



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2013 00744

(22) Data de depozit: 17.10.2013

(41) Data publicării cererii:
30.06.2014 BOPI nr. 6/2014

(71) Solicitant:
• INSTITUTUL NAȚIONAL DE CERCETARE
DEZVOLTARE PENTRU ȘTIINȚE
BIOLOGICE BUCUREȘTI,
SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR. 296,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:
• OPRÎȚA ELENA IULIA,
STR. VĂLEA IALOMIȚEI NR. 6, BL. C 10,
ET. 9, SC. C, AP. 184, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;
• CIOTEC ANDREEA CĂTĂLINA LAVINIA,
STR. APEDUCTULUI NR. 3, BL. C4A, SC. 2,
ET. 3, AP. 33, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B,
RO;
• DOBRE ANA-MARIA,
STR. VISTIERNICUL STRAVRINOS NR. 17,
BL. 56, SC. D, ET. 1, AP. 44, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;

• RUGINĂ ALEXANDRINA MARIA,
STR. LUICĂ NR. 21, BL. 7, SC. 2, AP. 67,
SECTOR 4, O.P. 7, BUCUREȘTI, B, RO;
• CALU LARISA NICOLETA, ALEEA
MUGURILOR NR. 9, BL. H5, SC. 2, AP. 40,
ET. 4, BRĂILA, BR, RO;
• LUNGU MARIA MAGDALENA,
STR. SOLDAT NEDELICU NR. 2,
FĂLTICENI, SV, RO;
• SIDOROFF MANUELA ELISABETA,
STR. DRUMUL TABEREI NR. 138, BL. 715,
SC. A, ET. 1, AP. 1, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;
• IORDĂCHEL CĂTĂLIN, STR. NOVACI
NR. 11, BL. P 33, SC. 2, AP. 48, SECTOR 5,
BUCUREȘTI, B, RO;
• BRATOSIN DANIELA, STR. TRESTIANA
NR. 5, BL. 9, SC. 1, ET. 6, AP. 24,
SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO

(54) SUPORT IMPLANTABIL PE BAZĂ DE ALGINAT (MICROBILE
DE ALGINAT) SUPLIMENTAT CU DIPEPTIDUL
GLICIL-GLICINĂ DESTINAT APLICAȚIILOR DIN MEDICINA
REGENERATIVĂ

(57) Rezumat:

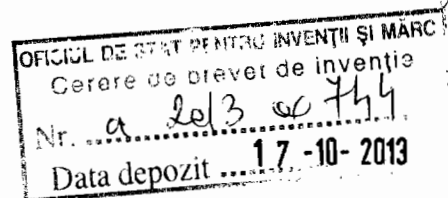
Invenția se referă la un suport implantabil, destinat aplicațiilor din medicina regenerativă. Suportul conform invenției se obține prin amestecarea unui sediment celular, într-o concentrație de 4×10^5 celule/ml, cu o soluție constând din 0, 06 g alginat de sodiu dizolvat în 5 ml NaCl soluție de concentrație 155 mM, suplimentat cu 50 μ M...100 mM soluție de dipeptid H-Gly-Gly-OH, după care amestecul celule-alginat este transferat în

picătură în 70 ml soluție CaCl_2 , rezultând microbule de alginat de sodiu care se cultivă într-un mediu de cultură, în condiții standard, într-un raport 10...12 microsferă/ml, timp de 9 zile.

Revendicări: 2
Figuri: 3

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).





DESCRIEREA INVENȚIEI

SUPPORT IMPLANTABIL PE BAZĂ DE ALGINAT (MICROBILE DE ALGINAT) SUPPLEMENTAT CU DIPEPTIDUL GLICIL-GLICINĂ DESTINAT APLICAȚIILOR DIN MEDICINA REGENERATIVĂ

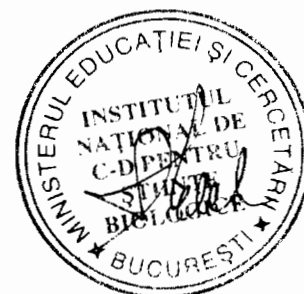
Invenția se referă la un suport (biomaterial) implantabil pe bază de alginat de sodiu (microbile de alginat) suplimentat cu dipeptidul Glicil-Glicină (H-Gly-Gly-OH) ($C_4H_8N_2O_3$), condiționat sub formă de gel cu aplicații în medicina regenerativă (defecte osoase, afecțiuni dermice, afecțiuni degenerative ale cartilajului, etc.) și un procedeu de obținere al acestuia.

