



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2009 01018**

(22) Data de depozit: **04.12.2009**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30.09.2015** BOPI nr. 9/2015

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

(73) Titular:
• 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.B 2, ET.7,
AP.69, IAȘI, IS, RO;
• MAIER VASILICA, STR.FĂNTĂNILOR
NR.37, BL.B 2, ET.7, AP.69, IAȘI, IS, RO;
• PRUNEANU MELINDA,
STR.VASILE LUPU NR.83, BL.D 1, 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

(56) Documente din stadiul tehnicii:
S.S.MAIER, V.MAIER, I.BUCIȘCANU,
M.PRUNEANU, "PRELUCRAREA
PRELIMINARĂ A SURSELOR
COLAGENICE ÎN VEDEREA EXTRAȚIEI
COLAGENULUI MINIMAL DENATURAT",
REV. MED. CHIR. SOC.MED. NAT.,
VOL.111, PP.544-548, IAȘI, 2007;
RO a 2007 00766 A2; US 7498412 B2;
D.J.ETHERINGTON, "THE DISSOLUTION
OF INSOLUBLE BOVINE COLLAGENS BY
CATHEPSIN B1, COLLAGENOLYTIC
CATHEPSIN AND PEPSIN. THE
INFLUENCE OF COLLAGEN TYPE, AGE
AND CHEMICAL PURITY ON
SUSCEPTIBILITY", CONNECTIVE TISSUE
RESEARCH, VOL.5, PP.135-145, 1977;
EP 1637037 A2

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



RO 126403 B1

1 Inventția se referă la un procedeu pentru extracția și purificarea atelocolagenului
biologic activ, caracterizat prin aceea că asigură obținerea de soluții coloidale cu înalt con-
3 ținut de specii colagenice cvasi-native, capabile de renaturare după solicitări slab denatu-
rante și apte a reconstitui structuri fibrilare similare celor din țesuturile conjunctive. În virtutea
5 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
7 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
9 la nivel semiindustrial. Soluțiile coloidale obținute conform procedului descris sunt destinate
aplicațiilor din ingineria tisulară, medicina reconstitutivă și regenerativă, chirurgia plastică și
11 cosmetica farmaceutică, de întreținere și curativă, precum și pentru includerea în compozite
utile pentru realizarea de biomateriale cu componentă scleroproteică.

13 Caracterul de specie scleroproteică biologic activă al atelocolagenului obținut conform
procedului descris este asigurat prin starea minimal alterată fizico-chimic și structural a
15 macromoleculelor colagenice, acestea aflându-se sub formă unimeră sau slab multimerizată
în soluția coloidală rezultată în urma extracției și purificării avansate. Fiind lipsit de tronsoanele
17 telopeptidice care consolidează edificiul triplu helical al colagenului nativ, atelocolagenul poate
suferi procese de denaturare termică și fizico-chimică, transformându-se în forme biologic
19 inactive, lipsite de abilitatea de a se asambla supramolecular în structuri fibrilare. Procedeu
descrie reduce mult posibilitatea de denaturare a atelocolagenului pe durata proceselor de
21 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.

23 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, farmaceu-
25 tice și cosmetice [Lee C. H., Singla A., Lee Y - **Biomedical applications of collagen -
International Journal of Pharmaceutics, 221 (1-2), 2001, pp. 1-22**], cu condiția respectării
27 restricțiilor privind caracteristicile sursei tisulare [Minimising the risk of transmitting animal
spongiform encephalopathy agents via human and veterinary medical products -
29 **European Pharmacopoeia, 5th edition (publicată în 15 Iunie 2004, validă din 1 ianuarie
2005), capitolul 5.2.8, p. 463-471**] și a reducerii drastice a potențialului imunogenic [Knapp
31 T. R., Luck E., Daniels J. R., **Behaviour of solubilized collaen as bioimplant - Journal
of Surgical Research, 23 (2), 1977, pp. 96-105**]. La ora actuală, pentru obținerea de soluții
33 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 țesu-
35 turile conjunctive sănătoase ori afectate de latirism indus pe cale chimică, respectiv (ii) solu-
bilizarea hidrolitică protejată a colagenului fibrilar din structurile de agregare supra-
37 moleculară, 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
39 forme colagenice intacte structural, asemănătoare tropocolagenului, dar asigură randamente
de extracție reduse [Chandrakasan G., Torchia D. A., Piez K. A. - **Preparation of Intact
41 Monomeric Collagen from Rat Tail Tendon and Skin and the Structure of the
Nonhelical Ends in solution - The Journal of Biological Chemistry, 251 (19), 1976, p.
43 6062-6067**], [Glimcher M. J., Seyer J., Brickley D. M. - **The Solubilization of Collagen
and Protein-Polysaccharides from the Developing Cartilage of Lathyrctic Chicks -
45 Biochemical Journal, 115, 1969, pp. 923-926**]. De aceea, respectivele procedee nu sunt
fezabile decât la nivel de laborator. O variantă îmbunătățită prin prisma randamentelor de
47 extracție face apel la agenți liotropi neionici [Xiong X., Ghosh R., Hiller E., Derpper F.,

