repetarea de trei ori, sub agitare moderată, a tratamentului în 600 % soluție salină ce conține 10 % NaCl,





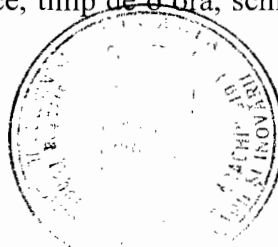
10 %  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 6 % acetat de amoniu, urmat de spălare abundentă pe site din oțel inoxidabil și agitare moderată în 600 % soluție de inhibitori enzimatici (4,5 g / L  $\text{Na}_4\text{EDTA}$  (CAS 8013-51-2), 12 g / L acid 6-amino-hexanoic (CAS 60-32-2), 0,6 g / L benzamidină (CAS 618-39-3) și 1,25 g / L N-etil-maleimidă (CAS 128-53-0)) și antibiotice (10000 IU / L Penicilina G sare de sodiu (CAS 69-57-8), 12000 IU / L Streptomicină sulfat (CAS 3810-74-0)); ambele tratamente se întind pe durata a câte 12 ore, la temperaturi de  $2 \div 8$  °C. La final, fasciculele destructurate se spală abundent pe filtru, cu jet de apă deionizată ce se încălzește progresiv, până la 37 °C.

În continuare, fasciculele destructurate se supun labilizării și curățării enzimaticice într-o flotă de 600 %, anterior preparată, ce conține  $0,05 \div 0,15$  % m / v tripsină tehnică, 4 %  $\text{NaHCO}_3$  și 0,2 %  $\text{Na}_4\text{EDTA}$ , încălzită la  $32 \div 35$  °C. Tratamentul durează  $60 \div 90$  minute, sub agitare eficientă și este urmat de o spălare abundentă pe filtru, pe durata a  $15 \div 30$  minute, utilizând apă deionizată slab acidulată la pH 5, încălzită la  $35 \div 38$  °C. Soluția slab acidă se poate recircula. La final, fasciculele destructurate se zvântă pe filtru, sub vid moderat.

În vederea eliminării debriurilor celulare, fasciculele de tendon se suspendă într-o flotă de 600 % ce conține 1,5 % acid peracetic și 2 % Triton X 100, agitându-se moderat, la  $32 \div 35$  °C, timp de 4 ore. La final, fasciculele de tendon se aduc la pH neutru, prin spălare abundentă pe filtru, urmată de agitare în flotă de 400 % tampon fosfat, la pH 7,8, timp de o oră.

În continuare, fasciculele de tendon se supun defibrării chimice sub salturi succesive de pH, agitându-le lent, alternant, câte  $3 \div 8$  ore, în 400 % soluție tampon fosfat cu pH 7,8 și apoi în 400 % soluție tampon citrat cu pH 3,4, intercalând clătiri eficiente cu apă deionizată. Se aplică  $3 \div 8$  astfel de salturi de pH, ultimul efectuându-se în tampon fosfat. După o clătire abundentă cu apă deionizată rece, fasciculele de tendon se mențin static în 600 % apă deionizată, timp de  $16 \div 24$  ore, la temperatura de  $4 \div 10$  °C.

Pentru eliminarea glicoz-amino-glicanilor, fasciculele de tendon se introduc în 600 % flotă de  $8 \div 24$  g / L acetat de amoniu, cu pH-ul corectat la  $7,3 \div 8,0$ . Temperatura flotei se aduce lent la  $32 \div 35$  °C, iar apoi se adaugă circa  $60 \div 120$  IU / L condroitinază ABC. Tratamentul se conduce pe durata a  $3 \div 6$  ore, sub agitare eficientă, urmărind menținerea constantă a valorii pH-ului flotei. La final, pentru inhibarea enzimei, în flota de tratare se adaugă  $0,2 \div 0,5$  g / L  $\text{ZnCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ , continuând agitarea încă o oră, după care fasciculele de tendon se clătesc abundent, cu 600 % apă deionizată rece, timp de o oră, schimbând flota de



A handwritten signature in black ink, consisting of stylized, cursive letters.

minimum patru ori în acest interval de timp. Din ultima flotă de clătire, fasciculele de tendon se decantează și apoi se zvântă pe filtru, sub vid moderat.

