



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2016 00785

(22) Data de depozit: 03/11/2016

(41) Data publicării cererii:
30/06/2017 BOPI nr. 6/2017

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

(72) Inventatori:
• OPRIȚA ELENA IULIA,
STR. VĂLEA IALOMIȚEI NR. 6, BL. C 10,
ET. 9, SC. C, AP. 184, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;
• GASPĂR PINTILESCU ALEXANDRA,
ȘOS. COLENTINA NR. 55, BL. 83, SC. 1,
AP. 17, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;

• MOLDOVAN LUCIA,
BD. CONSTRUCTORILOR NR. 24, BL. 19,
SC. A, ET. 2, AP. 13, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;
• CRĂCIUNESCU OANA,
BD. NICOLAE GRIGORESCU NR. 33, BL. A 1,
SC. 3, AP. 33, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B,
RO;
• TATIA RODICA,
STR. EROU ADRIAN FULGA NR. 3,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
• TOMA AGNES ELENA,
STR. DRUMUL BACRIULUI NR. 40A, AP. 4,
SAT ROȘU, COMUNA CHIAJNA, IF, RO

(54) PANSAMENTE DE COLAGEN ÎMBOGĂȚITE
CU POLIFENOLI ȘI POLIZAHARIDE CU EFECTE
REGENERATIVE ÎN VINDECAREA RĂNILOR

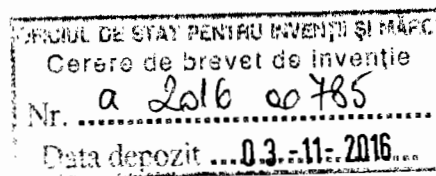
(57) Rezumat:

Invenția se referă la un pansament compozit pentru tratarea unor afecțiuni cutanate, și la un procedeu pentru obținerea acestuia. Pansamentul conform invenției este constituit din 40...70% gel de colagen tip I cu greutatea moleculară medie 300...350 kDa, 10...30% condroitin sulfat cu greutatea moleculară medie 10...30 kDa, 10...25% extract hidroalcoolic de pelin (*Artemisia absinthium*) conținând 5...60 mg/ml polifenoli, 1...10 mg/ml polizaharide și 0,05...1% riboflavină.

Procedeu conform invenției constă în amestecarea a 70...90 părți compoziție formată din soluție vâscoasă de colagen tip I și soluție apoasă de condroitin sulfat, cu 30...10 părți compoziție formată din extract hidroalcoolic de pelin, la temperatura camerei, timp de 20...60 min, amestecul se reticulează cu 5...10 părți riboflavină și se condiționează sub formă de pansament biocompatibil.

Revendicări: 2





24

DESCRIEREA INVENTIEI

Pansamente de colagen imbogatite cu polifenoli si polizaharide cu efecte regenerative in vindecarea ranilor

Elena Iulia Oprita, Alexandra Gaspar Pintiliescu, Lucia Moldovan, Oana Craciunescu, Rodica Tatia, Agnes Toma

Inventia se refera la un pansament compozit pe baza de colagen si condroitin sulfat imbogatit cu polifenoli si polizaharide de origine vegetala, obtinute din pelin, cu actiune in tratare si vindecarea unor afectiuni cutanate (rani, arsuri usoare) si la procedeul de obtinere al acestuia.

Se cunoaste ca pansamentele pe baza de colagen (proteina cea mai raspandita in tesutul conjunctiv, biocompatibila, biodegradabila si slab imunogena) sunt utilizate pe scara larga in procesul de vindecare a ranilor, stimuland cresterea si proliferarea celulara, angiogeneza, formarea tesutului de granulat si a epitelului la locul lezat (Parenteau-Bareil R., Gauvin R., Berthod F., *Materials*, 2010; 3:1863-1887). Asocierea acestuia cu compusi fenolici si flavonoide din extract de frunze de neem (*Azadirachta indica*) a asigurat proprietati anti-inflamatorii, antifibrotice, analgezice, readucand organismul la functionarea normala si asigurand substratul pentru celulele implicate in procesul de vindecare a ranilor (Viji Chandran S., Trikkurmadom S.A., Rajalekshmi G., Sujatha S., Pandimadevi M. and Pandimadevi M., *Int J Pharm Bio Sci*, 2015; 6(3):1365-1389).