Knapp B., Brunner H., Rupp S., A new procedure for rapid, high yield purification of Type I collagen for tissue engineering, *Process Biochemistry*, **44**, 2009, pp. 1200-1212], dar impune lucrul cu concentrații ridicate ale acestora, fapt care creează probleme semnificative la tratarea apelor uzate. Din acest motiv nici această variantă nu este fezabilă la nivel (semi)industrial. 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-helicală pe întregul tronson central al macromoleculii, 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 [US 4592864/1986], [US 4983721/1991], ori enzime proteolitice nespecifice colagenului [US 5316942/1994], [EP 1270672/2003]. Accelerarea și extinderea amplitudinii proceselor hidrolitice se poate realiza prin energizare ultrasonică [Li D., Mu C., Cai S., Lin W., *Ultrasonic irradiation in the enzymatic extraction of collagen - Ultrasonics Sonochemistry*, **16**, 2009, pp. 605-609], astfel încât randamentele globale de solubilizare pot fi crescute fără diminuarea semnificativă a capacității de renaturare a atelocolagenului. Dezavantajul major al procedeelelor de obținere a atelocolagenului prin solubilizare hidrolitică rezidă în faptul că, atunci când sunt aplicate la nivel (semi)industrial, 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.

O serie de tehnici și metode speciale pentru pregătirea surselor tisulare [Maier S. S., Maier V., Bucîșcanu I., Pruneanu M., *Prelucrarea preliminară a surselor colagenice în vederea extracției colagenului minimal denaturat, Revista Medico-Chirurgicală a Societății de Medici și Naturaliști din Iași*, **111** (2), 2007, pp. 544-548] și pentru izolarea [EP 1637037/2006; US 7498412/2009], solubilizarea [Etherington D. J. - *The dissolution of insoluble bovine collagens by cathepsin B1, collagenolytic cathepsin and pepsin. The influence of collagen type, age and chemical purity on susceptibility - Connective Tissue Research*, **5** (3), 1977, pp. 135-145], extragerea și purificarea [RO 123256/2011] atelocolagenului sunt descrise în literatura științifică ori de brevete. Respectivetele tehnici și metode vizează preponderent colagenul dermic, urmăresc obținerea de forme solide decelularizate, recurg la agenți chimici agresivi ori costisitori, sau implică un număr mare de specii chimice adjuvante, ceea ce impune operații speciale de izolare și purificare. De asemenea, ele fie sunt slab selective, fie includ serii lungi de operații, fapt ce conduce la randamente satisfăcătoare doar la scară mică de procesare, în general la nivel de laborator.

Problema pe care o rezolvă invenția este legată de obținerea, în condiții de lucru la nivel (semi)industrial, 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.

