



(12)

## BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2012 00867**

(22) Data de depozit: **23/11/2012**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30/03/2017** BOPI nr. **3/2017**

(41) Data publicării cererii:  
**29/11/2013** BOPI nr. **11/2013**

(73) Titular:  
• **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**

(56) Documente din stadiul tehnicii:  
**M. G. ALBU, L. POPA, M. V. GHICA, M.  
LECA, V. TRANDAFIR ȘI I. TITORENCU,  
"COLLAGEN MATRICES FOR DRUG  
DELIVERY: PREPARATION,  
CHARACTERIZATION AND KINETICS OF  
RELEASE", EUROPEAN CELLS AND  
MATERIALS, ISSN: 1473-2262, VOL 16  
SUPPL. 5, P. 1, 2008; M. G. ALBU, M. V.  
GHICA, L. LECA ȘI V. TRANDAFIR,  
"KINETICS OF IN VITRO RELEASE OF  
DOXYCYCLINE HYCLATE FROM  
COLLAGEN HYDROGELS",  
REVUE ROUMAINE DE CHIMIE,  
VOL. 54 (5), PP. 373-379, 2009**

(54) **MEMBRANĂ DE COLAGEN CU DOXICICLINĂ PENTRU UZ  
STOMATOLOGIC ȘI PROCEDU DE OBTINERE A ACESTEIA**



# RO 128972 B1

1 Invenția se referă la o membrană pe bază de colagen și hialat de doxiciclină, utilizată  
în stomatologie, ca tratament pentru infecțiile parodontale și gingivale, și la un procedeu de  
3 obținere a acesteia.

Boala parodontală este o inflamație cronică a țesutului gingival, care duce la distrugerea  
5 osului subiacent, care deține dinții. Lăsată netratată, aceasta poate provoca sângerarea  
gingiilor, respirație cronică grea, dureri dentare sau chiar pierderea dinților. Unele studii au  
7 indicat o legătură între bolile gingivale și bolile de inimă și accidentele vasculare cerebrale.

Potrivit statisticilor, 70% din populația din întreaga lume suferă de această boală, care,  
9 cu trecerea timpului, duce la o deteriorare suplimentară și la pierderea dinților.

Există mai multe moduri de a trata parodontoza, în funcție de gravitatea acesteia. Scopul  
11 tratamentului este de a curăța bine pungile parodontale infectate cu bacterii, de la rădăcina  
dintelui, și de a preveni suprainfectarea. Tratamentul poate fi chirurgical sau nechirurgical, și  
13 se efectuează de către un specialist, fie un periodontist, un dentist sau un igienist dentar.

Tratamentul chirurgical poate consta în chirurgie articulară, grefă de țesut moale sau  
15 grefă de os, sau regenerare tisulară ghidată. Tratamentele nechirurgicale includ proceduri mai  
puțin invazive, cum ar fi: curățare (cu instrumente sau dispozitive ultrasonice), curățarea  
17 rădăcinilor și tratamentul cu antibiotic, care este încă în continuă cercetare.

Dentistul poate recomanda folosirea antibioticelor topice sau orale, pentru a ajuta la  
19 controlul infecției bacteriene. Tratamentul cel mai des întâlnit este reprezentat de antibioticele  
topice.

21 Acestea pot include clătiri ale gurii cu soluții de antibiotic, sau inserarea de fire și geluri  
care conțin antibiotice în spațiul dintre dinți și gingii, sau în pungile parodontale, după o curățare  
23 profundă. Pe de o parte, antibioticele orale pot fi necesare pentru a elimina complet infecția care  
cauzează bacterii, iar pe de altă parte, un exces de antibiotice poate provoca arsuri ale  
25 stomacului și afecțiuni asupra altor organe ale corpului.

Sistemele de cedare topică sunt utilizate pentru a produce efecte localizate la suprafața  
27 pielii sau mucoasei, în scopul cedării medicamentului cu acțiune farmacologică (acțiune topică).

Moleculele substanței active difuzează către țesutul țintă din vecinătatea locului de  
29 aplicare, producând astfel efectul terapeutic.

