



(12) **CERERE DE BREVET DE INVENȚIE**

(21) Nr. cerere: **a 2016 00786**

(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;**
• **CRACIUNESCU OANA,
BD. NICOLAE GRIGORESCU NR. 33,
BL. A1, SC. 3, AP. 33, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **MOLDOVAN LUCIA,
BD.CONSTRUCTORILOR NR.24, BL.19,
SC.A, ET.2, AP.13, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO**

(54) **HIDROGELURI BISTRATIFICATE PE BAZĂ DE
COMPONENTE ALE MATRICEI EXTRACELULARE ȘI
POLIZAHARIDE FOLOSITE ÎN VINDECAREA
OSTEOCONDALĂ**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un hidrogel utilizat în tratarea defectelor osteocondrale, și la un procedeu pentru obținerea acestuia. Hidrogelul conform invenției constă din două straturi suprapuse: un strat osos, constituit din colagen tip I, chitosan și fosfat tricalcic, și un strat superficial cartilagos, format din colagen tip II, alginat și condroitin sulfat. Procedeu conform invenției constă

în realizarea stratului cartilagos și a stratului osos sub formă de hidrogel și suprapunerea acestora în cantități egale, rezultând un hidrogel bistratificat steril, biocompatibil.

Revendicări: 2



24

OFICIUL DE STAT PENTRU BREVETE ȘI MARCI
Cerere de brevet de invenție
Nr. a 216 de 786
Data depozit 03-11-2016

DESCRIEREA INVENTIEI

Hidrogeluri bistratificate pe baza de componente ale matricei extracelulare si polizaharide folosite in vindecarea osteocondrala

Elena Iulia Oprita, Oana Craciunescu, Lucia Moldovan

Inventia se refera la hidrogeluri pe baza de componente ale matricei extracelulare (colagen, condroitin sulfat) si polizaharide (chitosan, alginat) cu actiune in tratarea si vindecarea defectelor osteocondrale si la procedeul de obtinere al acestora.

In general, defectele osteocondrale nu se limiteaza numai la stratul superficial al cartilajului si se extind in adancime afectand si osul subcondral de dedesubt. Defectele osteocondrale apar frecvent datorita unor boli (osteocondrita, osteonecroze, etc) sau in urma leziunilor traumatice ale articulatiilor. Datorita capacitatii limitate a organismului de a repara aceste defecte, are loc degradarea cronica si de cele mai multe ori este necesara interventia chirurgicala (Vijayan S, Bentley G, Briggs TWR, Skinner JA, Carrington RWJ, Pollock R, Flanagan AM, Cartilage repair: A review of Stanmore experience in the treatment of osteochondral defects in the knee with various surgical techniques, Indian J Orthop 2010;44:238-245). Grefele osteocondrale autologe sunt frecvent folosite pentru tratamentul defectelor osteocondrale, dar aceste tehnici prezinta dezavantaje, datorita dificultatii de manipulare si depind de cantitatea de tesut necesara, de integrea incompleta dintre tesutul gazda si tesutul grefa, de degradarea tesutului grefat, etc.

In ultimii ani, exista un interes crescut privind realizarea de biomateriale compozite in vederea utilizarii lor in repararea defectelor osteocondrale, care sa inlocuiasca metodele clinice traditionale.

Se cunoaste rolul colagenului, glicozaminoglicanilor, chitosanului, alginatului si combinatii ale acestora in obtinerea diferitelor suporturi pentru regenerarea osului (RO126014 B1/30.08.2013) si cartilajului (RO130042 (A0)/27.02.2015; RO127486 B1/29.03.2013; RO122949 B1/28.05.2010).

Este recunoscut faptul ca utilizarea suporturilor stratificate constituite din straturi multiple cu compozitii distincte pentru regenerarea unor tipuri diferite de tesut in interiorul aceluiasi

suport si aceeasi locatie anatomica (leziuni osteocondrale si ale interfetelor tendon-os) este fezabila (Atesok et al., 2014; WO2014149279 A1/25.09.2014; WO2005030726 A2/21.04.2005).

De asemenea, este cunoscut faptul ca, in ultima decada, s-au intensificat studiilor de explorare privind suporturile bifazice si multistratificate cu rol in vindecarea osteocondrala. Levingstone si colab. (2014) au dezvoltat un nou construct care imita structura tesutului osteocondral sanatos continand un strat de os format din colagen tip I si hidroxiapatita, un strat intermediar format din colagen tip I, colagen tip II si hidroxiapatita si o reginune cartilaginoasa formata din colagen tip I, colagen tip II si acid hialuronic. Proprietatile materialului au fost concepute pentru a oferi indiciile biologice necesare pentru a stimula infiltrarea celulelor gazda din maduva osoasa, in timp ce proprietatile mecanice au fost proiectate pentru a oferi un mediu optimizat pentru initierea diferentierii acestor celule in directia celulara necesara pentru fiecare regiune.