Alginatul este un polizaharid natural, anionic și hidrofilic, derivat în principal din alge brune și bacterii. Alginatul este compus din (1-4) acid β -d-manuronic și resturi de acid α -l-guluronic legat fie aleatoric (la întâmplare), fie ca blocuri homopolimerice. Raportul dintre cele două zaharuri (acizi manuronic/guluronic) este în general de 1,5 cu unele diferențe în funcție de sursă.

Alginatul permite obținerea unei game variate de biomateriale, matrici suport sau sistem de livrare utilizate în medicina regenerativă. Condiționat într-o varietate de forme: hidrogeluri moi (în prezența calciului), geluri elastice, microsfele, fibre, spume, nanoparticule, multistrat, alginatul a fost folosit frecvent în ingineria tisulară (eliberare de medicamente (drug delivery), material pentru încapsularea celulară și vehicul injectabil pentru transplantarea celulelor) datorită proprietăților sale remarcabile: biocompatibilitate, biodegradabilitate, nonantigenicitate, costul relativ scăzut și gelificarea ușoară cu cationi bivalenți (Santana B.P. et al., *BioMed Research International*, Vol.2013, Article ID 307602, 6p, 2013; Sun J. and Tan H., *Materials*, 6, 1285-1309, 2013).

Modificarea moleculei de alginat a condus la obținerea unei game variate de biomateriale pe bază de alginat pentru repararea și regenerarea diferitelor țesuturi cum ar fi pielea, cartilajul și țesutul osos.

Invenția WO/2011/104131A1 extinsă și la US20120315307 se referă la o metodă de obținere a unui hidrogel în care sunt amestecate alginatul, chitosanul și celulele formatoare de cartilaj, ulterior, polimerizat în microbile.



Documentul WO2012167223 A1 se referă la utilizarea de algiinați, modificați chimic pentru a spori biocompatibilitatea și ajustarea proprietățile lor fizice, pentru încapsularea celulelor, în special a celulelor insulelor pancreatice, precum și metode de tratare a bolilor sau a anomaliilor, inclusiv diabetul zaharat, prin implantarea celulelor încapsulate.

Invenția, prezentată de documentul US 7988962, descrie o metodă de cultivare *in vitro/ex vivo* a celulelor țesutului conjunctiv sau celulelor progenitoare (de exemplu, celule condrogenice) într-o matrice de alginat polisulfat. Aceste celule cultivate pot fi utilizate la obținerea unui medicament pentru tratamentul/prevenirea defectelor osteocondrale. Invenția descrie, de asemenea, o matrice care cuprinde alginat polisulfat și celule ale țesutului conjunctiv mamalian sau celule progenitoare ale acestuia.

Problema tehnică pe care urmărește să o rezolve invenția constă în repararea și regenerarea diferitelor țesuturi (osos, dermic, cartilajinos, și altele), în cazul traumatismelor, defectelor osoase, afecțiunilor degenerative ale cartilajului, afecțiunilor dermice și altele, prin suplimentarea alginatului cu dipeptidul H-Gly-Gly-OH, pentru o mai bună proliferare celulară și o creștere a viabilității celulare.

Produsul, conform invenției reprezintă un suport (biomaterial) implantabil, biocompatibil și bioresorbabil, un vehicul injectabil pentru transplantarea celulelor destinat aplicațiilor din medicina regenerativă și este constituit din soluția A reprezentată de 0.06 g alginat de Na dizolvat în 5 mL soluție de NaCl, de concentrație 155mM, suplimentat cu concentrații diferite de soluție de dipeptid H-Gly-Gly-OH, de la 50 μ M până la 10mM, în care este înglobat sedimentul celular (cultură de fibroblaste, condrocite, etc., în concentrație de 4×10^5 celule/mL) și soluția B ce conține 70 mL soluție CaCl₂ de concentrație 102 mM.