RO 126403 B1

- 1 În principiu, procedeul pentru extracția și purificarea atelocolagenului biologic activ
pornind de la tendoane de bovine sau de păsări, procedeu care face obiectul prezentei
3 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+25°C):
- 5 i - prelevarea sursei tisulare de colagen matur, reprezentată de tendoanele călcâiului
bovinelor tinere sau de tendonul flexor al degetelor piciorului de găină;
- 7 ii - formarea de loturi cu mase egale, care vor parcurge apoi în paralel operațiile de
preprocesare, solubilizare hidrolitică și purificare;
- 9 iii - tratarea loturilor cu agenți de sterilizare generală, în vederea stopării activității
microorganismelor prezente în eșantioanele de țesut, utilizând antibiotice și/sau azidă de
11 sodiu;
- 13 iv - congelarea în vederea stocării, realizată prin imersarea în amestec crioprotector,
urmată de subrăcire la - 20°C, sau mai jos;
- 15 v - decongelarea în vederea procesării, prin imersare în soluție apoasă tamponată
în plaja neutră sau slab alcalină;
- 17 vi - deshidratarea superficială controlată I, în vederea înlesnirii curățării fasciilor
epitendonare, prin menținere în amestec de săruri solide, la rece, timp de 3+5 h;
- 19 vii - îndepărtarea mecanică a fasciilor epitendonare, prin periere energică utilizând
perii rotative cu fire din material plastic;
- 21 viii - spălarea cu soluție alcoolică 20%, în vederea îndepărtării aderențelor și a
eventualelor materii grase;
- 23 ix - strivirea mecanică prin trecerea printre tamburi metalici, în vederea labilizării
fasciculelor colagenice reținute în tecile epi- și endo-tenoanelor;
- 25 x - maturarea în stare strivită, la rece, în vederea relaxării mecanice a țesutului;
- 27 xi - destructurarea mecanică prin periere, utilizând perii rotative cu fire din oțel
inoxidabil, soldată cu eliberarea fizică a fasciculelor de tendon;
- 29 xii - spălarea cu soluție alcoolică 20%, în vederea îndepărtării impurităților și a
porțiunilor excesiv franjurate;
- 31 xiii - deshidratarea superficială controlată II, în vederea înlesnirii defibrării chimice a
fasciculelor de fibre colagenice ale tendonului, realizată prin menținere în soluție de alcool
etic, și tensioactiv neionogen biotolerabil;
- 33 xiv - rehidratarea prin șocuri succesive hiper- și hipo-tone, 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;
- 35 xv - solubilizarea proteinelor nestructurate și a colagenului denaturat, prin hidroliză
enzimatică utilizând o protează nespecifică;
- 37 xvi - eliminarea debriurilor celulare și tisulare, prin tratament oxidant în mediu puternic
acid și în prezența tensioactivilor neionogeni nondenaturanți;
- 39 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
41 alcaline și slab acide, situate în plaja pH-ului izoelectric al colagenului;
- 43 xviii - eliminarea glicoz-amino-glicanilor prin tratament enzimatic, utilizând
condroitinaza ABC (EC 4.2.2.4, extrasă din *Proteus vulgaris*);
- 45 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;
- 47 xx - obținerea atelocolagenului prin solubilizare enzimatică utilizând o protează
nespecifică, de tipul pepsinei, papainei sau pronazei, aptă a scinda telopeptidele la nivelul
49 cărora se regăsesc punțile covalente de reticulare intermoleculară în colagenul matur;

RO 126403 B1

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;	1
xxii - purificarea avansată prin microfibrilare controlată, în vederea separării efective a fracțiilor atelocolagenice capabile de restructurare;	3
xxiii - resolubilizarea atelocolagenului microfibrilat, pentru generarea de soluții coloidale cu caracteristicile impuse de gama de aplicații vizată;	7
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.	9
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.	11
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÷8°C, în condiții sterile, la întuneric și în absența vibrațiilor ori șocurilor mecanice intense.	13
Prezenta invenție descrie un procedeu pentru extracția și purificarea atelocolagenului biologic activ, aplicabil tendoanelor mamiferelor tinere, ce constă în parcurgerea succesivă a următoarelor șase etape: (i) preprocesarea tendoanelor, ca surse tisulare de colagen, (ii) defibrarea avansată a tendoanelor anterior destructurate mecanic și decapate enzimatic și chimic, (iii) solubilizarea enzimatică a atelocolagenului biologic activ, (iv) purificarea primară a atelocolagenului biologic activ, (v) purificarea avansată a atelocolagenului biologic activ, (vi) condiționarea finală a formelor de atelocolagen biologic activ, funcție de aplicația vizată, caracterizat prin aceea că:	15
- preprocesarea tendoanelor se realizează în următoarea succesiune: destructurare mecanică, deshidratare controlată, rehidratare prin șocuri succesive hiper- și hipo-tone, decaparea enzimatică a fasciculelor de fibre colagenice prin hidroliza proteinelor nefibrilare și a formelor denaturate, decaparea chimică a fasciculelor de fibre colagenice prin eliminarea debriurilor celulare și a speciilor biochimice mic-moleculare, în mediu acid oxidant și în prezența tensioactivilor;	17
- defibrarea avansată a tendoanelor se realizează pe cale fizico-chimică, prin salturi succesive de pH în raport cu pH-ul izoelectric al colagenului nativ, pentru a rupe legăturile de hidrogen înalt ordonate din structura fibrelor colagenice;	19
- purificarea avansată a atelocolagenului biologic activ se realizează prin microfibrilare, proces care selectează doar macromoleculele de atelocolagen intacte și capabile de agregare supramoleculară ordonată, separându-le de formele denaturate ori afectate de hidroliză la nivelul domeniului triplu helical.	21
Procedeu de obținere a atelocolagenului biologic activ, conform prezentei invenții, prezintă următoarele avantaje:	23
- asigură concentrații ale formelor atelocolagenice biologice active, triplu-helicale, de peste 92% în soluția finală; valorile medii obținute uzual sunt de 95 ± 2,2%;	25
- 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 ± 1,8%;	27
- asigură eliminarea fracțiilor proteice necolagenice, polizaharidice și lipidice prezente în țesutul de start;	29