Brevetul US9180223 B2/10.11.2015 descrie un suport cilindric, bifazic osteocondral constituit intr-un capat dintr-un suport spiralat condrogenic constituit din cel putin un glicozaminoglican (acid hialuronic si condroitin sulfat), iar in celalalt capat dintr-un suport spiralat osteogenic constituit din policaprolactone (PCL) si acid polilactic glicolic (PLGA) si material ceramic (hidroxiapatita). Fiecare suport spiralat este constituit din nanofibre a caror compozitie a fost selectata pentru a initia fixarea si proliferarea tipurilor celulare dorite. Nanofibrele fiecarui suport spiralat sunt aliniate pentru a orienta celulele fixate astfel inact sa reconstituie structura tesutului nativ.

Prezenta propunere de brevet urmareste realizarea unui biomaterial conditionat sub forma de hidrogeluri, pe baza de componente ale matricei osoase si cartilaginoase si polizaharide, cu capacitatea de vindecare a defectelor osteocondrale. Biomaterialul reprezinta un hidrogel compozit format din doua straturi: primul cu structura osoasa, constituit din colagen tip I, chitosan si fosfat tricalcic si al doilea cu structura cartilaginoasa ce contine: colagen tip II, alginat si condroitin sulfat. Ambele straturi sunt reticulate cu carbodiimida, pentru imbunatatirea rezistentei mecanice si sterilizate prin expunere la radiatii UV.

Compozitia farmaceutica, conform inventiei, consta in aceea ca se realizeaza un strat osos constituit din 40..80% colagen tip I, cu greutatea moleculara medie de 300...330kDa, 20...60 % chitosan si 10...40% fosfat tricalcic si un strat superficial cartilagos compus din 40...70%

colagen tip II, cu greutatea moleculara medie 300...330 kDa, 10...40% alginat si 20...40% condroitin sulfat, cu greutatea moleculara medie de 10...30 kDa.

Procedeeul de obtinere al produsului, conform inventiei, consta in aceea ca se realizeaza hidrogeluri prin suprapunerea unui strat cartilagos (II) peste stratul osos (I) in cantitati egale. *Stratul osos (I)* se obtine prin amestecarea a 40...80 parti solutie vascoasa de colagen tip I cu concentratia 0,4...1% cu 20...40 parti solutie de chitosan cu concentratia 0,5...1%, dizolvat in prealabil in acid acetic 0,2M, cu agitare continua, si 10...30 parti fosfat tricalcic 1..8%, amestecarea se realizeaza la temperatura camerei cu agitare continua, dupa care se reticuleaza compozitia cu etil dimetilaminopropil carbodiimida (EDC), 10 mM...30mM, timp de 2...4 ore, la temperatura camerei si se gelifica acest amestec prin suspendare intr-o solutie de hidroxid de sodiu 1N, timp de 20...40 minute la temperatura de 4⁰C, dupa care gelul obtinut se spala de 2...3 ori cu tampon fosfat salin, fiecare spalare realizandu-se la 37⁰C, timp de 24 ore. *Stratul cartilagos (II)* se obtine prin amestecarea a 20...60 parti solutie vascoasa de colagen tip II cu concentratia 0,5...1% cu 5...20 parti solutie de alginat cu concentratia 1,5...4%, dizolvat in prealabil in apa distilata cu agitare continua, si 10...30 parti solutie de condroitin sulfat 2...5%, amestecarea se realizeaza la temperatura camerei cu agitare continua, dupa care se reticuleaza compozitia cu EDC de concentratie 10 mM...30mM, timp de 2...4 ore, la temperatura camerei si se gelifica acest amestec prin suspendare intr-o solutie de clorura de calciu 0,1M, timp de 20...40 minute la temperatura de 37⁰C, dupa care gelul obtinut se spala in aceleasi conditii ca cele de la stratul I. Hidrogelul II se adauga peste hidrogelul I, se obtine astfel biomaterialul bistratificat care se sterilizeaza prin expunere la radiatii UV timp de 8...12ore.