Pentru obținerea efectelor topice și posibil sistemice ale preparatelor aplicate local, se  
31 utilizează diferite sisteme medicamentoase care, în funcție de tipul formei farmaceutice, pot fi  
lichide (emulsii, soluții, suspensii), solide (pulberi, matrice, membrane) sau semisolide (geluri,  
33 hidrogeluri).

Până în prezent, în stomatologie s-au utilizat următoarele tipuri de sisteme de eliberare  
35 locală a medicamentelor: fibre de colagen impregnate cu tetraciclină (Periodontal Plus AB™),  
filme de colagen din pește cu gluconat de clorhexidină (PerioCol®-CG), microcapsule absorba-  
37 bile din poli-lactidă-co-glicolidă cu minociclină (Arestin®), filme din hidroxi-propil celuloză cu  
catechină din ceai verde, filme de gelatină cu gluconat de clorhexidină (PerioChip®), gel poli-  
39 meric (polilactidă dizolvată în 2 metil-N-pirolidonă în raport 1:2) cu 10% doxiciclină (Atridox®),  
care se eliberează lent în 7 zile, și ață dentară din copolimer etilen-vinil acetat cu tetraciclină,  
41 care este cedată în timp de 10 zile.

În stomatologie s-au utilizat forme resorbabile ale colagenului, pentru pansarea rănilor  
43 bucale și închiderea suprafețelor grefate sau a locurilor unde a avut loc extracția, pentru a  
stabiliza coagularea sângelui, a proteja locurile chiuretate și a accelera procesul de vindecare.  
45 Terapia parodontală include regenerarea țesuturilor din imediata apropiere a dinților sau  
implanturilor, și eliminarea defectelor parodontale sau paroimplant prin formarea osului,  
47 cimentului și a ligamentului parodontal nou în jurul dintelui.

# RO 128972 B1

Brevetul **US 114763 (A1)** descrie metoda pentru producerea membranei de collagen/apatită prin reticularea collagenului cu EDC/NHS dizolvat în alcool și liofilizată. Aceasta este utilizată pentru regenerarea osoasă ghidată, și nu și pentru tratamentul infecțiilor dentare. Alte preparate terapeutice, prezentate în brevetul **CN 102380123 (A)** - membrană collagen-carboximetilceluloză de sodiu reticulată cu glutaraldehidă, și **RO 83060 (A2)** - membrană de collagen cu  $\alpha$ -chymotripsină imobilizată, au fost utilizate ca pansamente medicale. Acestea au rolul de a regenera țesutul moale, dar nu au proprietăți antimicrobiene. Produse pentru stomatologie, cu acțiune antibacteriană, cu eliberarea topică a doxiciclinei, sunt descrise în brevetele: **CN 102579408 (A)** - micropilule cu eliberare de doxiciclină în plasma sanguină, **CN 102552152 (A)** - macromolecule compozite pe bază de doxiciclină încapsulată în etil-celuloză și gelatină, pentru îmbunătățirea stabilității doxiciclinei, cu aplicații în medicina veterinară, și **CN 101618025 (A)** - preparat liofilizat pe bază de clorhidrat de doxiciclină, lizină, sulfat de sodiu și polivinil piroolidonă, tot pentru uz veterinar. Brevetele descrise mai sus au avantajul de a dezvolta produse care vindecă/previn infectarea țesuturilor dentare prin acțiunea antibioticului, dar, în comparație cu prezenta invenție, nu au capacitatea de a regenera țesutul deteriorat de infecție.

**M.G. Albu, L. Popa, M.V. Ghica, M. Leca, V. Trandafir și I. Titorencu, "Collagen Matrices for Drug delivery: Preparation, Characterization and Kinetics of Release", European cells and Materials, 2008, vol. 16 Suppl. 5, pag. 1; ISSN: 1473-2262**, descrie un studiu de eliberare *in vitro*, la  $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ , a doxiciclinei dintr-o matrice pe bază de collagen fibrilar de tip I, obținut din derma pielii de vițel, preparată prin liofilizarea a 1,2% geluri de collagen conținând 0,2% hclat de doxiciclină și 0, 0,15, 0,20; 0,25 și 0,30% aldehydă glutarică. Matricea prezentată este un burete spongios obținut prin liofilizare, cu o structură 3D care eliberează până la 85% doxiciclină în 4 h.