RO 126403 B1

- 1 - asigură eliminarea efectelor cito-toxice ale componentelor soluției finale, făcând-o
aptă utilizărilor în ingineria tisulară și în medicina regenerativă;
- 3 - asigură eliminarea efectelor imunogene, patogene și inflamatorii ale soluției finale,
făcând-o aptă utilizărilor biomedicale;
- 5 - asigură menținerea caracteristicilor formelor atelocolagenice triplu-helicale cvasi-
native pe o durată de cel puțin un an, în condiții adecvate de stocare.
- 7 **Exemple de aplicare a procedurii descrise în invenție**
Descrierile ce urmează au titlu exemplificativ din următoarele puncte de vedere:
- 9 - natura și cantitățile de specii chimice (reactivi și/sau adjuvanți) utilizate;
- parametrii de operare (timp, temperaturi, pH-uri, regimuri hidrodinamice ale agitării,
11 condiții de precipitare, centrifugare, filtrare/diafiltrare, rapoartele de amestecare, modul de
maturare, regimurile de termostatare);
- 13 - ordinea, cadența, repetarea proceselor și operațiilor din fluxul de procesare.
Toate elementele enumerate admit variații ce țin de preprocesarea surselor
15 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.
- 17 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,
19 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).
21 Se preferă tendoanele *tendo calcaneus communis*, *tendo tricipitis surae*, *tendo peronei tertii*,
tendo flexoris digitorum superficialis, *tendo flexoris digitorum lungus*. Se evită utilizarea
23 tendoanelor puternic dezvoltate, dată fiind fracția ridicată a structurilor morfologice de tipul
epi- și endo-tenoanelor. Pentru asigurarea fezabilității procesării la nivel semiindustrial,
25 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
27 lucrul la nivel de laborator, acestea vor reprezenta a optzecea parte.
- Exemplul 1. Obținerea soluțiilor coloidale de atelocolagen tip I, biologic activ.**
- 29 **Exemplul 1.1. Fluxul operațiilor de preprocesare a tendoanelor.**
Se pornește de la tendoane de mamifer tânăr, având masa totală, după prelevare,
31 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 de 5 g/L, la 16÷25°C, timp
33 de 30÷60 min, 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
35 Na₄EDTA, 10000 IU/L Penicilină G, 100 mg/L Streptomycină și 0,25 mg/L Amfotericină B
complex cu polivinilpirolidonă, iar tratamentul se prelungește la 6 h, sub agitare. După scurge-
37 rea floței, tendoanele, depuse pe grătare din oțel inoxidabil, se zvântă prin suflare cu aer rece,
filtrat. În vederea stocării prin congelare, loturile de tendoane se închid sub vid, în pungi din
39 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
41 procesate se pot stoca 3 până la 6 luni. În vederea decongelării, loturile de tendoane se
imersază în soluție de 7 g/L acetat de amoniu și se mențin la 4°C, timp de 36÷48 h, după
43 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, filtrat.
- 45 Tendoanele zvântate se curăță de porțiunile inutile ale capetelor și se presară
abundent cu un amestec solid de 30% NaCl, 60% Na₂SO₄ și 10% acetat de amoniu,
47 menținându-se apoi la 4°C, timp de 3÷5 h. În continuare, fasciile superficiale ale tendoanelor
se îndepărtează prin periere cu perii rotative având fire semirigide din material plastic.

