



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2010 00147

(22) Data de depozit: 17.02.2010

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

(71) Solicitant:
• IORDĂCHEL RADU,
STR. JEAN -LOUIS CALDERON NR.6, ET.3,
AP.14, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;
• SÎRBU EMIL, INTRAREA SOCULUI NR. 3,
OTOPENI, IF, RO;
• IORDĂCHEL CĂTĂLIN, STR. NOVACI
NR.11, BL.P 33, SC.2, AP.48, SECTOR 5,
BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:
• IORDĂCHEL RADU,
STR. JEAN LOUIS CALDERON NR. 6,
ET. 3, AP. 14, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B,
RO;
• SÎRBU EMIL, INTRAREA SOCULUI NR. 3,
OTOPENI, IF, RO;
• IORDĂCHEL CĂTĂLIN, STR. NOVACI
NR.11, BL.P 33, SC.2, AP.48, SECTOR 5,
BUCUREȘTI, B, RO

(74) Mandatar:
RODALL S.R.L.-
STR. POLONĂ NR.115, BLOC 15, SC. A,
ET. 4, AP.19, SECTOR 1, BUCUREȘTI

(54) MATRICE NATURALĂ BIOACTIVĂ

(57) Rezumat:

Prezenta invenție se referă la o matrice colagenică bioactivă, sub formă de membrane cu grosimea de 0,3...1 mm, constituită din 0,6...1% extract de colagen nativ, fibrilar, nendenaturat, de tip (I), cu greutate moleculară medie 400.000...500.000 și puritate

80...98%, cu sau fără adăugarea de glicerină 0,5...1%, ca plastifiant, și glutaraldehidă 0,1...0,5%, ca reticulant.

Revendicări: 2



5

OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI	
Cerere de brevet de invenție	
Nr. a	2010 00147
Data depozit	17-02-2010

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

Este cunoscută diversitatea bioproduselor și alicațiilor în special medicale ale collagenilor “per se” și mai ales prin transformarea lor chimică și formarea de biocompozite cu alți biopolimeri, polimeri sintetici și alte substanțe bioactive (US 516.430, 4.841.482). Se cunosc de asemenea unele producții de membrane fire, fibre, implanturi pentru vindecarea rănilor (US 5.110.604, RO 83083, RO 95.354, RO 110.780B, RO 118.118B1, RO115693B1) implanturi (US4.233.360) reticulant biologic, cosmetică (US4.320.201, etc.).

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

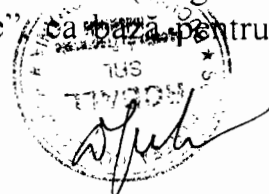
Colagenul (formulare generală care reunește o familie de peste 21 de tipuri) poate fi obținut din orice organism animal dar sub aspect economic se preferă tendoanele și pielea mamiferelor, în special domestice datorită prezenței în cantitate mare a acestei proteine structurale.

Prezenta invenție se bazează pe obținerea de collagen “ex vivo” sub formă de soluție conținând fibre și fibrile de collagen nativ tip (I) nederivat, neimunogen, care poate fi păstrată și utilizată “per se” sau prin reticularea cu glutaraldehidă.

Ca urmare s-au luat în considerare o serie de procedee de extracție prin tratament enzimatic (US3.131.130, 3.530.037, 2.934.446, RO96291) în mediu de acid acetic și purificarea prin precipitare cu clorură de sodiu. Se obține o soluție neimunogenă cu conținut de 0,8% substanță uscată 80-98% collagen și o greutate moleculară medie de 400.000-500.000 care se conservă și utilizează ca atare sau se folosește la asamblarea de fibrile (micropolimeri fibroși) ca bază pentru matrici naturale condiționale în stare uscată (membrane/pelicle).

Fibrilele de collagen vizualizate în microscopia electronică și scanning, sunt compuse din subunități structurale (cunoscute ca molecule de collagen) de circa 3000Å lungime și 15Å diametru care conțin trei lanțuri polipeptidice cu configurație tripluhelicoidală.

Colagenul nativ rezultat din purificare se concentrează variabil (1mg/ml-20mg/ml și soluția liberă de agregate mari, se folosește “per se” ca bază pentru matrici naturale condiționale în stare uscată (pelicle/membrane).



Prepararea de membrane (pelicule) se realizează cu soluție apoasă de colagen tip (I) sau reticulat chimic cu glutaraldehidă 0,1-0,5% adusă la concentrația de 0,01-10% colagenși expusă pe suprafață inertă de polietilenă. Grosimea peliculelor variază între 0,1-0,5mm iar suprafața membranelor cu rol de substrat/suport sunt la alegere în funcție de dimensiunile corespunzătoare condițiilor de cultură celulară "in vitro".

