



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2011 01336

(22) Data de depozit: 07.12.2011

(41) Data publicării cererii:  
28.12.2012 BOPI nr. 12/2012

(71) Solicitant:  
• INSTITUTUL NAȚIONAL DE  
CERCETARE-DEZVOLTARE TEXTILE ȘI  
PIELĂRIE-SUCURSALA INSTITUTUL DE  
CERCETARE PIELĂRIE-ÎNCĂLȚĂMINTE,  
STR. ION MINULESCU NR.93, SECTOR 3,  
BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:  
• ALBU MĂDĂLINA GEORGIANA,  
BD. TINERETULUI NR. 21, BL. Z6, SC. 1,  
ET. 7, AP. 48, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B,  
RO;  
• LASCĂR IOAN, INTRAREA POIANA  
NR.25, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;

• ZAMFIRESCU DRAGOȘ GEORGE,  
SPLAIUL UNIRII NR. 31, BL. M3, SC. 1,  
AP. 30, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;  
• SIMIONESCU MAYA,  
STR. LOUIS PASTEUR NR. 16, SECTOR 5,  
BUCUREȘTI, B, RO;  
• ZEGREA ION, STR. POLONĂ NR. 125,  
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;  
• TITORENCU IRINA DOMNICA,  
ALEEA SOLIDARITĂȚII NR. 1, BL. M17,  
ET. 2, AP. 29, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B,  
RO;  
• POPESCU MARIUS, ALEEA COCONI  
NR. 9, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;  
• BUMBENECCI GETA, STR. LT. CIMPEANU  
NR. 3, BL. 15A, SC. 2, AP. 16, SECTOR 5,  
BUCUREȘTI, B, RO

(54) CONDUCTORI NERVOȘI DIN COLAGEN ȘI PROCEDEU DE  
OBTINERE A ACESTORA

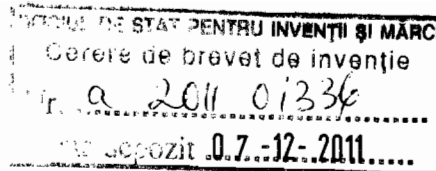
(57) Rezumat:

Invenția se referă la conductori nervoși din colagen reticulat, și la un procedeu pentru obținerea acestora. Conductorii nervoși, conform invenției, sunt constituiți din gel de colagen cu o concentrație de 1,2...2% reticulat cu 0,1...1% glutaraldehidă. Procedeu conform invenției constă în prepararea în prealabil a colagenului fibrilar tip I, sub formă de gel, din piele crudă de vițel, reticularea acestuia cu 0,1...1% glutaraldehidă, turnarea gelului de colagen reticulat între doi cilindri concentrici din polietilenă, la 4°C, și apoi înghețarea acestuia la

-40°C, timp de 24 h, rezultând un hidrogel sub formă tubulară, care se imersează într-o soluție tampon fosfat:alcool etilic timp de 24 h, după care hidrogelurile de colagen sub formă tubulară se usucă la etuvă, la 26°C, astfel formându-se conductori nervoși din colagen transparenți, cu un diametru intern de 0,5...2,5 mm și o lungime de 1...10 cm.

Revendicări: 3





30

## CONDUCTORI NERVOȘI DIN COLAGEN ȘI PROCEDEU DE OBȚINERE A ACESTORA

### **Domeniul tehnic în care poate fi folosită invenția:**

Invenția se referă la conductori nervoși biocompatibili din colagen fibrilar tip I reticulat pentru repararea nervilor periferici și la un procedeu de obținere a acestora.

### **Descrierea stadiului actual:**

Leziunile sistemului nervos afectează peste 90.000 de oameni în fiecare an. Defectele nervoase periferice sunt foarte frecvente în practica clinică și adesea duc la invaliditate permanentă. Odată lezat, țesutul nervos este greu de regenerat în special atunci când un defect nervos este fragmentat pe o suprafață întinsă.