Condroitin sulfatul este un polizaharid intalnit in matricea extracelulara a tesutului dermic, cunoscut prin capacitatea sa de a stimula proliferarea si migrarea celulelor implicate in sinteza noului tesut, in cazul leziunilor cutanate.

De asemenea, este cunoscut faptul ca, in ultimii ani, s-au intensificat studiile de explorare a plantelor medicinale in regenerarea pielii datorita stimulării regenerării tesutului epitelial in timpul vindecării ranilor, activității lor antioxidante (Oana Craciunescu, Daniel Constantin, Alexandra Gaspar, Liana Toma, Elena Utoiu and Lucia Moldovan, *Chemistry Central Journal*, 2012;6:97), anti-inflamatorii (Kim H.P., Son K.H., Chang H. W., Kang S.S., *Journal of Pharmacological Sciences*, 2004;96(3):229-245), inhibării enzimelor care împiedică procesul de vindecare a ranilor (colagenaze și mieloperoxidaze) (Francesco Antonio, Rocasalbas

Guillem, Touriño Sonia, Mattu Clara, Gentile Piergiorgio, Chiono Valeria, Ciardelli Gianluca, Dr. Tzanko Tzanov, *Biotechnology Journal*, 2011;6(10): 1208-1218) și proprietăților antimicrobiene (Amal B., Veena B., Jayachandran V.P., Shilpa J, *J Mater Sci:Mater Med*, 2015; 26:181).

Cercetări anterioare au indicat faptul că pelinul (*Artemisia absinthium*) conține diferite clase de compuși chimici de tipul uleiurilor esențiale, polifenolilor, flavonoidelor, și lactonelor terpenice (Kamel Msaada, Nidhal Salem, Olfa Bachrouch, Slim Bousselmi, Sonia Tammar, Abdulkhaleg Alfaify, Khaldoun Al Sane, Wided Ben Ammar, Sana Azeiz, Adel Haj Brahim, Majdi Hammami, Sawsen Selmi, Ferid Limam, and Brahim Marzouk, *Journal of Chemistry*, 2015, Volume 2015, Article ID 804658, 12 pages) responsabile de proprietățile antiseptice, antiinflamatoare, diuretice, antibacteriene, carminative, antipiretice, antiparazitare sau cicatrizante atribuite acestuia (Scarlat Mihai Alin, Tohaneanu Monica, *Bazele fitoterapiei*, Ed. Word Galaxy, 2009, ISBN 979-973-86333-8-3). De asemenea, polizaharidele din compoziția speciilor *Artemisia* au prezentat proprietăți imunomodulatoare, de inhibare a speciilor reactive de oxigen (Xie G., Schepetkin I.A., Siemsen D.W., Kirpotina L.N., Wiley J.A., Quinn M.T., *Phytochemistry*. 2008;69(6):1359-71), antitumorale (Koo, K., Kwak, J., Lee, K., Zee, O., Woo, E., Park, H., et al. (1994). *Arch Pharma Res*, 17(5), 371–374), dar și capacitate de inducere a procesului de diferențiere a celulelor dendritice derivate din măduva osoasă (Lee, J.A., Sung, H.N., Jeon, C.H., Gill, B.C., Oh, G.S., Youn, H.J. et al. (2008). *Int Immunopharmacol*, 8(4), 534–541).

Se cunosc studii prin care se încearcă combinarea sub diferite forme (filme, pansamente, bureți) a caracteristicilor colagenului cu proprietățile plantelor medicinale în vederea stimulării regenerării tegumentului în cazul ranilor și arsurilor (Muthukumar T., Sastry T.P., *J Colloids and Surface B: Biointerfaces*, 2013;113:207-212; Viji Chandran S., Trikkurmadom S.A., Rajalekshmi G., Sujatha S., Pandimadevi M. and Pandimadevi M., *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.*, 2015;32(2):193-199).