RO 126403 B1

Tendoanele curățate se spală apoi în 400% flotă de 20% alcool etilic, prin agitare timp de 30÷45 min. 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 h, la 4°C, acoperite cu folie din polietilenă, iar apoi se zvântă prin suflare cu aer rece, filtrat. Tendoanele zvântate se destructurează individual, prin periere energetică, utilizând perii rotative cu fire din oțel inoxidabil, sub jet intens de apă răcită la 2÷5°C. Fasciculele rezultate în urma de structurării 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 h. 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% Na₄EDTA și apoi în ea se introduc fasciculele de structurate din tendon, suspensia menținându-se sub agitare moderată, timp de 3÷9 h, 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-tone, prin repetarea de trei ori, sub agitare moderată, a tratamentului în 600% soluție salină ce conține 10% NaCl, 10% Na₂SO₄, 6% acetat de amoniu, urmat de spălare abundantă pe site din oțel inoxidabil și agitare moderată în 600% soluție de inhibitori enzimatici (4,5 g/L Na₄EDTA (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 Penicilină G sare de sodiu (CAS 69-57-8), 12000 IU/L Streptomycină sulfat (CAS 3810-74-0)); ambele tratamente se întind pe durata a câte 12 h, la temperaturi de 2÷8°C. La final, fasciculele de structurate se spală abundant pe filtru, cu jet de apă deionizată ce se încălzește progresiv, până la 37°C.

În continuare, fasciculele de structurate se supun labilizării și curățării enzimactice într-o flotă de 600%, anterior preparată, ce conține 0,05÷0,15% m/v tripsină, 4% NaHCO₃ și 0,2% Na₄EDTA, încălzită la 32÷35°C. Tratamentul durează 60÷90 min, sub agitare eficientă și este urmat de o spălare abundantă pe filtru, pe durata a 15÷30 min, utilizând apă deionizată slab acidulată la pH 5, încălzită la 35÷38°C. Soluția slab acidă se poate recircula. La final, fasciculele de structurate se zvântă pe filtru ceramic, 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÷35°C, timp de 4 h. La final, fasciculele de tendon se aduc la pH neutru, prin spălare abundantă pe filtru ceramic, urmată de agitare în flotă de 400% tampon fosfat, la pH 7,8, timp de 1 h.

În continuare, fasciculele de tendon se supun defibrării chimice sub salturi succesive de pH, agitându-le lent, alternant, câte 3÷8 h, 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÷9 astfel de salturi de pH, ultimul efectuându-se în tampon fosfat. După o clătire abundantă cu apă deionizată rece, fasciculele de tendon se mențin static în 600% apă deionizată, timp de 16÷24 h, la temperatura de 4÷10°C.

Pentru eliminarea glicoz-amino-glicanilor, fasciculele de tendon se introduc în 600% flotă de 8÷24 g/L acetat de amoniu, cu pH-ul corectat la 7,3÷8,0. Temperatura flotei se aduce lent la 32÷35°C, iar apoi se adaugă 60÷120 IU/L condroitinază ABC. Tratamentul se conduce

RO 126403 B1

1 pe durata a 3÷6 h, sub agitare eficientă, urmărind menținerea constantă a valorii pH-ului
2 flotei. La final, pentru inhibarea enzimei, în flota de tratare se adaugă 0,2÷0,5 g/L ZnCl₂·2
3 H₂O, continuând agitare încă o oră, după care fasciculele de tendon se clătesc abundant,
4 cu 600% apă deionizată rece, timp de 1 h, schimbând flota de minimum patru ori în acest
5 interval de timp. Din ultima flotă de clătire, fasciculele de tendon se decantează și apoi se
6 zvântă pe filtru ceramic, sub vid moderat.

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

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

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

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

37 Supernatantul rezultat la finalul fluxului prezentat în exemplul 1.3 se termostatează
38 la 4÷6°C, se aduce la pH 2,5, utilizând soluție 20% HCl în apă deionizată, iar apoi i se
39 adaugă, sub agitare eficientă, 70 g/L NaCl sub formă solidă. Suspensia formată în urma
40 solubilizării sării se supune maturării, la 4÷6°C, timp de 6÷18 h, iar apoi se centrifughează
41 la 7000 g, îndepărtând sedimentul. Supernatantul se aduce la pH 7,5 utilizând soluție 20%
42 NaOH și apoi i se adaugă, sub agitare eficientă, alte 30 g/L NaCl sub formă solidă.
43 Suspensia formată se maturează și se centrifughează în aceleași condiții, reținând atât
44 sedimentul, cât și supernatantul. Din sediment se poate recupera atelocolagenul de tip III.
45 În supernatant se adaugă, sub agitare eficientă, alte 45 g/L NaCl sub formă solidă, iar sus-
46 pensia formată se maturează și se centrifughează în aceleași condiții, reținând sedimentul.
47 În vederea izolării atelocolagenului de tip I, sedimentul se suspendă și se dizolvă în 1000%
soluție 0,1 M NaOH și 0,1 M Na₄EDTA, termostată la 4÷6°C, menținând sub agitare soluția