### **Exemplul 1.3. – Fluxul operațiilor de solubilizare a atelocolagenului biologic activ**

Fasciculele de collagen avansat defibrate, rezultate la finalul fluxului prezentat în exemplul 1.2, se suspendă în 1000 % soluție 0,01 M acid clorhidric chimic pur și se mențin sub agitare eficientă, la 4 °C, pe durata a 48 ÷ 72 ore, cu eventuale corecții ale pH-ului la valoarea 2,0, prin adaos de soluție 1 M acid clorhidric chimic pur. La fiecare 12 ore, suspensia vâscoasă ce rezultă se supune laminării prin trecere repetată peste site din fir de oțel inoxidabil cu ochiuri de 1,5 x 1,5 mm, urmată de filtrare repetată prin filtre ceramice cu pori având diametrul mediu de 200 microni. Filtratul acid se colectează succesiv și se reține, iar fracțiile gonflante se introduc într-o nouă flotă acidă, cu aceleași caracteristici. Reziduul rămas după ultimul tratament gonflant se îndepărtează.

Filtratele acide reunite, ce conțin forme colagenice și debriuri tisulare cu dimensiuni coloidale, se supun tratamentului enzimatic în vederea obținerii atelocolagenului. În acest sens, filtratul acid se termostatează la temperaturi între 20 și 35 °C, sub agitare lentă, i se adaugă 0,01 % azidă de sodiu, iar apoi se dozează, în fir subțire, sub agitare continuă, o soluție de 1 ÷ 2,5 g / L pepsină tehnică, într-un volum care să asigure, la final, o concentrație de 6 ÷ 18 % pepsină activă în flota de solubilizare. Tratamentul enzimatic se conduce, în condiții de termostatare și agitare eficientă, timp de 6 ÷ 36 ore, funcție de temperatura de lucru. La final, flota se laminează prin trecere repetată peste site din fir de oțel inoxidabil cu ochiuri de 1,5 x 1,5 mm, apoi se filtrează repetat prin filtre ceramice cu pori având diametrul mediu de 200 microni. Soluției coloidale rezultate în urma filtrării i se adaugă, sub agitare eficientă, 50 g / L NaCl sub formă solidă și 6 g / L tris(hidroximetil)-aminometan (CAS 77-86-1), apoi se termostatează la 4 ÷ 10 °C și se aduce la pH 7,5 prin neutralizare lentă cu soluție 4 M NaOH. După stabilizarea pH-ului, sistemul coloidal format se menține static, la 4 ÷ 10 °C, timp de 4 ÷ 12 ore, pentru precipitarea pepsinei și pentru separarea fracțiilor proteice supraagregate. La final, sistemul coloidal se decantează, reținând supernatantul, iar suspensia se filtrează, în cascadă, peste filtre ceramice cu pori având diametrul echivalent de 200, 100 și 30 microni, reținând filtratul. Supernatantului anterior separat i se aplică aceeași filtrare în cascadă, iar apoi cele două filtrate se reunesc și se supun centrifugării la 7000 g, îndepărtând sedimentul.