De asemenea, **brevetul US5578307/26 Nov 1996** se referă la obținerea de peleturi sau sfere conținând extracte de plante, în special Aloe vera și care cuprind o dispersie a extractului de plante într-o matrice compusă predominant dintr-un amestec de colagen, hidrolizat de colagen, gelatina, gelatina fractionată, derivat de gelatina, proteina vegetală, hidrolizat de proteina vegetală și amestecuri ale acestora. Ele sunt stabile la depozitare și caracteristicile lor farmacologice și cosmetice sunt, în esență, nemodificate comparativ cu extractul nativ.

Realizarea de biopreparate pentru vindecarea tegumentului lezat a fost raportata anterior, respectiv in **brevetul RO118929/2004**, care descrie un preparat format dintr-o emulsie continand ulei de in, apa de var si extract alcoolice de muguri de plop si urzica mare precum si in **brevetul RO122181 B1/2009** unde se prezinta compozitia unui hidrogel natural, constituit prin combinarea componentelor: colagen tip I si II, elastina alpha si kappa, glicozaminoglicani, carbomer, extract alcoolice de *Equisetum arvense* si *Achillea millefolium*, nipagin, nipasol si apa distilata.

Sunt cunoscute biopreparate peliculozene pe baza de extracte de plante medicinale si colagen hidrolizat cu efect protector, regenerativ si cicatrizant si procedeul de obtinere al acestora (**Brevetul A/00876 din 07.09.2011**). Inventia se refera la un unguent constituit din ceara de albina, cetaceum, vaselina, ulei de masline, oxid de zinc, fitocomplex liofilizat constituit din coada calului, coada soricelului, isop si echinacea, colagen hidrolizat, vitamina E, sulfat de neomicina, extract de samburi de grapefruit, ulei de levantica si apa purificata.

Prezenta propunere de brevet urmareste realizarea unor suporturi compozite, conditionate sub forma de membrane sau folii spongioase pe baza de colagen tip I, condroitin sulfat si componente biologice active (polifenoli, polizaharide) obtinute din extract vegetal de pelin, eficiente in vindecarea tegumentului lezat.

Produsul, conform inventiei, reprezinta un pansament compozit biocompatibil si biodegradabil, conditionat sub forma de membrane sau folii spongioase, constituit din 40...70% gel de colagen tip I cu greutatea moleculara medie de 300...350 kDa, 10...30 % condroitin sulfat cu greutatea moleculara medie de 10...30 kDa, 10...25% extract hidroalcolic de pelin (*Artemisia absinthium*) continand 5...60 mg/ml polifenoli si 1...10 mg/ml polizaharide, si 0,05...1,0% riboflavina.

Procedeul de obtinere al produsului, conform inventiei, consta in aceea ca se realizeaza membrane sau folii spongioase prin amestecarea a 70...90 parti compozitie I constituita din 60...80% solutie vascoasa de colagen tip I cu concentratia 0,5...1% si 20...40% solutie apoasa de condroitin sulfat cu concentratia 15...25 mg/ml cu 10...30 parti compozitie II formata din extract hidroalcolic de pelin bogat in polifenoli si polizaharide, cele doua compozitii se amesteca cu agitare puternica timp de 20...60 minute la temperatura camerei, amestecul obtinut se reticuleaza cu 5...10 parti solutie de riboflavina cu concentratia 0,01...0,05% si se conditioneaza fie prin

uscare la 35⁰C folosind uscatoare cu ventilatie pentru a obtine membrane omogene, fie se liofilizeaza prin inghetare la -40⁰C si uscure la 25...35⁰C pentru a obtine folii spongioase, dupa care variantele de pansament rezultate se taie la dimensiunile dorite, se ambaleaza si se sterilizeaza timp de 8...16 ore prin expunere la radiatii UV sau cu radiatii gamma.