Avantaje

Prezenta inventie prezinta urmatoarele avantaje:

- suporturile obtinute prezinta o eficienta mare in tratarea si vindecarea defectelor osteocondrale, continand in compozitia lor componente care mimeaza matricea extracelulara osoasa si cartilaginoasa (colagen, fosfat tricalcic, condroitin sulfat);
- adaugarea de chitosan si alginat asigura proprietati de crestere a biocompatibilitatii si de formare a structurii de gel, marind capacitatea de vindecare a tesuturilor lezate;

- conditionarea sub forma de hidrogeluri bistratificate ii confera biomaterialului o structura tridimensionala care serveste ca matrice suport atat pentru celulele cartilajului (condrocite), cat si pentru cele ale osului (osteobalste);
- produsul realizeaza un contact strans cu zona lezata si faciliteaza influxul celulelor normale din zona neafectata inconjuratoare, precum si cresterea si proliferarea acestora;
- suporturile sunt bidegradabile, biocompatibile si stabile in timp;
- procedeul 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 prin utilizarea pepsinei dizolvata in acid acetic 0,5M (raport enzima: tesut 1:10) timp de 48h, apoi purificat prin precipitare cu NaCl cristalizata si in final dializat fata de apa distilata pana la indepartarea totala a sarii.

Colagenul tip II s-a obtinut din tesut traheal bovin maruntit in prealabil, prin extractie cu pepsina in solutie de acid acetic 0,5 M , la 4 C, timp de 48 de ore. Purificarea s-a realizat prin precipitare cu NaCl cristalizata 0,7 M si in final s-a dializat excesiv fata de apa distilata pentru indepartarea urmelor de sare.

Etapa II:

Prepararea stratului osos(I)

Intr-un vas de inox prevazut cu agitator, se toarna 400 ml solutie de colagen tip I, de concentratie 0,5 % cu greutatea moleculara medie de 300 kDa, peste care se adauga 200 ml solutie chitosan (1%); chitosanul s-a dizolvat in prealabil intr-o solutie de acid acetic 0,2 M, cu agitare continuua la temperatura camerei. Separat, intr-un vas de sticla s-a preparat o solutie de fosfat tricalcic 5% din care s-au masurat 40 ml care s-au adaugat peste amestecul de colagen si chitosan, sub agitare intensa. Compozitia astfel obtinuta s-a amestecat apoi cu agentul de reticulare constituit din etil dimetilaminopropil carbodiimida (EDC), de concentratie de 10 mM, timp de 2 ore, la temperatura camerei. Pentru gelifierea compozitiei obtinute, acest amestec se suspenda intr-o solutie de hidroxid de sodiu 1N, timp de 20 minute la temperatura de 4°C.

Ulterior gelul astfel obtinut se spala cu tampon fosfat salin, timp de 24 de ore la temperatura de 37°C, operatie care se repeta de cel putin 2 ori.

Prepararea stratului cartilagos(II)

Intr-un vas de inox prevazut cu agitare se amesteca se obtine prin amestecarea a 500 ml solutie vascoasa de colagen tip II cu concentratia 0,5% cu 40 ml solutie de alginat cu concentratia 3%, dizolvat in prealabil in apa distilata, cu agitare continua, la temperatura camerei. Separat, intr-un alt vas, se prepara 100 ml solutie de condroitin sulfat 2% ,care se adauga peste compozitia de colagen si alginat, amestecarea se realizeaza la temperatura camerei cu agitare continua.

Amestecul astfel obtinut se reticuleaza cu o solutie de EDC de concentratie 10 mM, timp de 3 ore, la temperatura camerei si se gelifica prin suspendare intr-o solutie de clorura de calciu 0,1M, timp de 30 minute prin incubare la temperatura de 37°C. Gelul obtinut se spala cu tampon fosfat salin in aceleasi conditii ca cele de la stratul I.

Intr-un vas de sticla, se toarna mai intai hidrogelul I, apoi se adauga hidrogelul II, se obtine astfel biomaterialul bistratificat care se sterilizeaza prin expunere la radiatii UV timp de 8 ore.

Exemplul 2

Se utilizeaza solutiile vascoase de colagen tip I si colagen tip II obtinute ca in exemplul 1, etapa I. Procedul de obtinere al biomaterialului stratificat si instalatia necesara sunt similare cu cele de la exemplul I, cu deosebirea ca stratul osos se prepara din amestecarea a 500 ml solutie de colagen tip I, cu greutatea moleculara medie de 330 kDa si concentratia 0,6% cu 300 ml solutie de chitosan 0,8% si 150 ml solutie de fosfat tricalcic de concentratie 2%. Stratul cartilagos se prepara identic cu cel de la exemplul 1. Etapele de reticulare si gelifiere la fiecare strat in parte sunt cele prezentate in exemplul 1. In final, suporturile compozite bistratificate s-au obtinut prin suprapunerea stratului cartilagos cu stratul osos si sterilizarea acestora prin expunere la radiatii UV intr-o incinta de sterilizare timp de 10 ore.