Procedeele de obținere al produsului, conform invenției, constă în aceea că se realizează un suport implantabil biocompatibil și biodegradabil (microbile de alginat) prin amestecarea sedimentului celular (fibroblaste, osteoblaste, condrocite umane, celule stem, etc.), în concentrație de 4×10^5 celule/mL, cu soluția A obținută din 0.06 g alginat de sodiu dizolvat în 5 mL soluție de NaCl, de concentrație 155 mM, în care s-au adăugat concentrații diferite de soluție de dipeptid H-Gly-Gly-OH de la 50 μ M la 10mM. Suspensia celule-alginat de sodiu obținută este transferată ulterior picătură cu picătură în 70 mL soluție CaCl₂ de concentrație 102mM, realizându-se astfel polimerizarea și încapsularea celulelor în microbilele de alginat. Ulterior microbilele se spală cu mediul de cultură (spre exemplu, DMEM) și se cultivă în continuare în



mediul de cultură, în condiții standard (37°C și 5% CO_2), în raport de 10-12 microsferă/mL, timp de 9 zile (Figura 1).

Analiza citotoxicității biomaterialului obținut s-a efectuat prin microscopie optică, microscopie de fluorescență și microscopie electronică de baleiaj (SEM).

Astfel, microscopia optică și SEM (Figura 2 și Figura 3) au arătat o proliferare crescută a celulelor (fibroblaste de șobolan), înglobate în gelul de alginat de sodiu suplimentat cu H-Gly-Gly-OH, iar prin microscopia de fluorescență s-a observat o viabilitate celulară superioară demonstrată de intensitatea de fluorescență a produsului de clivare (calceina) din componența kitului Live/Dead (Molecular Probes, Invitrogen).

Produsul, obținut în conformitate cu prezenta invenție, prezintă următoarele avantaje:

- ✓ Produsul asigură o imobilizare/încapsulare eficientă a celulelor (celule stem mezenchimale, fibroblaste, celule cartilajinoase și altele) furnizând un număr eficient-corespunzător de celule la locul de implantat;
- ✓ Biomaterialul prezintă un factor suplimentar de creștere reprezentat de dipeptidul H-Gly-Gly-OH, care stimulează proliferarea și creșterea viabilității celulare, metabolismul celular, inhibă fenomenul de apoptoză și are efect antioxidant;
- ✓ Suportul este biocompatibil și biodegradabil, demonstrat prin lipsa toxicității suportului tridimensional (3-D) (microbale de alginat) cât și a factorului stimulant, respectiv dipeptidul H-Gly-Gly-OH;
- ✓ Biomaterialul este ușor de manipulat și implantabil;
- ✓ Procedul de obținere este relativ simplu și fezabil.

EXEMPLU

Soluție de lucru de dipeptid H-Gly-Gly-OH, de concentrație 100 mM, filtrată în condiții sterile, se pastrează la -20°C până în momentul folosirii.

Cultura de condrocite umane ajunsă la confluență a fost tripsinizată, iar sedimentul celular obținut (4×10^5 celule/mL) a fost suspendat în soluția A obținută din 0.06 g alginat de sodiu dizolvat în 5 mL soluție de NaCl, de concentrație 155 mM, suplimentat cu concentrația de $100 \mu\text{M}$ de dipeptid H-Gly-Gly-OH. Suspensia celule – alginat de sodiu obținută a fost transferată



apoi, picătură cu picătură, prin ac de seringă 18G, în soluția B, ce conține 70 mL soluție CaCl_2 de concentrație 102 mM pentru polimerizarea soluției de alginat de sodiu determinând astfel încapsularea celulelor din suspensie în microbule. Microbulele de alginat de sodiu astfel obținute au fost spălate cu mediul de cultură (DMEM) și cultivate în continuare în mediul de cultură, în condiții standard, în raport de 10-12 microsferă/mL, timp de 9 zile.