RO 126403 B1

coloidală formată, timp de 60÷180 min. La final, soluția termostată se acidifică lent, până la pH 2,5, adăugând în picături soluție 0,5÷1,0 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÷12 h la temperaturi de 10÷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÷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÷9 volume de soluție 0,01 M HCl, preparată utilizând apă deionizată liberă de pirogeni, răcită la 4÷10°C. La final, soluția coloidală de atelocolagen biologic activ se supune maturării statice, timp de 24÷36 h, la 4÷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 kitul SIRCOL®. În funcție de concentrația efectivă în atelocolagen biologic activ, soluția purificată se aduce la un conținut de 1,2÷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÷10°C. La concentrațiile specificate, soluțiile astfel obținute se pot stoca, în condiții sterile, la 4÷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 decât patru luni, volumul de soluție avut în vedere se împarte mai întâi în porții de 5÷50 L, pentru a permite controlul precis al parametrilor de lucru. Apoi, soluția coloidală ce urmează a fi purificată avansat se termostatează la $5 \pm 1^\circ\text{C}$. 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 aceleiași acid având însă pH-ul crescut cu câte o unitate la fiecare volum schimbat prin diafiltrare. Soluțiile utilizate se termostatează și ele la $5 \pm 1^\circ\text{C}$. După ce se atinge valoarea 5 a pH-ului, mediul de dispersie se schimbă, prin diafiltrare cu tampon fosfat (1/15 M Na_2HPO_4 și 1/15 M KH_2PO_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 $0,01 \pm 1^\circ\text{C}/\text{min}$, funcție de volumul luat în lucru, până la $30 \pm 2^\circ\text{C}$, urmărind formarea flocoanelor de atelocolagen microfibrilar reconstituit. După atingerea temperaturii prescrise, sistemul coloidal se menține spre maturare statică, sub termostatare, timp de 2÷8 h. La final, temperatura suspensiei se reduce lent, cu aceeași pantă de $0,01 \pm 1^\circ\text{C}/\text{min}$, până la $10 \pm 1^\circ\text{C}$. 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 luat 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 luat în lucru. După completa solubilizare a atelocolagenului purificat, soluția coloidală

RO 126403 B1

1 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
3 a 5÷9 volume de soluție 0,01 M HCl, preparată utilizând apă deionizată liberă de pirogeni,
răcită la 4÷10°C și sterilizată prin ultrafiltrare.

5 **Exemplul 3. Condiționarea finală a formelor de atelocolagen biologic activ.**

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

9 **Exemplul 3.1. Condiționarea în vederea utilizării în cosmetică.**

Vizează pregătirea atelocolagenului biologic activ în vederea includerii sale în hidro-
11 geluri 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
13 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
15 la spălarea sedimentului în centrifugă, cu soluție de tampon fosfat ce are pH-ul de $7,6 \pm 0,2$
unități și tăria ionică de 1,43. În continuare, sedimentul se separă, se depune în tăvi scunde
17 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 min, în vederea
19 eliminării apei de imbițiție 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 h, în
21 condiții sterile. Apoi, pasta se cântărește și 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
23 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
25 pură, 4÷12% propilenglicol izostearat (CAS 32057-15-1), 9÷18% propilenglicol dioleat (CAS
105-62-4), 10÷25% decil-metil-sulfoxid (CAS 3079-28-5) și 1,5÷5% 2-brom-2-nitropropan-
27 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
29 la 10÷15°C, timp de 45÷120 min, îndepărtând apa care se separă. Pasta rezultată se
ultrasonoează sub termostatare eficientă, timp de 10÷30 min, la 22 kHz și o putere ultrasonoră
31 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 h, în condiții sterile. Produsul rezultat se
33 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 min. Pasta
35 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.