**M.G. Albu, M.V. Ghica, L. Popa, M. Leca și V. Trandafir, "Kinetics of *in vitro* release of doxycycline hyclate from collagen hydrogels", Revue Roumaine de Chimie, 2009, 54(5), 373-379**, se referă la un studiu despre geluri de collagen cu doxiciclină, ce eliberează doxiciclina astfel: 30...50% doxiciclină în 100 de min.

Spre deosebire de matrice (burete), care este foarte voluminoasă ( $5\text{ mm}^3$ ), de gel, care este instabil și greu de aplicat (doar cu seringă, dacă viscozitatea îi permite trecerea prin ac), și care eliberează doxiciclina foarte rapid (în câteva ore), așa cum rezultă din documentele prezentate mai sus, membrana prezentei invenții prezintă avantajul că are o grosime de 0,2 mm (față de matrice - 5 mm), este foarte ușor de manipulat și modelat după necesități, are o structură densă și se degradează în 21...28 zile. De asemenea, biocompatibilitatea și nicio altă proprietate biologică nu au fost studiate în documentele din stadiul tehnicii.

Avantajul invenției este că sistemul de cedare a medicamentelor pe bază de collagen și doxiciclină sub formă membrane, odată introdus în sacul parodontal sau la nivelul țesutului gingival infectat, în contact cu acesta, se resoarbe într-o anumită perioadă de timp (de la 21 la 28 zile), și eliberează în același timp, în mod controlat, medicamentul (antibiotic cu spectru larg - doxiciclina). În timpul de resorbție, componentele bioactive acționează astfel: antibioticul - doxiciclina are rolul de a distruge microorganismele din țesuturile infectate, iar collagenul regenerează țesutul lezat.

Având în vedere incidența mare a bolii parodontale, problema tehnică pe care o rezolvă invenția constă în realizarea unui sistem de eliberare controlată a unui medicament (doxiciclina) dintr-un suport polimeric natural (collagenul) reticulat, astfel încât eliberarea medicamentului și degradarea suportului să se facă în același timp, controlat, și să asigure, pe de o parte, tratamentul - profilaxia infecției, și, pe de altă parte, regenerarea țesutului gingival și a osului.

# RO 128972 B1

1 Membranele colagenice, conform invenției, înlătură dezavantajele menționate prin aceea  
că sunt constituite din următoarele componente, exprimate în procente gravimetrice raportate  
3 la 100% colagen substanță uscată:

5 a) un polimer natural, colagen fibrilar tip I, obținut din derma pielii de vițel, sub formă de  
gel, cu structură nativă triplu helicoidală, cu un conținut de 1,1...2,2% colagen substanță uscată,

7 b) 0,1...0,5% hclat de doxiciclină sub formă de soluție în apă distilată, se amestecă în  
colagenul gel, și

9 c) 0,15...0,9% agent de reticulare, glutaraldehidă care se amestecă în compoziția finală,  
sub formă de soluție 0,2...0,3% în apă distilată. Procedul de obținere a membranelor colagen-  
doxiciclină constă în aceea că, în prealabil, gelul de colagen se amestecă cu soluția de hclat  
11 de doxiciclină în apă distilată, se omogenizează, se ajustează la pH-ul de 7,4 cu hidroxid de  
sodiu 1M, și se adaugă apă distilată până ce compoziția finală conține 1,5% colagen substanță  
13 uscată, apoi se adaugă agent de reticulare. Compoziția obținută, sub formă de gel de colagen-  
doxiciclină reticulat, se liofilizează, obținându-se o structură poroasă densă, care este apoi  
15 presată la rece. Se obțin astfel membrane cu o grosime de 0,1...0,4 mm, care conțin 5 mg  
colagen (substanță uscată) și 1 mg doxiciclină pe 1 cm<sup>2</sup>.

17 Colagenul are rolul de a regenera țesuturile, și este și un foarte bun hemostatic, iar  
doxiciclina este un antibiotic cu spectru larg de acțiune, recunoscut în tratamentul parodontozei.