Pentru a mări perspectiva regenerării axonilor și recuperarea funcțională au fost utilizate numeroase proceduri de grefare, inclusiv implantarea de autogrefe, alogrefe și xenogrefe. În prezent, tehnica clinică pentru reconstrucția nervilor periferici lezați este utilizarea de grefe nervoase autologe. Totuși, această metodă are și o serie de dezavantaje, incluzând intervențiile chirurgicale extinse, pierderea funcției de donator a nervilor, oferta limitată de nervi a donatorilor etc. Astfel, au fost investigate și alte metode chirurgicale, inclusiv alogrefa, organele sau țesuturile autologe sau autogene, vasele de sânge și mușchii scheletici. Cu toate acestea, ca urmare a respingerii imunologice, au fost realizate numai câteva succese.

Datorită dezvoltării ingineriei tisulare există posibilitatea din ce în ce mai mare de utilizare de conductorilor biodegradabili pentru reconstrucția defectelor nervoase.

Conductorii nervoși sunt structuri tubulare utilizate la acoperirea defectelor nervoase mari, acționând astfel ca ghid pentru regenerarea axonilor și ca barieră împotriva țesutului cu escare.

Există numeroase tehnici de fabricare a polimerilor pentru obținerea conductorilor nervoși. Polimerii naturali utilizați pentru fabricarea conductorilor nervoși includ chitosanul, colagenul, gelatina, acidul hialuronic (HA) și fibre de mătase. Aceși polimeri oferă biocompatibilitate excelentă, reprezintă un suport ideal pentru atașarea și funcționalizarea celulelor, scad frecvența răspunsului imun, furnizează semnale corespunzătoare celulelor fără a necesita factori de creștere și pot fi degradate de enzime naturale. Totuși, polimerii naturali prezintă variații și necesită purificare și caracterizare de la lot la lot. Mai mult, cele mai multe

nu au rezistență mecanică bună și se degradează *in vivo* relativ repede. Adesea polimerii naturali necesită modificări chimice și reticulări sau combinații cu alte componente structurale cum ar fi polimerii sintetici cu proprietăți mecanice bune. Datorită temperaturii lor de denaturare scăzute și stabilității termice, polimerii naturali sunt în general fabricați la temperatura camerei prin injectare, imersare și electrofilare din soluții de polimeri.

Datorită biocompatibilității și biodegradabilității excelente, structuri bine definite, caracteristicilor biologice și modului în care interacționează cu organismul, **colagenul** reprezintă unul dintre cele mai utilizate biomateriale. Extras sub formă de soluție apoasă sau gel, colagenul fibrilar tip I poate fi modelat în diferite forme: dispozitive medicale, implanturi artificiale, tuburi, suporturi pentru cedarea medicamentelor și schelete (scaffold) pentru regenerare tisulară, cu rol important în prezent în medicină.

Polimer natural, colagenul este constituit din 20 de aminoacizi, aranjați în secvențe caracteristice, ce formează o structură conformațională unică de triplu helix. Colagenul tip I este cel mai abundent, reprezentând cca 80% din totalul țesuturilor conjunctive. Acesta este tipul pe baza căruia s-au obținut cele mai multe informații legate de structura proteinelor colagenice. Datorită proprietăților hidrofile date de structura moleculară, caracterizată prin conținutul mare de aminoacizi diaminici și dicarboxilici, conferă o interfață adecvată pentru adeziunea și migrarea celulară.

În general, un conductor nervos ideal trebuie să fie ne-citotoxic, foarte permeabil, suficient de flexibil, cu o viteză de degradare corespunzătoare ca să poată furniza regenerarea axonilor și să prezinte răspunsuri inflamatorii minime.

Pe plan mondial realizarea conductorilor nervosi este un subiect foarte cercetat. În continuare sunt prezentate invenții referitoare la realizarea conductorilor nervosi care au la baza colagenul, ca polimer natural.