37 **Exemplul 3.2. Condiționarea în vederea utilizării în ingineria tisulară.**

Vizează pregătirea soluțiilor coloidale de atelocolagen biologic activ pentru generarea
39 de hidrogeluri și/sau de substraturi solide poroase, destinate obținerii de medii pentru
cultivarea celulelor și liniilor celulare umane, specifice țesuturilor conjunctive. Se realizează
41 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
43 *ex vivo* a celulelor. Într-o primă etapă, soluția coloidală de atelocolagen biologic activ se
termostatează la $5 \pm 1^\circ\text{C}$ și apoi mediul de dispersie se schimbă lent, prin diafiltrare, cu o
45 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,
47 30÷120 mM acid ascorbic (CAS 50-81-7) și 0,5÷1,5 g/L hclat de doxiciclină (CAS 24390-14-
5). După o maturare de 6÷18 h, la 4÷10°C, în soluția coloidală se adaugă, sub agitare lentă

RO 126403 B1

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 celulele sau 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. În continuare, soluția coloidală se supune maturării, prin menținere sub vid moderat (50÷150 Pa), la 4÷10°C, timp de 6÷18 h, în condiții sterile. La final, soluția coloidală se ambalează în recipiente din sticlă, anterior sterilizate și clătite cu apă deionizată sterilă, 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.

RO 126403 B1

Revendicări

1

3

1. Procedeu pentru extracția și purificarea atelocolagenului biologic activ, care se aplică tendoanelor mamiferelor tinere și constă în parcurgerea succesivă a următoarelor șase etape:

5

- preprocesarea tendoanelor, ca surse tisulare de colagen;

7

- defibrarea avansată a tendoanelor anterior destructurate mecanic și decapate enzimatic și chimic;

9

- solubilizarea enzimatică a atelocolagenului biologic activ;

- purificarea primară a atelocolagenului biologic activ;

11

- purificarea avansată a atelocolagenului biologic activ;

- condiționarea finală a formelor de atelocolagen biologic activ, în funcție de aplicația

13

vizată, **caracterizat prin aceea că:**

15

- preprocesarea tendoanelor se realizează în următoarea succesiune: destructurare mecanică, deshidratare controlată, rehidratare prin șocuri succesive hiper- și hipo-tone, decaparea enzimatică a fasciculelor de fibre colagenice prin hidroliza proteinelor nefibrilare și a formelor denaturate, decaparea chimică a fasciculelor de fibre colagenice prin eliminarea debriurilor celulare și a speciilor biochimice mic-moleculare, în mediu acid oxidant și în prezența tensioactivilor;

19

- defibrarea avansată a tendoanelor se realizează pe cale fizico-chimică, prin salturi succesive de pH în raport cu pH-ul izoelectric al colagenului nativ, pentru a rupe legăturile de hidrogen înalt ordonate din structura fibrelor colagenice;

21

- purificarea avansată a atelocolagenului biologic activ se realizează prin microfibrilare, proces care selectează doar macromoleculele de atelocolagen intacte și capabile de agregare supramoleculară ordonată, separându-le de formele denaturate ori afectate de hidroliză la nivelul domeniului triplu helical.

23

25

27

2. Procedeu conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că**, în etapa de preprocesare a tendoanelor, acestea se împart în loturi egale, apoi se spală în flote de saramură, la temperatura ambientală, în prezența unui agent de chelatare a ionilor grei și a unui amestec de antibiotice; tendoanele spălate se zvântă și se ambalează sub vid, în 100% v/m amestec apă:glicerină:alcool etilic în rapoartele 50:30:20; tendoanele astfel ambalate se congelează 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% Na₂SO₄, 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 cu 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 h, la temperatura ambientală, în 600% flotă de 20% alcool etilic în care s-au dozat 1% Triton X 100 și 0,8% Na₄EDTA.

29

31

33

35

37

39

41

43

3. Procedeu conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că**, pentru defibrarea chimică a fasciculelor de tendon anterior destructurate, acestea sunt supuse unor șocuri succesive, hiper- și hipo-tone, în flote de 600% soluție salină de 10% NaCl, 10% Na₂SO₄, și 6% acetat de amoniu, respectiv, în flote apoase de 600%, în care s-au dozat agenți de chelatare a ionilor grei, inhibitori ai activității enzimatică a proteazelor și un amestec de antibiotice; ambele tratamente se întind pe durata a câte 12 h, la temperaturi de 2÷8°C, fiind repetate alternativ de câte trei ori; după o spălare eficientă, se continuă cu o decapare enzimatică în

45

47

RO 126403 B1

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100

flotă de 600% ce conține 0,05÷0,15% m/v tripsină, 4% NaHCO₃ și 0,2% Na₄EDTA, la 32÷35°C, timp de 60÷90 min, urmată de inactivarea enzimei prin spălare abundentă, 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 h; fasciculelor de tendon li se aplică apoi 3÷9 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 h, 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÷24 g/L acetat de amoniu, iar pH-ul s-a reglat la 7,3÷8,0; după 3÷6 h, enzima este inhibată adăugând 0,2÷0,5 g/L ZnCl₂·2H₂O și apoi clătind abundent.