**Exemplul 1.4. – Fluxul operațiilor de purificare primară a atelocolagenului biologic activ**

Supernatantul rezultat la finalul fluxului prezentat în exemplul 1.3 se termostatează la  $4 \div 6$  °C, se aduce la pH 2,5, utilizând soluție 20 % HCl în apă deionizată, iar apoi i se adaugă, sub agitare eficientă, 70 g / L NaCl sub formă solidă. Suspensia formată în urma solubilizării sării se supune maturării, la  $4 \div 6$  °C, timp de  $6 \div 18$  ore, iar apoi se centrifughează la 7000 g, îndepărtând sedimentul. Supernatantul se aduce la pH 7,5 utilizând soluție 20 % NaOH și apoi i se adaugă, sub agitare eficientă, alte 30 g / L NaCl sub formă solidă. Suspensia formată se maturează și se centrifughează în aceleași condiții, reținând atât sedimentul cât și supernatantul. Din sediment se poate recupera atelocolagenul de tip III. În supernatant se adaugă, sub agitare eficientă, alte 45 g / L NaCl sub formă solidă, iar suspensia formată se maturează și se centrifughează în aceleași condiții, reținând sedimentul. În vederea izolării atelocolagenului de tip I, sedimentul se suspendă și se dizolvă în 1000 % soluție 0,1 M NaOH și 0,1 M Na<sub>4</sub>EDTA, termostată la  $4 \div 6$  °C, menținând sub agitare soluția coloidală formată, timp de  $60 \div 180$  minute. La final, soluția termostată se acidificază lent, până la pH 2,5, adăugând în picături soluție 0,5 M HCl. În aceleași condiții de termostatare, în soluția acidă se adaugă o soluție saturată de NaCl, într-un volum egal cu o treime din cel al soluției acide. Precipitatul format se supune maturării timp de  $6 \div 12$  ore la temperaturi de  $10 \div 15$  °C, în condiții statice, iar apoi se separă prin centrifugare la 7000 g, reținând sedimentul. Acesta din urmă se resuspendă în 1000 % soluție 0,01 M HCl, preparată utilizând apă deionizată liberă de pirogeni, termostată la  $4 \div 10$  °C. După completa solubilizare a atelocolagenului, soluția coloidală obținută se filtrează peste filtre sterile cu diametrul echivalent al porilor de 30 microni, iar apoi se supune diafiltrării prin membrane cu limita de trecere de 100 kDa, asigurând schimbarea a  $5 \div 9$  volume de soluție 0,01 M HCl, preparată utilizând apă deionizată liberă de pirogeni, răcită la  $4 \div 10$  °C. La final, soluția coloidală de atelocolagen biologic activ se supune maturării statice, timp de  $24 \div 36$  ore, la  $4 \div 10$  °C, în condiții sterile. După maturare, din soluția coloidală se prelevă probe în vederea stabilirii concentrației în atelocolagen și a fracției de atelocolagen cvasi-nativ, prin determinarea azotului total și respectiv pe cale polarimetrică sau fotocolorimetrică, în acest din urmă caz utilizând kit-ul SIRCOL. Funcție de concentrația efectivă în atelocolagen biologic activ, soluția purificată se aduce la un conținut de  $1,2 \div 1,6$  g / L atelocolagen cvasi-nativ, prin diluare cu soluție 0,01 M HCl preparată utilizând apă deionizată liberă de pirogeni și răcită la  $4 \div 10$  °C. La

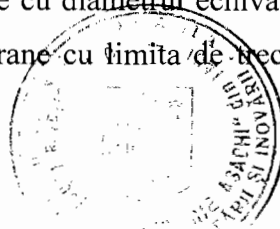


*[Handwritten signature]*

concentrațiile specificate, soluțiile astfel obținute se pot stoca, în condiții sterile, la  $4 \div 8$  °C, timp de cel puțin un an. Dacă stocarea se realizează în vase cu volume mari, de peste 50 de litri, pe durate mai lungi decât un an, la fiecare patru luni depășire se recomandă o repurificare efectuată conform descrierilor din exemplul 2.

### **Exemplul 2 – Purificarea prin microfibrilare a atelocolagenului biologic activ**

În vederea purificării avansate a soluțiilor coloidale de atelocolagen tip I, biologic activ, sau pentru repurificarea acestora după perioade de stocare ce depășesc un an, cu mai mult de patru luni, volumul de soluție avut în vedere se împarte mai întâi în porții de  $10 \div 50$  L, pentru a permite controlul precis al parametrilor de lucru. Apoi, soluția coloidală ce urmează a fi purificată avansat se termostatează la  $5 \pm 1$  °C. În continuare, prin diafiltrare, aciditatea soluției se neutralizează lent, prin schimbarea progresivă a mediului de dispersie (care inițial este soluția 0,01 M HCl) cu soluții ale aceuiași acid având însă pH-ul crescut cu câte o unitate la fiecare volum schimbat prin diafiltrare. Soluțiile utilizate se termostatează și ele la  $5 \pm 1$  °C. După ce se atinge valoarea 5 a pH-ului, mediul de dispersie se schimbă, prin diafiltrare cu tampon fosfat ( $1/15$  M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  și  $1/15$  M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) având pH-ul de  $7,6 \pm 0,2$  unități și tăria ionică de 0,183 M. În ultimul volum de tampon, tăria ionică se ridică la 0,983 M, prin adaos de soluție 330 g / L NaCl într-un volum care asigură o concentrație de 0,8 M NaCl în soluția tampon. Soluția coloidală de atelocolagen astfel condiționată chimic se supune, în condiții statice, încălzirii lente, cu o pantă de  $0,01 \div 1$  °C / minut, funcție de volumul luat în lucru, până la  $30 \pm 2$  °C, urmărind formarea flocoanelor de atelocolagen microfibrilar reconstituit. După atingerea temperaturii prescrise, sistemul coloidal se menține spre maturare statică, sub termostatare, timp de  $2 \div 8$  ore. La final, temperatura suspensiei se reduce lent, cu aceeași pantă de  $0,01 \div 1$  °C / minut, până la  $10 \pm 1$  °C. La această temperatură atelocolagenul microfibrilat se separă prin centrifugare la 7000 g, reținând sedimentul. Acesta din urmă se spală apoi, în centrifugă, cu soluție de tampon fosfat ce are pH-ul de  $7,6 \pm 0,2$  unități și tăria ionică de 1,43, similară celei anterior folosită, utilizând un volum egal cu cel al soluției coloidale de atelocolagen inițial luată în lucru. La final, sedimentul se ampastează și se resuspendă în soluție 0,01 M HCl chimic pur, preparată utilizând apă demineralizată și liberă de pirogeni, asigurându-se atingerea unui volum egal cu cel al soluției coloidale de atelocolagen inițial luată în lucru. După completa solubilizare a atelocolagenului purificat, soluția coloidală obținută se filtrează peste filtre sterile cu diametrul echivalent al porilor de 30 microni, iar apoi se supune diafiltrării prin membrane cu limita de trecere de 100 kDa,