REVENDICĂRI

1. Produs implantabil pe bază de alginat de sodiu suplimentat cu dipeptidul Glicil-Glicină (H-Gly-Gly-OH) destinat înglobării celulelor pentru transplantarea acestora în medicina regenerativă, caracterizat prin aceea că se prezintă ca un suport biocompatibil (microbile) și este constituit din soluția A reprezentată de 0.06 g alginat de Na dizolvat în 5 mL soluție de NaCl, de concentrație 155 mM, suplimentat cu concentrații diferite de soluție de H-Gly-Gly-OH de la 50 μ M la 10mM, în care este înglobat sedimentul celular (ex: 4×10^5 celule/mL cultură de fibroblaste, celule stem, osteoblaste, condrocite, etc.) și transferat în soluția B ce conține 70 mL soluție CaCl₂, de concentrație 102 mM.
2. Procedeu de obținere a produsului implantabil definit la revendicarea 1, caracterizat prin aceea că se realizează un suport biocompatibil (microbile) prin amestecarea unui sediment celular (fibroblaste, condrocite umane, etc.), în concentrație de 4×10^5 celule/mL, cu soluția A obținută din 0.06 g alginat de sodiu dizolvat în 5 mL soluție de NaCl, de concentrație 155 mM, în care s-au adăugat concentrații diferite de soluție de H-Gly-Gly-OH de la 50 μ M la 10mM. Amestecul celule-alginat de sodiu obținut este transferat ulterior, picătură cu picătură, în 70 mL soluție CaCl₂ de concentrație 102mM, având loc polimerizarea și încapsularea celulelor în microbilele de alginat. Microbilele de alginat de sodiu astfel obținute se spală cu mediul de cultură (DMEM) și se cultivă în continuare în mediul de cultură, în condiții standard, în raport de 10-12 microsferă/mL, timp de 9 zile.



DESENE

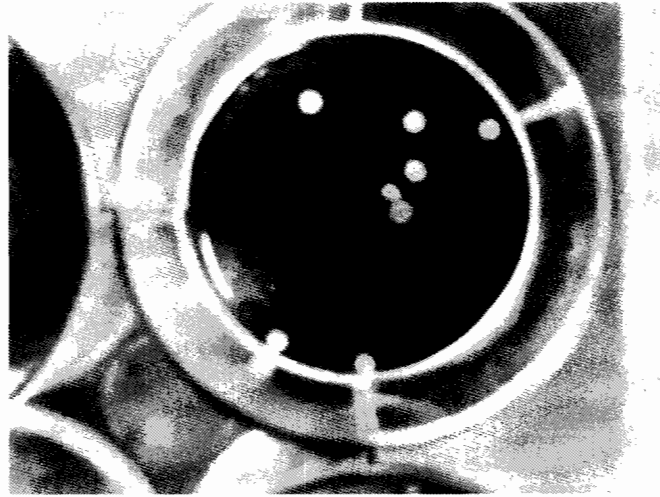


Figura 1. Biomaterial implantabil obținut prin cultivarea celulelor în microbule de alginat de sodiu suplimentat cu soluție de H-Gly-Gly-OH de concentrație 200 μ M.