Brevetul KR nr. 0018214 se referă la tuburi de colagen cu un perete format dintr-o succesiune de filme de colagen cilindrice, continue, coaxiale. Aceste tuburi pot fi utilizate în chirurgie, în special pentru regenerarea nervoasă. Brevetul RO nr. 123177 descrie compoziția unui material biocompatibil și procesarea lui. Compoziția revendicată este un amestec de poliuretan și colagen; poliuretan, colagen și elastină; poliuretan, colagen, elastină și acid hialuronic; colagen, elastină și condroitin sulfat cu o bună capacitate de extrudare și o bună biocompatibilitate pentru dispozitive medicale (tuburi pentru pompe peristaltice). Acest brevet revendică introducerea polimerilor solizi într-o soluție de poliuretan în dimetil formaldehidă la 60-70°C cu îndepărtarea solventului. Brevetul US nr. 170664 prezintă un tub de colagen tip I de origine porcine și tip IV în raport de 1:1 format din membrana de colagen

BioBrane. Tuburile realizate in acest brevet au diametru 0.5 – 5 mm si 10-100 mm lungime. Inventia EP nr. 0906764 descrie formarea unui tub de colagen prin inghetarea unei suspensii urmata de liofilizare sau uscare cu solvent intr-o succesiune de alcool izopropilic anhidru. Suspensia este turnata intr-un tub cu ambele capete deschise, iar partea centrala va fi indepartata. Suspensia de colagen este preparata din colagen liofilizat si ajustata la 1% si pH=3, iar tuburile sunt solubile in apa. Brevetul US nr. 5292802 prezinta tuburi din colagen conjugat la polietilen glicol obtinute prin extrudare sau turnare urmata de deshidratare. Brevetul US nr. 4863668 descrie o metoda de formare a nervilor periferici dintr-un material fibrina-colagen reticulate cu o solutie stock 25% glutaraldehida si 37.5% formaldehida. Materialul este multistratificat continand straturi alternate de fibrina si colagen. Brevetul US nr. 4814120 se refera la procesul de obtinere a nervilor periferici prin extruderea unui gel acid de colagen de concentratie 1.5% urmata de coagularea peretilor interni si externi intr-o baie de coagulare de 70% acetona si 30% amoniac urmata de uscare si in final reticulare. Brevetul WO nr. 004971 descrie un conductor nervos format dintr-un material polimeric care este acoperit pe suprafata interioara cu colagen si factori de crestere si este echipat cu un dispozitiv de stimulare electrica. Inventia CN nr. 101138656 relateaza realizarea unui nerv de colagen cu chitosan in forma acid in volume corespunzatoare. Brevetul US nr. 2019087 se refera la realizarea nervilor periferici multistrat utilizand laminina si colagen tip I. Deși au fost dezvoltati multi conductori nervosi pe bază de colagen pentru a fi utilizati in repararea nervilor periferici, acestia au fost extrudati intr-o baie de solvent sau uscati liber prin evaporarea solventului, ceea ce poate implica citotoxicitate, pentru prepararea lor au fost utilizate combinatii de polimeri sintetici, majoritatea sunt degradabili in apa, au compozitii cu pH acid. Avantajul invenției noastre este că conductorii nervosi din colagen sunt naturali, fiind realizati doar din colagen reticulat, se degradeaza in timp, au o porozitate bine determinata, iar metoda de obtinere combina mai multe tehnici, ca turnarea, inghetarea, imersarea in solutie si uscarea la o anumita temperatura, ceea ce confera conductorului realizat stabilitate fizico-chimica si mecanica si mentin supletea colagenului fibros.

### **Problema tehnică**

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția constă în combinarea metodelor de reticulare și condiționare a colagenului astfel încât să rezulte conductori nervoși în formă tubulară de diferite dimensiuni și grosimi care să fie resorbabili și să regenereze țesutul într-o perioadă de timp stabilă.