4. Procedeu conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că**, pentru solubilizarea atelocolagenului biologic activ, 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÷72 de h, la 4°C; suspensia vâscoasă rezultată se supune laminării și filtrării, la fiecare 12 h, colectând filtratele și retratând fracția reținută; filtratele reunite se încălzesc la 20÷35°C și li se adaugă 0,01% azidă de sodiu și 1÷2,5 g/L pepsină; după o agitare lentă pe durata a 6÷36 h, 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÷10°C, filtratul se aduce lent la pH 7,5, menținându-se spre maturare timp de 4÷12 h; în continuare, soluția coloidală rezultată se filtrează, recirculând-o, în cascadă, prin filtre având pori cu diametrul echivalent de 200, 100 și, respectiv, 30 microni; la final, filtratul se centrifughează la 7000 g, îndepărtând sedimentul.

5. Procedeu conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că**, pentru purificarea prin microfibrilare, soluția coloidală de atelocolagen biologic activ se termostatează la 5 ± 1°C, apoi se neutralizează lent, prin diafiltrare, schimbând mediul de dispersie cu tampon fosfat având pH-ul de 7,6 ± 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 ± 2°C și se maturează, în aceste condiții, timp de 2÷8 h; apoi temperatura suspensiei formate se aduce lent până la 10 ± 1°C și se supune centrifugării, reținând sedimentul; acesta se spală în centrifugă cu tampon fosfat cu pH-ul de 7,6 ± 0,2 unități, iar apoi se resuspendă în soluție 0,01 M HCl chimic pur, dizolvat în apă deionizată sterilă, liberă de pirogeni; soluția coloidală obținută se diafiltrează în condiții sterile peste membrane cu limita de trecere de 100 kDa, asigurând schimbarea a 5÷9 volume de soluție 0,01 M HCl.

6. Procedeu conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că**, pentru condiționarea atelocolagenului biologic activ în vederea utilizării sale în aplicații cosmetice, acesta se microfibrilează urmând parțial procedura din revendicarea 5, până la obținerea sedimentului prin centrifugare; sedimentul se eliberează apoi de excesul de apă de imbibitiție, se maturează sub vid moderat, la 4÷10°C, timp de 6÷18 h, apoi i se adaugă, prin malaxare la rece, în condiții sterile, 6÷18% glicerină pură și apoi un amestec ce conține 50÷80% glicerină pură, 4÷12% propilenglicol izostearat, 9÷18% propilenglicol dioleat, 10÷25% decil-metil-sulfoxid și 1,5÷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÷15°C, timp de 45÷120 min, pasta rezultată se ultrasonează timp de 10÷30 min, la 22 kHz și la o putere ultrasonoră de 350 W; la final, pasta se maturează sub vid moderat, la rece, timp de 6÷12 h, în condiții sterile, după care se împachetează sub vid, de asemenea în condiții sterile.

RO 126403 B1

- 1 7. Procedeu conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că**, pentru condiționarea
atelocolagenului biologic activ, în vederea utilizării sale în aplicații ale ingineriei tisulare, soluția
3 coloidală obținută conform revendicării 5 se termostatează la $5 \pm 1^\circ\text{C}$ și apoi se diafiltrează
în vederea schimbării mediului de dispersie cu o soluție de tampon HEPES având pH-ul de
5 $7,5 \pm 0,3$ unități, în care s-au dozat $120\div 160$ mM NaCl, $2,5\div 5,2$ mM KCl, $3\div 9$ mM glucoză,
7 $30\div 120$ mM acid ascorbic și $0,5\div 1,5$ g/L hieclat de doxicilină; după o maturare de $6\div 18$ h,
la $4\div 10^\circ\text{C}$, în soluția coloidală se adaugă, sub agitare lentă, $0,5\div 1,5$ g/L hialuronat de sodiu,
9 $0,5\div 1,5$ 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 $4\div 10^\circ\text{C}$, timp de $6\div 18$ h, în condiții sterile,
după care se ambalează în recipiente din sticlă, anterior sterilizate.



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM
Tipărit la: Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci
sub comanda nr. 515/2015