19 Membrana de colagen este resorbabilă în timp (peste 21 zile), iar doxiciclina este cedată  
în proporție de 50% în primele 8 h, și 80% în 3 săptămâni. Produsul a fost testat din punct de  
21 vedere microbiologic pe *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* și *Pseudomonas aeruginosa*  
și fungi și levuri, iar rezultatul a fost ABSENT pentru toate bacteriile studiate.

23 Membrana de colagen cu doxiciclină este biocompatibilă, testarea pe celule endoteliale  
și fibroblaste prezentând fenotipuri normale, bine dezvoltate. De asemenea, testele clinice pe  
25 pacienții cu parodontoză au arătat că membrana de colagen cu doxiciclină este foarte eficientă,  
ducând la o îmbunătățire a stării de sănătate încă din primele zile, iar în 3 săptămâni refacerea  
27 a fost completă în majoritatea cazurilor.

Aplicarea invenției conduce la următoarele avantaje:

29 - realizarea unui tratament cu aplicare locală/topică pentru boala parodontală sau infecții  
gingivale, sub forma unor sisteme de eliberare a medicamentelor, manifestate prin cedarea  
31 controlată a doxiciclinei dintr-un suport polimeric natural, colagenul;

33 - utilizarea sistemelor de cedare topică este mult mai avantajoasă, comparativ cu  
administrarea sistemică, deoarece sunt evitate limitările impuse de efectul primului pasaj  
hepatic, și sunt eliminate riscurile și inconvenientele terapiei intravenoase;

35 - membranele de colagen cu doxiciclină furnizează un mediu propice regenerării  
țesuturilor, sunt biocompatibile, biodegradabile în timp, permițând celulelor să-și sintetizeze  
37 propria matrice într-o perioadă de 3 săptămâni, netoxice, și eliberează medicamentul  
(doxiciclina) controlat în 21...28 de zile.

39 Descrierea detaliată a invenției:

41 Gelul de colagen fibrilar tip I, obținut din piele de bovină, având o concentrație de  
colagen de 1,1...2,2% (w/w), este utilizat în această invenție. Cenușa și grăsimea trebuie să fie  
nedetectabile la analiza calitativă și cantitativă, iar pH-ul gelului este acid, 2...3,5.

43 Hclatul de doxiciclină utilizat în această invenție este o substanță medicamentoasă  
comercială, care trebuie să aibă o puritate de peste 97% și solubilitate în apă de 50 mg/ml.

45 Mai pot fi utilizate și alte forme ale doxiciclinei, cum ar fi vibramicina sau clorhidratul de  
doxiciclină.

47 Agentul de reticulare este aldehida glutarică, ce trebuie să fie 0,15...0,9% raportat la  
conținutul de colagen.

# RO 128972 B1

Invenția va fi explicată mai în detaliu prin următoarele exemple: 1

## Exemplul 1

În această invenție a fost utilizat un gel de colagen fibrilar tip I, cu o concentrație gravimetrică de 2%, 97,5% apă și pH-ul de aproximativ 2...3. O soluție de doxiciclină a fost preparată anterior, prin amestecarea a 0,2% hieclat de doxiciclină (raportat la gelul de colagen) cu apă distilată. Soluția de doxiciclină obținută a fost încorporată în gel, iar pH-ul a fost ajustat la 7,4 cu 1M hidroxid de sodiu, și a fost adăugată apă până când compoziția finală a avut 1,5% colagen, apoi a fost reticulată cu 0,5% glutaraldehidă. Gelul de colagen a fost turnat în tăvi de inox, și liofilizat după următorul program de liofilizare: tăvile cu gel au fost introduse pe rafturile liofilizatorului, răcite în prealabil la  $-40^{\circ}\text{C}$ , pentru a obține o porozitate constantă a probelor, și menținute 10 h. Acest proces continuă cu liofilizarea (extragerea apei sub vid) la presiunea de 0,12 mbar și temperatura de  $-40^{\circ}\text{C}$ . Pe parcursul liofilizării, temperatura se mărește treptat, ajungând la  $+10^{\circ}\text{C}$  în 10 h, la  $+20^{\circ}\text{C}$  în 8 h și la  $+35^{\circ}\text{C}$  în 12 h. Etapa finală a durat 8 h, păstrându-se aceeași presiune, iar temperatura finală a rafturilor a ajuns la  $35^{\circ}\text{C}$ . Probele au fost obținute în formă spongioasă densă, de culoare galben-verzui deschis, datorită conținutului de antibiotic. Folia spongioasă a fost apoi presată la rece, obținându-se membrana de colagen cu doxiciclină cu un conținut de  $1\text{ g/cm}^2$  și o grosime de 0,2 mm. 3 5 7 9 11 13 15 17