### Soluția tehnică

Conductorii nervosi conform invenției înlătură dezavantajele menționate prin aceea că sunt constituite din un polimer natural, collagen fibrilar tip I, obținut din derma pielii de vițel, sub formă de gel, cu structură nativă triplu helicoidală, după un procedeu special. Pentru prepararea gelului de collagen s-a utilizat piele crudă de vițel. Pielea a fost depilată mecanic, îndepărtându-se părul, apoi s-a îndepărtat epiderma și grăsimea după cum urmează: pentru a obține dermă pretrată, pielea crudă de vițel a fost supusă în prealabil tratamentului acid cu acid acetic 0,2 ... 1M timp de 2 ... 10 zile (în funcție de vârsta animalului). În urma acestui tratament pielea a suferit un proces de umflare și cele trei straturi ale sale: epiderma, derma și hipoderma s-au delimitat foarte clar. S-a reținut doar derma, care s-a spălat cu apă din abundență până când flota de spălare a ajuns la un pH de 5 ... 8. Dermă pretrată s-a supus apoi unui tratament alcalin (pH = 10) constituită din NaOH 8...14% și sulfat de sodiu 1...3M timp de 24 ore, la temperaturi cuprinse între 15 și 25°C. Pentru îndepărtarea urmelor de grăsime și a proteinelor digerate de tratamentul bazic pielea a fost spălată timp de 2 zile până când flota a ajuns la pH-ul 6 – 7. Aceste operații de spălare-neutralizare sunt necesare în vederea dizolvării acide, deoarece o trecere bruscă a collagenului din mediul bazic în mediul acid ar fi împiedicat dizolvarea datorită precipitării sărurilor pe fibrele de collagen. Îndepărtarea alcaliilor s-a verificat prin tratarea flotei cu o soluție de clorură de bariu 1... 5%. Acestea se tratează mai departe cu o soluție de acid clorhidric 1N la temperatura de 22°C. După 24 h se formează un gel consistent, care se trece printr-o sită pentru reținerea eventualelor porțiuni negelifiate. Gelul de collagen obținut s-a omogenizat cu un agitator cu paletă, s-a lăsat la maturare timp de 24 h la 4°C. Gelul de collagen cu o concentrație de 1 ... 3% collagen (substanță uscată) a fost reticulat cu o soluție 0.1 ... 1% glutaraldehida în apa distilată. Procedeu de obținere a conductorilor nervosi constă în aceea că, în prealabil, gelul de collagen reticulat este turnat la o temperatură de 4°C între 2 tuburi concentrice (de dimensiuni diferite) din polietilena cu ambele capete deschise. După turnare acestea se îngheață la 0 ... -40°C timp de 2 ... 24 ore. După dezghețare se formează un hidrogel sub forma tubulară. Acesta este imersat într-o soluție tampon fosfat pentru îndepărtarea glutaraldehidei nereactionate și alcool etilic pentru o reticulare și sterilizare suplimentară timp de 1 ... 24 ore. După imersare hidrogelurile de collagen sub forma tubulară sunt uscate într-o etuvă la 24 ... 36°C. Se formează conductorii nervosi de collagen transparenti, cu o dimensiune a diametrului intern de 0.5 ... 2.5 mm și 1 ... 10 cm lungime (Figura 1), cu structura poroasă, cu pori de 5-20 μm (Figura 2 a – secțiune și Figura 2b - suprafață), și biocompatibili cu celulele astrocite și neuroni.

### **Scurtă descriere a desenelor**

Fig. 1. prezintă conductorii nervoși obținuți la diferite dimensiuni

Fig. 2. prezintă imagini de microscopie electronică a conductorului nervos

### **Avantajele invenției în raport cu stadiul tehnicii**

Aplicarea invenției conduce la următoarele avantaje:

- reducerea efectului toxic al polimerilor sintetici prin utilizarea unui polimer natural, colagen recunoscut de organism ca un constituent al sau si nu ca un material strain;
- obținerea unor conductori nervosi printr-o combinatie de procedee simple si intr-un timp scurt (3 zile) care atrage costuri mult sub cele aflate pe piata in acest moment;
- regenerarea regiunilor nervoase prin aplicarea conductorilor nervosi in chirurgia plastica si reparatorie scad numarul cazurilor de invaliditate intr-un timp scurt si redau capacitatea socio-profesionala a pacientilor;