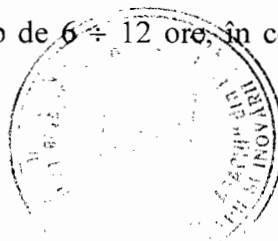
asigurând schimbarea a 5 ÷ 9 volume de soluție 0,01 M HCl, preparată utilizând apă deionizată liberă de pirogeni, răcită la 4 ÷ 10 °C.

### **Exemplul 3 – Condiționarea finală a formelor de atelocolagen biologic activ**

Funcție de gama de aplicații întrevăzută pentru atelocolagenul biologic activ, soluțiile coloidale purificate, obținute conform descrierilor din exemplul 2, sau forme derivate din acestea, se supun condiționării chimice și biochimice.

#### **Exemplul 3.1. – Condiționarea în vederea utilizării în cosmetică**

Vizează pregătirea atelocolagenului biologic activ în vederea includerii sale în hidrogeluri sau creme emoliente, sub formă dispersată sau încapsulată în lipozomi. În acest sens, se pornește de la o formă atelocolagenică derivată din soluțiile coloidale obținute conform descrierilor din exemplul 2, respectiv o pastă cu înalt conținut de apă. Aceasta se prepară prin microfibrilarea atelocolagenului biologic activ, urmând indicațiile din exemplul 2, până la spălarea sedimentului în centrifugă, cu soluție de tampon fosfat ce are pH-ul de 7,6 ± 0,2 unități și tăria ionică de 1,43. În continuare, sedimentul se separă, se depune în tăvi scunde din polipropilenă, anterior sterilizate, iar apoi se supune, în condiții sterile, vibrării cu frecvența de 30 ÷ 150 Hz și amplitudinea de 0,1 ÷ 0,5 mm, timp de 20 ÷ 60 minute, în vederea eliminării apei de imbibiție excesivă, care se îndepărtează continuu pe la un colț înclinat al tăvii. Pasta rezultată se supune maturării sub vid moderat, la 4 ÷ 10 °C, timp de 6 ÷ 12 ore, în condiții sterile. Apoi, pasta se cântărește și i se determină conținutul de substanță uscată, după care se introduce într-un malaxor steril și termostatat la 4 ÷ 10 °C, în care s-a dozat 6 ÷ 18 % glicerină pură, raportat la masa de pastă umedă. După o malaxare preliminară, în pasta omogenizată se dozează un amestec anterior preparat ce conține: 50 ÷ 80 % glicerină pură, 4 ÷ 12 % propilen glicol izostearat (CAS 32057-15-1), 9 ÷ 18 % propilen glicol dioleat (CAS 105-62-4), 10 ÷ 25 % decil-metil-sulfoxid (CAS 3079-28-5) și 1,5 ÷ 5 % 2-brom-2-nitropropan-1,3-diol (CAS 52-51-7), amestec în care cantitățile s-au calculat prin raportare la substanța uscată a pastei luată în lucru. Se aplică apoi o malaxare eficientă, în condiții de termostatare la 10 ÷ 15 °C, timp de 45 ÷ 120 minute, îndepărtând apa care se separă. Pasta rezultată se ultrasonează sub termostatare eficientă, timp de 10 ÷ 30 minute, la 22 kHz și o putere ultrasonoră de 350 W, îndepărtând și de această dată apa care se separă. La final, pasta se supune maturării sub vid moderat, la 4 ÷ 10 °C, timp de 6 ÷ 12 ore, în condiții sterile.