## Exemplul 2

Gelul compozit pe bază de colagen și doxiciclină a fost obținut prin procesul descris în exemplul 1, exceptând procentul de colagen utilizat, care a fost 1,2% (raportat la colagen substanță uscată). Procesul de liofilizare a fost similar cu cel descris în exemplul 1. Folia spongioasă obținută nu a fost presată, membrana de colagen cu doxiciclină având un conținut de  $1\text{ g/cm}^2$  și o grosime de 4 mm. 19 21 23

## Exemplul 3

Gelul compozit pe bază de colagen și doxiciclină a fost obținut prin procesul descris în exemplul 2, exceptând procentul de doxiciclină utilizată, care a fost 0,5% (raportat la colagen substanță uscată). Procesul de liofilizare a fost similar cu cel descris în exemplul 2. Folia spongioasă obținută a fost presată, membrana de colagen cu doxiciclină având un conținut de  $2,5\text{ g/cm}^2$  și o grosime de 0,2 mm. 25 27 29

## Exemplul 4

Gelul compozit pe bază de colagen și doxiciclină a fost obținut prin procesul descris în exemplul 2. Procesul de liofilizare a fost similar cu cel descris în exemplul 3. Folia spongioasă obținută a fost presată la rece, membrana de colagen cu doxiciclină având un conținut de  $1\text{ g/cm}^2$  și o grosime de 0,1 mm. 31 33

## Exemplul 5

Gelul compozit pe bază de colagen și doxiciclină a fost obținut prin procesul descris în exemplul 1, exceptând procentul de agent de reticulare (aldehida glutarică) utilizat, care a fost de 0,8% (raportat la colagen substanță uscată). Procesul de liofilizare a fost similar cu cel descris în exemplul 4. Folia spongioasă obținută a fost presată și s-a obținut o membrană densă, similară cu cea descrisă în exemplul 1, având un conținut de  $1\text{ g/cm}^2$  și o grosime de 0,2 mm. 35 37 39 41

## Exemplul 6

Gelul compozit pe bază de colagen și doxiciclină a fost obținut prin procesul descris în exemplul 1. Procesul de liofilizare a fost similar cu cel descris în exemplul 5, exceptând programul de înghețare, care a fost de 5 h în loc de 10 h, și temperatura finală, de 5 h în loc de 8 h; astfel, procesul de liofilizare a fost scurtat la 40 h. Folia spongioasă obținută a fost presată și s-a obținut o membrană densă similară celei descrise în exemplul 1, având un conținut de  $1\text{ g/cm}^2$  și o grosime de 0,2 mm. 43 45 47

# RO 128972 B1

1 Membrana obținută în această invenție este un sistem de eliberare controlată a unui  
medicament (doxiciclină) dintr-un suport polimeric natural (colagenul) reticulat, astfel încât  
3 eliberarea medicamentului și degradarea suportului să se facă în același timp, controlat, și să  
asigure, pe de o parte, tratamentul/profilaxia infecției și, pe de altă parte, regenerarea țesutului  
5 gingival și a osului.

Membrana conform invenției prezintă biocompatibilitate cu celulele endoteliale, activitate  
7 antimicrobiană împotriva *Porphyromonas gingivalis*, un grad ridicat de osteogeneză în trata-  
mentul osului infectat, așa cum arată studiile pe animale [Kutan și colab., **Archives of Oral**  
9 **Biology 63 (2016), 15-21**], precum și regenerarea țesutului moale și a osului în timp de 1 până  
la 3 luni, așa cum se arată în fig. 1 și 2.