### **Descrierea detaliată a invenției:**

Colagen fibrilar tip I sub forma de gel s-a preparat din piele crudă de vițel (varsta 1 an) după cum urmează: pielea crudă de vițel a fost supusă în prealabil tratamentului acid cu acid acetic 0.5 M timp de 5-7 zile (în funcție de vârsta animalului). După gonflare pielea a fost depilată mecanic, îndepărtându-se părul, apoi s-a îndepărtat epiderma și grăsimea. Derma reținută a spălată cu apă din abundență până când flota de spălare a ajuns la un pH de 7. Derma pretrată s-a supus apoi unui tratament alcalin (pH = 10) constituită din NaOH 10% și sulfat de sodiu 1 M timp de 24 ore, la temperaturi cuprinse între 15 și 25°C. Pentru îndepărtarea urmelor de grăsime și a proteinelor digerate de tratamentul bazic pielea a fost spălată timp de 2 zile până când flota a ajuns la pH-ul 6 – 7. Acestea se tratează mai departe cu o soluție de acid clorhidric 1N la temperatura de 22°C. După 24 h se formează un gel consistent, care se trece printr-o sită pentru reținerea eventualelor porțiuni negelifiate. Gelul de colagen obținut s-a omogenizat cu un agitator cu paletă, s-a lăsat la maturare timp de 24 h la 4°C.

Invenția va fi explicată mai în detaliu prin următoarele exemple:

### **Exemplul 1**

În această invenție a fost utilizat gelul de colagen fibrilar tip I obținut ca în descrierea de mai sus, având o concentrație gravimetrică de 1.2%, 98.55% apă distilată și pH-ul 2.5. pH-ul gelului de colagen a fost ajustat la 7,4 cu 1M hidroxid de sodiu și apoi a fost reticulat cu 0.25% glutaraldehidă. Gelul reticulat a fost turnat la o temperatură de 4°C între 2 tuburi

25

concentrice (de dimensiuni între 0.5 și 2.5 mm) din polietilena cu ambele capete deschise. După turnare acestea se îngheață la  $-40^{\circ}\text{C}$  timp de 24 ore. După dezghețare se formează un hidrogel sub formă tubulară. Acesta este imersat într-o soluție tampon fosfat:alcool etilic (50:50) timp de 24 ore. După imersare hidrogelurile de colagen sub formă tubulară sunt uscate într-o etuvă la  $26^{\circ}\text{C}$ . Se formează conductori nervosi de colagen transparenti, cu o dimensiune a diametrului intern de 0.5 ... 2.5 mm și 1 ... 10 cm lungime.

### **Exemplul 2**

Gelul de colagen a fost obținută prin procesul descris în Exemplul 1 exceptând procentul de colagen, care a fost 2% (substanță uscată). Procesul de turnare, înghețare, imersare și uscare au fost similare cu cele descrise în Exemplul 1. S-au obținut conductori nervosi cu o dimensiune a diametrului intern de 0.5 ... 2.5 mm și 1 ... 10 cm lungime.

### **Exemplul 3**

Gelul de colagen a fost obținut ca în procedeul descris în Exemplul 2, cu excepția că glutaraldehida a fost în procent de 0.5%. Procesul de turnare, înghețare, imersare și uscare au fost similare cu cele descrise în Exemplul 2. S-au obținut conductori nervosi cu o dimensiune a diametrului intern de 0.5 ... 2.5 mm și 1 ... 10 cm lungime.

### **Exemplul 4**

Gelul de colagen a fost obținut ca în procedeul descris în Exemplul 3, cu excepția că colagenul a fost în procent de 2.5% (substanța uscată). Procesul de turnare, înghețare, imersare și uscare au fost similare cu cele descrise în Exemplul 3. S-au obținut conductori nervosi cu o dimensiune a diametrului intern de 0.5 ... 2.5 mm și 1 ... 10 cm lungime.

### **Exemplul 5**

Gelul de colagen a fost obținut ca în procedeul descris în Exemplul 4, cu excepția că procentul de glutaraldehida a fost de 1%. Procesul de turnare, înghețare, imersare și uscare au fost similare cu cele descrise în Exemplul 4. S-au obținut conductori nervosi cu o dimensiune a diametrului intern de 0.5 ... 2.5 mm și 1 ... 10 cm lungime.

### **Exemplul 6**

Gelul de colagen obținut și reticulat, procesul de turnare, înghețare și uscare au fost aceleași cu cele descrise în Exemplul 5, cu soluției de imersare care a fost soluție tampon fosfat : alcool etilic (100:0). S-au obținut conductori nervosi cu o dimensiune a diametrului intern de 0.5 ... 2.5 mm și 1 ... 10 cm lungime.