Avantaje

Prezenta inventie prezinta urmatoarele avantaje:

- suporturile obtinute prezinta o eficienta mare in tratarea si vindecarea leziunilor tegumentare (arsuri, rani), continand in compozitia lor colagen si condroitin sulfat cu efect trofic si epitelizant;
- timpul de vindecare a tegumentului lezat este semnificativ redus datorita principiilor active care mimeaza caracteristicile matricei extracelulare naturale ale tesutului dermic
- produsul prezinta proprietati antimicrobiene, antiseptice, cicatrizante si anti-inflamatoare, datorita extractului de pelin;
- suporturile sunt bidegradabile, biocompatibile, rezistente mecanic si stabile in timp;
- modul de obtinere este fezabil si nu necesita echipamente cu grad ridicat de complexitate.

Prezenta propunere de inventie se ilustreaza prin urmatoarele exemple:

Exemplul 1

Etapa I:

Colagenul tip I a fost extras din tendon bovin prin metoda enzimatica, utilizand pepsina, dizolvata in prealabil intr-o solutie de acid acetic 0,5M, extractia se desfasoara timp de 48h, la temperatura de 4⁰C, apoi se realizeaza o purificare prin precipitare cu NaCl cristalizata si in final se dializeaza fata de apa distilata, pentru indepartarea urmelor de sare.

Partile aeriene (tulpini, frunze si flori) ale plantei medicinale *Artemisia absinthium* (pelin) au fost uscate la temperatura camerei timp de 4-5 zile si maruntite mecanic. Extractul vegetal s-a obtinut prin extractie hidroalcoolica in etanol/apa (70/30, v/v) intr-un raport material/solvent de 1:10 (w/v), cu agitare continua, timp de 8h. Extractul a fost separat de materialul rezidual prin decantare si filtrare dupa care s-a concentrat si uscat prin liofilizare.

Etapa II:

Intr-un vas de inox prevazut cu agitator, se introduc 600 ml solutie de colagen tip I, cu greutatea moleculara medie de 300 kDa si substanta uscata 0,5% peste care se adauga sub agitare continua 200 ml solutie de condroitin sulfat de greutate moleculara medie 20 kDa si concentratia de 20 mg/ml, preparata in prealabil la temperatura camerei.

Separat intr-un alt vas de laborator se prepara solutia de extract de pelin prin dizolvarea a 0,6 g extract liofilizat in 200 ml apa distilata, la temperatura camerei cu agitare intensa, obtinand o solutie omogena ce contine aproximativ 30 mg/ml polifenoli si 5mg/ml polizaharide. Solutia astfel obtinuta se adauga peste compozitia de colagen si condroitin sulfat, cu agitare continua, pana la omogenizarea completa.

Se obtine un hidrogel omogen, transparent care se amesteca sub agitare continua cu 50 ml solutie riboflavina de concentratie 0,05%, folosita ca agent de reticulare in vederea cresterii rezistentei mecanice a compozitiei obtinute.

Gelul compozit astfel obtinut se toarna in tavite de inox sau de sticla si se usuca sub forma de membrane folosind un uscator cu ventilatie, la temperaturi care sa nu depaseasca 35⁰C. Dupa uscare membranele se taie la dimensiunile dorite, se ambaleaza in pungi de polietilena si se sterilizeaza prin expunere la radiatii UV, intr-o incinta de sterilizare, timp de 8 ore.