Invenția prezintă numeroase avantaje:

1. Materia primă și substanțele utilizate sunt accesibile, de proveniență indigenă, iar procedeul de obținere a tipurilor de matrici membranare este simplu, economic și nepoluant (substanțele utilizate sunt în general produse naturale netoxice);
2. procedee simple de obținere a unei matrici colagenice biocompatibile cu conservarea calităților native ale proteinei structurale și implicarea pozitivă a acestora în procesele de creștere și dezvoltare celulară "in vitro", de modelare a unor sisteme funcționale experimentale pentru ingineria tisulară de evaluare a biocompatibilității unor agenți și produse destinate uzului uman;
3. se aplică la orice tip de celule (culturi primare, linii celulare) pentru susținerea și stimularea dezvoltării celulare și formarea de mono și multistratificare celulară ca etapă de trecere la organizare structurală supracelulară.

Se dau în continuare două exemple de realizare a matricii celulare conform invenției.

Exemplul 1.

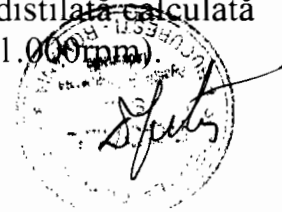
Pentru obținerea compoziției pentru membrane din soluția stoc de colagen fibrilar nativ tip (I) nednaturat obținută din tendon bovin prin procedeele biochimice nednaturante se omogenizează la turații între 9.000-11.000 x 1000 rpm se adaugă treptat apă distilată cu reglarea unui amestec cu concentrații de 0,5-2% colagen raporturile fiind exprimate în greutate.

După omogenizarea completă (aspect transparent al soluției) se scade turația aparatului la 0,3-0,1 x 1000rpm și se agită continuu până la dezaerarea completă și apoi se va turna pe suprafețe plate de polietilenă și vor fi menținute în hotă cu flux la circa 33°C.

Membranele rezultate se sterilizează la UV sau γ apoi se ambalează în pungi de plastic pentru menținerea condițiilor aseptice.

Exemplul 2.

Cantitatea de soluție stoc stabilită pentru obținerea de matrici membranare se omogenizează folosind o baie de abur și agitare ușoară continuă și o temperatură între 37-40°C. În aceste condiții se realizează dezaerarea compoziției și relaxarea rețelei colagenice. Se amestecă cu volumul de apă distilată calculată pentru concentrația de colagen dorită la turație joasă (0,3-0,1 x 1.000rpm).



Soluția finală obținută prin cele două procedee este folosită "per se" la condiționarea membranelor cu rol de substrat pentru culturi celulare "in vitro".

Funcție de scopul urmărit se poate adăuga pe parcursul procesării:

1. glicerină 0.5-1% ca plastifiant, și antibiotice, antibacteriene sau alte substanțe biologice active la prepararea membranei sau
2. la aplicarea membranei prin aditionare imediată în funcție de utilizare.

Altă variantă constă în transpunerea chimică a colagenului prin reticulare cu 0,1-0,5%glutaralhidei și prelucrarea soluției conform descrierii anterioare.

Față de valorile standard recomandate pentru compoziția colagenului nativ tip(I) nedenaturat, biocompatibil, membranele se caracterizează și prin: prezența structurii fibrilare specifice, porozitate, rezistență la rupere sau tracțiune, insolubilitate sau solubilitate redusă a colagenului.



Revendicări

1. Matrice naturală bioactivă peliculogenă cu rol de substrat/support stimulator al dezvoltării celulare "in vitro" caracterizată prin aceea că este constituită din 0,6-1% extract de collagen nativ fibrilar tip (I) nedegradat, hipoimunogen cu greutate moleculară medie 400.000-500.000 și puritate de 80-98% condiționată și utilizată sub formă de membrane/pelicle sterile și biocompatibile cu grosimea de 0.3-1mm și dimensiuni variabile cu caracteristici structurale, biomecanice, termostabilitate cu compatibilitate de asociere cu plastifianți (glicerină 0,003-0,010 părți) sisteme de reticulare chimică (0,1-0,5 % glutaraldehidă 25% cu alte substanțe biologic active (antibiotice, antibacteriene, factori de creștere, etc.)
2. Procedul de obținere descris prin cele două exemple este reproductibil economic și asigură obținerea de membrane suport cu calitățile specifice collagenului nativ tip (I), pentru utilizări în domeniul bioingineriei celulare și medicinei reconstructive.