11 Membrana conform invenției a fost utilizată într-un studiu clinic ale cărui rezultate se  
prezintă în continuare.

13 Primul caz a fost al unei paciente în vârstă de 68 de ani, care nu fumează, având  
implanturi făcute în urmă cu 8 ani. Unul dintre implanturi a prezentat retracție osoasă pe  
15 jumătate din lungimea implantului. S-au introdus bucăți decupate din membrana invenției, de  
3 ori, în decurs de o lună și jumătate. După 2 săptămâni s-a observat oprirea procesului de  
17 retracție și, după aproximativ o lună și jumătate, a început refacerea osoasă.

Al doilea caz este al unui pacient în vârstă de 30 de ani, cu o pungă parodontală de  
19 9 mm în partea mezială și vestibulară, al doilea dinte 46. Membrana conform invenției s-a  
aplicat de 4 ori în decurs de 3 luni și jumătate. La sfârșitul perioadei de studiu, s-a observat pe  
21 radiografie retracția pungii parodontale și umplerea cu os.

# RO 128972 B1

## Revendicări

- 1 Membrană de colagen cu doxiciclină, pentru uz stomatologic, **caracterizată prin aceea că** este constituită din următoarele componente, exprimate în procente gravimetrice raportate la 100% colagen substanță uscată: 3 5
- a) un polimer natural, colagen fibrilar tip I, obținut din derma pielii de vițel, sub formă de gel, cu structură nativă triplu helicoidală, cu un conținut de 1,1 până la 2,2% colagen substanță uscată, peste care se adaugă componentul 7
- b) 0,1 până la 0,5% hclat de doxiciclină soluție în apă distilată, și 9
- c) 0,15 până la 0,9% agent de reticulare, glutaraldehidă, care se amestecă în compoziția finală sub formă de soluție 0,2 până la 0,3% în apă distilată. 11
2. Procedeu de obținere a membranei de colagen cu doxiciclină, pentru uz stomatologic, definită în revendicarea 1, **caracterizat prin aceea că**, în prealabil, gelul de colagen cu soluția de doxiciclină se omogenizează, se ajustează pH-ul la 7,4 cu hidroxid de sodiu 1M, și se adaugă apă distilată până ce compoziția finală conține 1,5% colagen substanță uscată, apoi se reticulează. Compoziția obținută, sub formă de gel, se toarnă în tăvi de inox și se liofilizează după următorul program de liofilizare: înghețare la -40°C, pentru a obține o porozitate constantă a probelor, timp de 10 h, liofilizare la presiunea de 0,12 mbar și temperatura de -40°C, continuată cu liofilizare la +10°C în 10 h, la +20°C în 8 h, și la +35°C în 12 h și la aceeași presiune, apoi liofilizarea finală este continuată 8 h, la o presiune de 0,001 mbar și la o temperatură de 35°C, obținându-se o formă spongioasă densă, de culoare galben-verzui deschis, datorită conținutului de antibiotic ce apoi se presează la rece, obținându-se membrana de colagen cu doxiciclină, pentru uz stomatologic, cu un conținut de 1 g/cm<sup>2</sup> și o grosime de 0,2 mm. 13 15 17 19 21 23

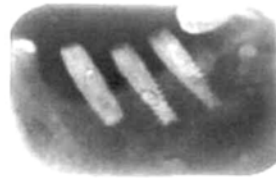
(51) Int.Cl.

A61K 31/65 (2006.01),

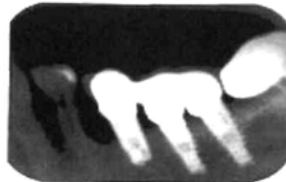
A61Q 11/02 (2006.01)



06.04.2014

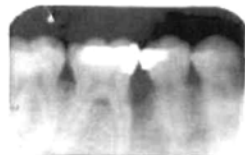


15.04.2014

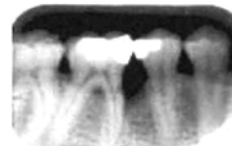


15.05.2014

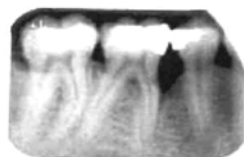
Fig. 1



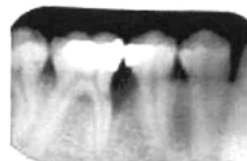
25.06.2014



14.08.2014



04.09.2014



02.10.2014

Fig. 2