Hidrogelurile bistratificate obtinute, conform exemplelor de mai sus, au fost analizate si caracterizate din punct de vedere al proprietatilor fizico-chimice (compozitie chimica, morfologie, ultrastructura, gradul de gonflare, gradul de biodegradare si gradul de reticulare). Rezultatele au aratat ca morfologia suporturile compozite sintetizate descrie o distributie

omogena a componentelor structurale, gradul de gonflare este mai mare comparativ cu suporturile martor de colagen simplu (I si II) si chitosan, gradul de reticulare este ridicat, de aprox. 50%, iar gradul de biodegradare al formelor reticulate a fost mai mic, comparativ cu martorii corespunzatori nereticulati. Din punct de vedere al ultrastructurii, hidrogelurile osoase reticulate expun o structura compozita cu pori interconectati, cu fibrile de colagen imprastiate in matricea de chitosan si cu particule de TCP dispuse omogen in structura hidrogelurilor, iar hidrogelurile cartilaginoase prezinta o structura mult mai poroasa cu macro si micropori interconectati. Noile variante de hidrogeluri compozite au fost testate din punct de vedere al efectului lor asupra vindecarii osteocondrale folosind modele experimentale *in vitro*, respectiv teste pe culturi de osteoblaste si condrocite umane. S-au investigat: viabilitatea celulara, proliferarea, aderarea si morfologia acestora in prezenta hidrogelurilor conform inventiei, comparativ cu hidrogeluri ce contin numai colagen. Rezultatele obtinute au demonstrat ca produsul realizat a prezentat proprietati considerabil imbunatatite, comparativ cu martorul de colagen, favorizand viabilitatea, proliferarea si aderarea celulelor la suport.

REVENDICARI

1. Compozitia farmaceutica, conform inventiei, consta in aceea ca se realizeaza un strat osos constituit din 40..80% colagen tip I, cu greutatea moleculara medie de 300...330kDa, 20...60 % chitosan si 10...40% fosfat tricalcic si un strat superficial cartilagos compus din 40...70% colagen tip II, cu greutatea moleculara medie 300...330 kDa, 10...40% alginat si 20...40% condroitin sulfat, cu greutatea moleculara medie de 10...30 kDa.
2. Procedul de obtinere al produsului, conform inventiei, consta in aceea ca se realizeaza hidrogeluri prin suprapunerea unui strat cartilagos (II) peste stratul osos (I) in cantitati egale. *Stratul osos (I)* se obtine prin amestecarea a 40...80 parti solutie vascoasa de colagen tip I cu concentratia 0,4...1% cu 20...40 parti solutie de chitosan cu concentratia 0,5...1%, dizolvat in prealabil in acid acetic 0,2M, cu agitare continua, si 10...30 parti fosfat tricalcic 1..8%, amestecarea se realizeaza la temperatura camerei cu agitare continua, dupa care se reticuleaza compozitia cu etil dimetilaminopropil carbodiimida (EDC), 10 mM...30mM, timp de 2...4 ore, la temperatura camerei si se gelifica acest amestec prin suspendare intr-o solutie de hidroxid de sodiu 1N, timp de 20...40 minute la temperatura de 4⁰C, dupa care gelul obtinut se spala de 2...3 ori cu tampon fosfat salin, fiecare spalare realizandu-se la 37⁰C, timp de 24 ore. *Stratul cartilagos (II)* se obtine prin amestecarea a 20...60 parti solutie vascoasa de colagen tip II cu concentratia 0,5...1% cu 5...20 parti solutie de alginat cu concentratia 1,5...4%, dizolvat in prealabil in apa distilata cu agitare continua, si 10...30 parti solutie de condroitin sulfat 2...5%, amestecarea se realizeaza la temperatura camerei cu agitare continua, dupa care se reticuleaza compozitia cu EDC de concentratie 10 mM...30mM, timp de 2...4 ore, la temperatura camerei si se gelifica acest amestec prin suspendare intr-o solutie de clorura de calciu 0,1M, timp de 20...40 minute la temperatura de 37⁰C, dupa care gelul obtinut se spala in aceleasi conditii ca cele de la stratul I. Hidrogelul II se adauga peste hidrogelul I, se obtine astfel biomaterialul bistratificat care se sterilizeaza prin expunere la radiatii UV timp de 8...12ore.