Exemplul 2

Se utilizeaza colagenul tip I si extractul vegetal obtinute ca in exemplul 1, etapa I. Procedul de obtinere al compozitiei finale este similar cu cel descris la exemplul 1, cu deosebirea ca amestecul de colagen si condroitin sulfat (compozitia I) se prepara din 800 ml solutie de colagen tip I de concentratie 0,7% si 300ml solutie de condroitin sulfat cu greutatea moleculara medie de 12kDa si concentratia de 25mg/ml. Peste aceasta compozitie se adauga 300 ml solutie de extract de pelin, cu aceleasi caracteristici si conditii de lucru ca in exemplul 1 si apoi se toarna sub agitare continua solutia de riboflavina, preparata ca mai sus. Se obtine un amestec sub forma de gel, se conditioneaza sub forma de folii spongioase prin liofilizare care consta in inghetare la -40⁰C si uscare la +30⁰C, timp de 48 de ore. Materialul poros, obtinut dupa liofilizare, se taie la dimensiunile dorite, se ambaleaza in pungi de polietilena si se sterilizeaza prin expunere la radiatii gamma.

Extractul vegetal obtinut din pelin, conform exemplului 1, a fost analizat biochimic demonstrandu-se prezenta unor cantitati semnificative de acizi polifenolici, flavonoide si polizaharide. Experimentele *in vitro* au demonstrat ca extractul vegetal bogat in compusi biologic activi prezinta activitati antioxidante, antiinflamatoare (reduce sinteza de interleukine pro inflamatoare IL-6, IL-1beta si TNF-alfa) si antimicrobiene precum si un grad ridicat de biocompatibilitate dovedit pe culturi de celule fibroblaste. Noile variante de materiale compozite, conditionate ca membrane sau folii spongioase, au fost testate din punct de vedere al efectului lor asupra vindecarii ranilor tegumentului folosind modele experimentale *in vitro*, respectiv teste pe culturi de celule fibroblaste dermale si linii celulare de keratinocite umane (HaKaT). S-au investigat: viabilitatea celulara, proliferarea si morfologia acestora in prezenta membranelor/foliilor spongioase de biopreparat conform inventiei, comparativ cu substrate ce contin numai collagen, conditionate in acelasi mod. Rezultatele obtinute au demonstrat ca produsul realizat a prezentat proprietati considerabil imbunatatite, comparativ cu martorul de collagen, favorizand proliferarea si infiltrarea celulelor in suport, precum si stimularea metabolismului fibroblastelor si keratinocitelor si al sintezei de componente ale noii matrici extracelulare (collagen, glicozaminoglicani), caracteristici importante in functionarea unui produs destinat vindecarii ranilor pielii.

Extractul de pelin adaugat in compozitia biomaterialului compozit a imbunatatit rezistenta acestuia fata de infectiile bacteriene.

REVENNICARI

1. Produsul, conform inventiei, reprezinta un pansament compozit biocompatibil si biodegradabil, conditionat sub forma de membrane sau folii spongioase, constituit din 40...70% gel de collagen tip I cu greutatea moleculara medie de 300...350 kDa, 10...30 % condroitin sulfat cu greutatea moleculara medie de 10...30 kDa, 10...25% extract hidroalcolic de pelin (*Artemisia absinthium*) continand 5...60 mg/ml polifenoli si 1...10 mg/ml polizaharide si 0,05...1,0% riboflavina.

2. Procedul de obtinere al produsului, conform inventiei, consta in aceea ca se realizeaza membrane sau folii spongioase prin amestecarea a 70...90 parti compozitie I constituita din 60...80% solutie vascoasa de collagen tip I cu concentratia 0,5...1% si 20...40% solutie apoasa de condroitin sulfat cu concentratia 15...25 mg/ml cu 10...30 parti compozitie II formata din extract hidroalcolic de pelin bogat in polifenoli si polizaharide, cele doua compozitii se amesteca cu agitare puternica timp de 20...60 minute la temperatura camerei, amestecul obtinut se reticuleaza cu 5...10 parti solutie de riboflavina cu concentratia 0,01...0,05% si se conditioneaza fie prin uscare la 35 °C folosind uscatoare cu ventilatie pentru a obtine membrane omogene, fie se liofilizeaza prin inghetare la -40°C si uscare la 25...35°C pentru a obtine folii spongioase, dupa care variantele de pansament rezultate se taie la dimensiunile dorite, se ambaleaza si se sterilizeaza timp de 8...16 ore prin expunere la radiatii UV sau cu radiatii gamma.