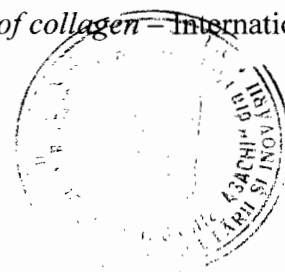
Produsul rezultat se împachetează, sub vid, în pungi din polietilenă de înaltă densitate, sterilizate anterior prin expunere la radiație ultravioletă germicidă (200 ÷ 280 nm, 200 W), timp de 15 ÷ 90 minute. Pasta se poate stoca, la temperaturi de 10 ÷ 15 °C, timp de 30 ÷ 90 de zile, iar la temperaturi pozitive de sub 5 °C și în lipsa vibrațiilor excesive, timp de cel puțin un an.

### **Exemplul 3.2. – Condiționarea în vederea utilizării în ingineria tisulară**

Vizează pregătirea soluțiilor coloidale de atelocolagen biologic activ pentru generarea de hidrogeluri și / sau de substraturi solide poroase, destinate obținerii de medii pentru cultivarea liniilor celulare umane, specifice țesuturilor conjunctive. Se realizează pornind de la soluțiile coloidale obținute conform descrierilor din exemplele 1.4 și 2, cărora li se adaugă, prin dializă sau prin diafiltrare, specii de interes biochimic în sprijinirea dezvoltării *ex vivo* a celulelor. Într-o primă etapă, soluția coloidală de atelocolagen biologic activ se termostatează la  $5 \pm 1$  °C și apoi mediul de dispersie se schimbă lent, prin diafiltrare, cu o soluție de tampon HEPES având pH-ul de  $7,5 \pm 0,3$  unități, în care s-au dozat cantități de agenți de condiționare echivalente cu 120 ÷ 160 mM NaCl, 2,5 ÷ 5,2 mM KCl, 3 ÷ 9 mM glucoză, 30 ÷ 120 mM acid ascorbic (CAS 50-81-7) și 0,5 ÷ 1,5 g / L doxicilină hclat (CAS 24390-14-5). După o maturare de 6 ÷ 18 ore, la 4 ÷ 10 °C, în soluția coloidală se adaugă, sub agitare lentă dar eficientă, cantități de agenți de condiționare biochimică, echivalente cu 0,5 ÷ 1,5 g / L hialuronat de sodiu (CAS 9067-32-7), 0,5 ÷ 1,5 g / L condroitin sulfat (CAS 9007-28-7) și 0,1 ÷ 1,0 g / L modulatori ai metabolismului celular, aleși din gama celor activi în raport cu liniile celulare ce urmează a fi cultivate. Toți agenții de condiționare se prepară anterior, în condiții sterile, utilizând apă deionizată liberă de pirogeni, la concentrațiile maxim posibile care le asigură solubilitatea. La final, soluția coloidală se supune maturării, prin menținere sub vid moderat (50 ÷ 150 Pa), la 4 ÷ 10 °C, timp de 6 ÷ 18 ore, în condiții sterile. La final, soluția coloidală se ambalează în recipiente din sticlă, anterior sterilizați și clățiți cu apă deionizată liberă de pirogeni. Sub această formă, soluțiile de atelocolagen biologic activ se pot stoca timp de cel puțin un an, la întuneric, în lipsa vibrațiilor excesive și la temperaturi de 4 ÷ 8 °C.

### **Referințe bibliografice**

1. – Lee C. H., Singla A., Lee Y – *Biomedical applications of collagen* – International Journal of Pharmaceutics, 221 (1-2), **2001**, p. 1-22.