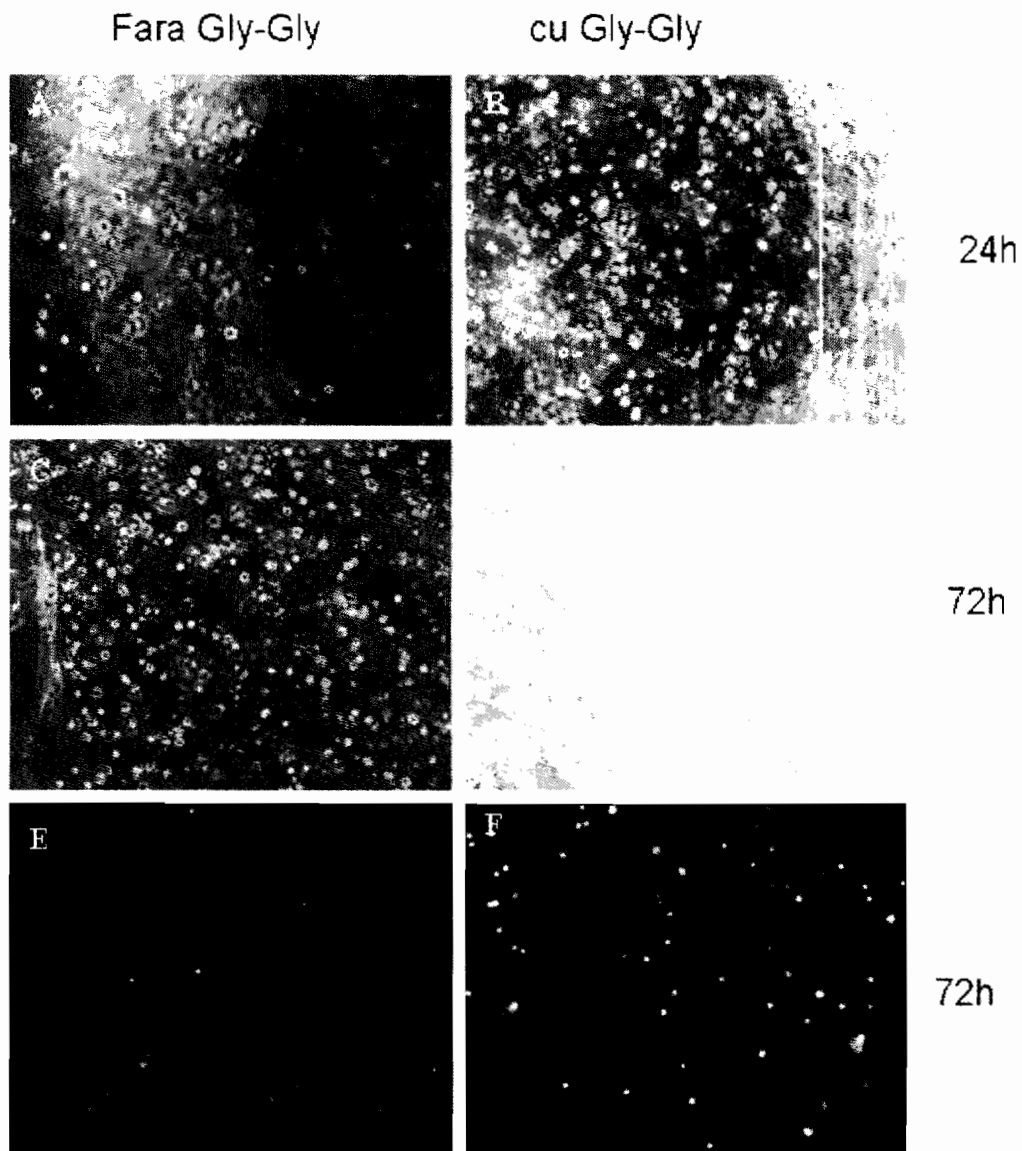


Figura 2. Analiza microscopică a celulelor cultivate în suport (microbule de alginat) fără suplimentare și cu suplimentare de dipeptid H-Gly-Gly-OH de concentrație 200 μ M, după 24 h și 72h de cultivare.

Microscopie optică: A, B, C, și D (10x)

Microscopie de fluorescență: E și F (10x)

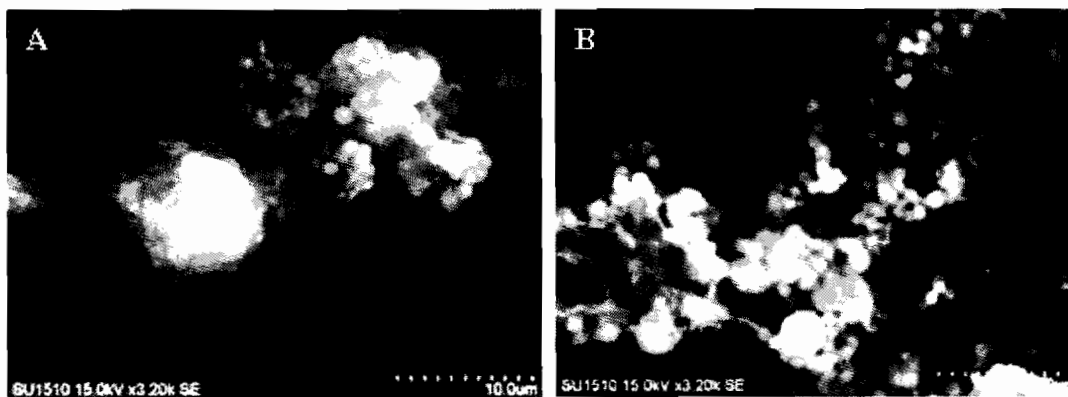


Figura 3. Analiza prin microscopie electronică de scanare (SEM) a celulelor cultivate în suport (microbule de alginat de sodiu) fără suplimentare (A) și cu suplimentare (B) de dipeptid H-Gly-Gly-OH la o concentrație de 200 μ M, după 72h de cultivare.