### **Exemplul 7**

Gelul de colagen obtinut si reticulat, procesul de turnare, inghetare si uscare au fost aceleasi cu cele descrise in Exemplul 6, cu solutiei de imersare care a fost solutie tampon fosfat : alcool etilic (0:100). S-au obtinut conductori nervosi cu o dimensiune a diametrului intern de 0.5 ... 2.5 mm si 1 ... 10 cm lungime.

#### **Exemplul 8**

Gelul de colagen obtinut si reticulat, procesul de turnare, inghetare si uscare au fost aceleasi cu cele descrise in Exemplul 7, cu solutiei de imersare care a fost solutie tampon fosfat : alcool etilic (80:20). S-au obtinut conductori nervosi cu o dimensiune a diametrului intern de 0.5 ... 2.5 mm si 1 ... 10 cm lungime.

Conductorii nervosa obtinuti în această invenție reprezinta biomateriale pentru ingineria tisulara de regererare nervoasa si sunt utilizati în chirurgie plastica si reparatorie.



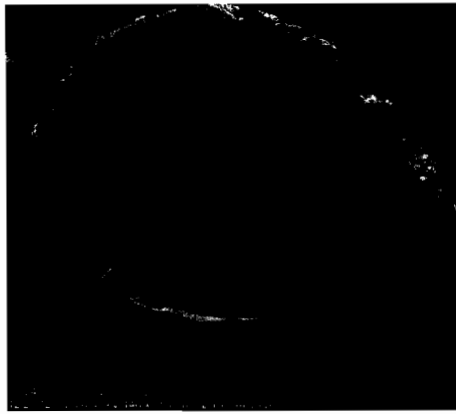
## REVENDICARI

1. Conductori nervosi **caracterizati prin aceea ca** au fost obtinuti din gel de collagen preparat din piele cruda de vitel supusa în prealabil tratamentului acid cu acid acetic 0.5 M timp de 5-7 zile (în functie de vârsta animalului). Dupa gonflare pielea a fost depilata mecanic, îndepărtându-se părul, apoi s-a îndepărtat epiderma și grăsimea. Derma pretratată s-a supus apoi unui tratament alcalin (pH = 10) constituită din NaOH 10% și sulfat de sodiu 1 M timp de 24 ore, la temperaturi cuprinse între 15 și 25°C urmat de unul acid cu o soluție de acid clorhidric 1N la temperatura de 22°C. După 24 h se formează un gel consistent, care se filtreaza, omogenizeaza si se matureaza la 24 h si 4°C.
2. Conductori nervosi **caracterizati prin aceea ca** sunt constituiti dintr-o compozitie de gel de collagen conform revendicarii 1, cu o concentratie de 1.2 ... 2% si reticulat cu 0.1 ... 1% glutaraldehida.
3. Procedul de obtinerea a conductorilor nervosi care au compozitia definita ca in revendicarea 2, **caracterizat prin aceea ca**, in prealabil, gelul de collagen reticulat este turnat intre 2 cilindrii concentrici din polietilena deschisi la ambele capete, inghetat la -40°C pentru a se forma un hidrogel poros, care apoi este imersat intr-o solutie tampon fosfat:alcool eticlic (80:20). Dupa imersare hidrogelul este uscat la 26°C si se obtin conductori porosi transparenti din collagen de diferite dimensiuni.

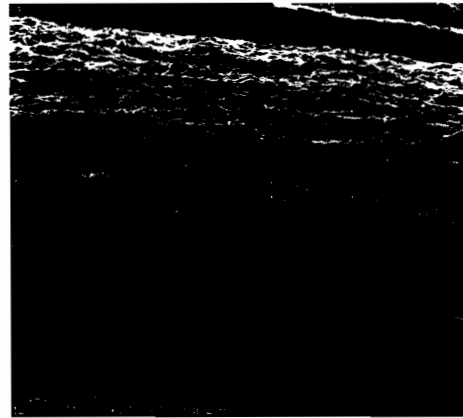
**FIGURI**



Figura 1



a)



b)

Figura 2