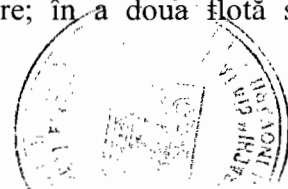


## Revendicări

### 1. *Procedeu pentru extracția și purificarea atelocolagenului biologic activ, caracterizat prin aceea că:*

- 1a.** pornește de la tendoane ale călcâiului mamiferelor tinere și include următoarele trunchiuri de flux: (i) preprocesarea tendoanelor, ca surse tisulare de colagen, (ii) defibrarea fizico-chimică a tendoanelor destructurate, dar intacte ca lungime, (iii) solubilizarea atelocolagenului biologic activ, (iv) purificarea primară a atelocolagenului biologic activ, (v) purificarea prin microfibrilare a atelocolagenului biologic activ, (vi) condiționarea finală a formelor de atelocolagen biologic activ; fiecare trunchi de flux include una sau mai multe metode de procesare, iar fiecare metodă include una sau mai multe operații specifice prelucrării surselor și formelor scleroproteice;
- 1b.** furnizează forme de atelocolagen biologic activ, cu înalt conținut de specii triplu-helicale cvasi-intacte, capabile de renaturare după solicitări slab denaturante și apte a reconstitui structuri fibrilare similare celor din țesuturile conjunctive, prin simpla modificare a parametrilor fizico-chimici ai mediului apos de dispersie;
- 1c.** furnizează forme de atelocolagen biologic activ de tipul pastelor cu aplicații cosmetice, biomedicale și farmaceutice generale, precum și de tipul soluțiilor coloidale, utilizabile în aplicații ale ingineriei tisulare, culturii celulare, refacerii tisulare ghidate, medicinei regenerative etc.;
- 1d.** permite obținerea unor cantități de paste și soluții coloidale de atelocolagen biologic activ de ordinul zecilor de kilograme și respectiv al zecilor sau sutelor de litri per șarjă, fiind aplicabil la nivel semiindustrial, asigurând randamente masice de peste 21 %, calculate raportând substanța proteică a formei finale la substanța proteică a sursei colagenice;
- 1e.** *constă în aplicarea succesivă, conform unui flux parcurs integral sau parțial, a mai multor metode de procesare, intercondiționate, care fac obiectul revendicărilor dependente de mai jos.*

### 2. *Metodă pentru preprocesarea tendoanelor călcâiului mamiferelor tinere, ca sursă colagenică primară, componentă a procedului, conform revendicării 1, caracterizată prin aceea că* tendoanele prelevate se împart în loturi de 0,5 kg, apoi se spală succesiv în două flote de 400 % sare industrială (5 g / L NaCl), la temperatura ambientală, primul tratament durând 30 ÷ 60 minute, iar al doilea 6 ore; în a doua flotă se dozează



*[Handwritten signature]*

suplimentar 0,3 g / L Na<sub>4</sub>EDTA, 10000 IU / L Penicilină G, 100 mg / L Streptomicină și 0,25 mg / L Amfotericina B complex cu polivinilpirolidonă; tendoanele spălate se zvântă și se ambalează sub vid, alături de 100 % v/m amestec apă : glicerină : alcool etilic în rapoartele 50 : 30 : 20; tendoanele astfel ambalate se stochează la - 20 °C, timp de maximum 6 luni; în vederea continuării prelucrării, loturi variabile de tendoane se decongelează prin imersare în soluții de 7 g / L acetat de amoniu, la 4 °C, se spală cu apă deionizată, se zvântă, se presară abundant cu un amestec solid de 30 % NaCl, 60 % Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> și 10 % acetat de amoniu, se curăță prin periere energetică, se spală în 400 % flotă de 20 % alcool etilic, se strivesc între valțuri metalice din oțel inoxidabil, se supun maturării la rece, iar apoi se destructurează individual prin periere cu perii rotative având fire din oțel inoxidabil, sub jet de apă rece; fasciculele destructurate ce rezultă se suspendă în 600 % flotă de 20 % alcool etilic, se separă și se spală pe filtre cu soluție 20 % alcool etilic, iar apoi se maturează 3 ÷ 9 ore, la temperatura ambientală, în 600 % flotă de 20 % alcool etilic în care s-au dozat 1 % Triton X 100 și 0,8 % Na<sub>4</sub>EDTA.

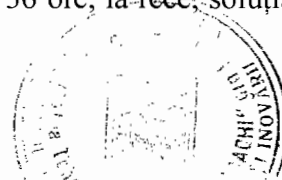
3. *Metodă pentru defibrarea chimică a fasciculelor de tendon destructurate*, componentă a procedurii, conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** fasciculele de tendon sunt supuse unor șocuri succesive, hiper- și hipo-tonice, în flote de 600 % soluție salină de 10 % NaCl, 10 % Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> și 6 % acetat de amoniu, respectiv în flote apoase de 600 %, în care s-au dozat 4,5 g / L Na<sub>4</sub>EDTA, 12 g / L acid 6-amino-hexanoic, 0,6 g / L benzamidină, 1,25 g / L N-etil-maleimidă, 10000 IU / L Penicilina G sare de sodiu și 12000 IU / L Streptomicină sulfat; ambele tratamente se întind pe durata a câte 12 ore, la temperaturi de 2 ÷ 8 °C, fiind repetate alternativ de câte trei ori; în continuare se aplică o curățare enzimatică în flotă de 600 % ce conține 0,05 ÷ 0,15 % m/v tripsină tehnică, 4 % NaHCO<sub>3</sub> și 0,2 % Na<sub>4</sub>EDTA, la 32 ÷ 35 °C, timp de 60 ÷ 90 minute, urmată de inactivarea enzimei prin spălare abundantă, pe filtru, cu soluție slab acidă caldă; în vederea eliminării debriurilor celulare, fasciculele de tendon se suspendă în 600 % flotă ce conține 1,5 % acid peracetic și 2 % Triton X 100, sub agitare, la 32 ÷ 35 °C, timp de 4 ore; fasciculele de tendon li se aplică apoi 3 ÷ 8 tratamente succesive în 400 % tampon fosfat cu pH 7,8 și în 400 % tampon citrat cu pH 3,4, pe durata a câte 3 ÷ 8 ore, intercalând clătiri eficiente; în continuare, din fasciculele de tendon se elimină glicoz-amino-glicanii, prin tratament cu 60 ÷ 120 IU / L condroitinază ABC, în flotă de 600 % în care s-au dozat





mai întâi  $8 \div 24$  g / L acetat de amoniu, iar pH-ul s-a reglat la  $7,3 \div 8,0$ ; după  $3 \div 6$  ore, enzima este inhibată adăugând  $0,2 \div 0,5$  g / L  $ZnCl_2 \cdot 2H_2O$  și apoi clătind abundant.

4. *Metodă pentru solubilizarea atelocolagenului biologic activ*, componentă a procedului, conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** fasciculele de tendon defibrate chimic se aduc în flotă de 1000 % soluție 0,01 M HCl chimic pur și se supun umflării timp de  $48 \div 72$  de ore, la  $4$  °C; suspensia vâscoasă rezultată se supune laminării și filtrării, la fiecare 12 ore, colectând filtratele și retratând fracția reținută; filtratele reunite se încălzesc la  $20 \div 35$  °C și li se adaugă 0,01 % azidă de sodiu și  $1 \div 2,5$  g / L pepsină tehnică; după o agitare lentă pe durata a  $6 \div 36$  ore, soluția coloidală rezultată se laminează și se filtrează în mod repetat, iar apoi enzima se inactivează dozând 50 g / L NaCl sub formă solidă și 6 g / L tris(hidroximetil)-aminometan; după termostatarea la  $4 \div 10$  °C, filtratul se aduce lent la pH 7,5, menținându-se spre maturare timp de  $4 \div 12$  ore; în continuare, soluția coloidală rezultată se filtrează recirculând-o, în cascadă, prin filtre având pori cu diametrul echivalent de 200, 100 și respectiv 30 micrometri; la final, filtratul se centrifughează la 7000 g, îndepărtând sedimentul.
5. *Metodă pentru purificarea atelocolagenului biologic activ, de tip I*, componentă a procedului, conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** soluția coloidală de atelocolagen se aduce la pH 2,5, sub termostatarea la  $4 \div 6$  °C, iar apoi în ea se dizolvă 70 g / L NaCl sub formă solidă; după o maturare de  $16 \div 18$  ore, la  $4 \div 6$  °C, suspensia formată se separă centrifugal la 7000 g, îndepărtând sedimentul; supernatantul se aduce la pH 7,5 și apoi i se adaugă alte 30 g / L NaCl solid, repetând maturarea și centrifugarea; în supernatant se adaugă alte 45 g / L NaCl sub formă solidă, iar după maturare și centrifugare, se reține sedimentul; acesta din urmă se suspendă în 1000 % soluție 0,1 M NaOH și 0,1 M  $Na_4EDTA$  și se menține sub agitare lentă, în regim termostatat la  $4 \div 6$  °C, timp de  $60 \div 180$  minute; apoi, soluția se acidifică lent, în etape, până la pH 2,5 și se adaugă soluție saturată de NaCl într-un volum egal cu o treime din cel al soluției acidificate; după o maturare statică, de  $6 \div 12$  ore, la  $10 \div 15$  °C, suspensia formată se separă centrifugal la 7000 g, reținând sedimentul; acesta se resuspendă în 1000 % soluție 0,01 M HCl, se filtrează prin filtre cu diametrul echivalent al porilor de 30 micrometri, apoi se diafiltrează peste membrane cu limita de trecere de 100 kDa, asigurând schimbarea a  $5 \div 9$  volume de soluție 0,01 M HCl, preparată utilizând apă deionizată și liberă de pirogeni, răcită la  $4 \div 6$  °C; după o maturare statică de  $24 \div 36$  ore, la rece, soluția se concentrează



*[Handwritten signature]*

sau se diluează, funcție de caracteristicile sale, aducându-se la un conținut de  $1,2 \div 1,6$  g / L atelocolagen biologic activ.

6. *Metodă pentru purificarea prin microfibrilare a atelocolagenului biologic activ*, componentă a procedurii, conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** soluția coloidală de atelocolagen biologic activ, anterior purificată conform revendicării 5, se termostatează la  $5 \pm 1$  °C, apoi se neutralizează lent, prin diafiltrare, schimbând mediul dispersie cu tampon fosfat având pH-ul de  $7,6 \pm 0,2$  și tăria ionică de 0,183 M; în ultimul volum schimbat tăria ionică se crește până la 0,983 M, utilizând soluție saturată de NaCl în apă deionizată liberă de pirogeni; soluția coloidală se încălzește apoi lent până la  $30 \pm 2$  °C și se maturează, în aceste condiții, timp de  $2 \div 8$  ore; apoi temperatura suspensiei formate se aduce lent până la  $10 \pm 1$  °C și se supune centrifugării, reținând sedimentul; acesta se spală în centrifugă cu tampon fosfat cu pH-ul de  $7,6 \pm 0,2$  unități, iar apoi se resuspendă în soluție 0,01 M HCl chimic pur, dizolvat în apă deionizată, liberă de pirogeni; soluția coloidală obținută se diafiltrează în condiții sterile peste membrane cu limita de trecere de 100 kDa, asigurând schimbarea a  $5 \div 9$  volume de soluție 0,01 M HCl.
7. *Metodă pentru condiționarea atelocolagenului biologic activ în vederea utilizării sale în aplicații cosmetice*, componentă a procedurii, conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** atelocolagenul biologic activ se microfibrilează urmând parțial procedura din revendicarea 6, până la obținerea sedimentului prin centrifugare; sedimentul se eliberează apoi de excesul de apă de imbibitiție, se maturează sub vid moderat, la  $4 \div 10$  °C, timp de  $6 \div 18$  ore, apoi i se adaugă, prin malaxare la rece, în condiții sterile,  $6 \div 18$  % glicerină pură și apoi un amestec ce conține  $50 \div 80$  % glicerină pură,  $4 \div 12$  % propilen glicol izostearat,  $9 \div 18$  % propilen glicol dioleat,  $10 \div 25$  % decil-metil-sulfoxid și  $1,5 \div 2,0$  % 2-brom-2-nitropropan-1,3-diol, amestec în care cantitățile s-au calculat prin raportare la substanța uscată a pastei luată în lucru; după o malaxare eficientă, la  $10 \div 15$  °C, timp de  $45 \div 120$  minute, pasta rezultată se ultrasonează timp de  $10 \div 30$  minute, la 22 kHz și la o putere ultrasonoră de 350 W; la final, pasta se maturează sub vid moderat, la rece, timp de  $6 \div 12$  ore, în condiții sterile, după care se împachetează sub vid.
8. *Metodă pentru condiționarea atelocolagenului biologic activ în vederea utilizării sale în aplicații ale ingineriei tisulare*, componentă a procedurii, conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** soluția coloidală obținută conform revendicării 6, se termostatează la  $5 \pm 1$  °C și apoi se diafiltrează în vederea schimbării mediului de



*[Handwritten signature]*

dispersie cu o soluție de tampon HEPES având pH-ul de  $7,5 \pm 0,3$  unități, în care s-au dozat  $120 \div 160$  mM NaCl,  $2,5 \div 5,2$  mM KCl,  $3 \div 9$  mM glucoză,  $30 \div 120$  mM acid ascorbic și  $0,5 \div 1,5$  g / L doxicilină hclat; după o maturare de  $6 \div 18$  ore, la  $4 \div 10$  °C, în soluția coloidală se adaugă  $0,5 \div 1,5$  g / L hialuronat de sodiu,  $0,5 \div 1,5$  g / L condroitin sulfat și  $0,1 \div 1,0$  g / L modulatori ai metabolismului celular; la final, soluția coloidală se supune maturării, sub vid moderat, la  $4 \div 10$  °C, timp de  $6 \div 18$  ore, în condiții sterile, după care se ambalează în recipiente din sticlă, anterior sterilizați.

