



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2017 00150

(22) Data de depozit: 14/03/2017

(41) Data publicării cererii:
29/09/2017 BOPI nr. 9/2017

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

(72) Inventatori:
• RUGINĂ ALEXANDRINA MARIA,
STR.LUICĂ NR.21, BL.7, SC.2, AP.67,
SECTOR 4, O.P.7, BUCUREȘTI, B, RO;
• TOADER ANDREEA-CĂTĂLINA-LAVINA,
DRUMUL TABEREI NR. 138, BL. 715, SC. 1,
ET. 8, AP. 23, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B,
RO;

• STAN LIGIA FLORENTINA,
STR.TG.NEAMȚ, NR.10, BL.TD 23, SC.1,
AP.13, ET.2, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B,
RO;
• IONIȚĂ LARISA-NICOLETA,
STR.VIRTUȚII, NR.7, BL.R3, SC.1, AP.13,
ET.4, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
• TUȘA IRIS-MARIA, STR. ELIE CARAFOLI
NR. 12, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;
• ENACHE MIHAELA IONICA,
STR. PLT. NEDELCU ION NR.3, SC. 1,
ET. 4, AP. 25, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B,
RO;
• IORDĂCHEL CĂTĂLIN, STR.NOVACI
NR.11, BL.P 33, SC.2, AP.48, ET.5,
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) **BIOMATERIAL PE BAZĂ DE COLAGEN ȘI LIZAT
DIN UNITĂȚI DE PLACHETE UMANE EXPIRATE, UTILIZABIL
CA SUPORT (SCAFFOLD) PENTRU CULTURI CELULARE
ȘI INGINERIE TISULARĂ CU APLICAȚII BIOMEDICALE**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un biomaterial utilizat ca suport pentru culturi celulare și inginerie tisulară cu aplicații biomedicale. Biomaterialul conform invenției este obținut prin amestecarea a 100 părți soluție de colagen de tip I sau III preparat din tendoane și piele bovină prin tratament enzimatic uzual, având o concentrație de 0,5...1%, o masă moleculară medie de 400000...500000, pH 5,5...7,5 cu 10 părți extract plachetar

derivat din unități plachetare expirate, sub omogenizare completă timp de 2 h, și depunerea pe suprafețe plane a membranelor de biomaterial rezultate, care se usucă timp de 48 h la temperatura de 37°C.

Revendicări: 1
Figuri: 1



OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI
Cerere de brevet de invenție
Nr. a 2017 co 150
Data depozit 14-03-2017

DESCRIEREA INVENȚIE

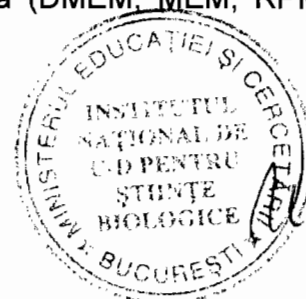
BIOMATERIAL PE BAZĂ DE COLAGEN ȘI LIZAT DIN UNITĂȚI DE PLACHETE UMANE EXPIRATE UTILIZABIL CA SUPORT (SCAFFOLD) PENTRU CULTURI CELULARE ȘI INGINERIE TISULARĂ CU APLICAȚII BIOMEDICALE

Invenția se referă la un biomaterial compozit pelicologen, utilizabil ca suport (scaffold) pentru culturi celulare și ingineria tisulară a cartilajului, cu efect de îmbunătățire a tehnicilor de cultură celulară.

Medicina regenerativă/ingineria tisulară este un domeniu multidisciplinar cu o creștere rapidă, ce implică științele vieții, fizica și ingineria, având ca scop dezvoltarea de celule, țesuturi și înlocuitori de organe funcționale pentru a repara, înlocui sau spori funcția biologică care a fost pierdută din cauza unor anomalii congenitale, prejudiciu, boală, sau îmbătrânire.

Un produs de inginerie tisulară este în prezent definit ca un produs care conține sau constă în celule sau țesuturi și este utilizat sau administrat oamenilor, în vederea regenerării, reparării sau înlocuirii țesutului uman. Bioprodusul provenit din ingineria tisulară poate conține celule, țesuturi de origine umană sau animală, sau ambele. Acesta poate conține, de asemenea, substanțe adiționale, cum ar fi produse celulare, biomolecule, biomateriale, substanțe chimice și scaffolduri sau matrici care oferă un suport fizic pentru celule/țesuturi.

Principalele componente ale mediilor celulare includ aminoacizi, săruri organice și anorganice, vitamine, minerale, zaharuri, lipide și acizi nucleici, tipurile și cantitățile acestora variind în funcție de cerințele specifice ale unui anumit tip celular. În general, mediile de cultură utilizate constau dintr-un mediu de bază (DMEM, MEM, RPMI și



alte), suplimentat cu ser de origine animală, de exemplu ser fetal bovin (SFB) și un amestec de antibiotice.

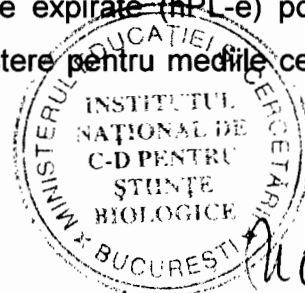
Alternativele actuale la FBS se bazează pe componente derivate din sânge uman: derivați de plasmă, ser, sânge din cordonul ombilical (UCB) ser și trombocite, cum ar fi lizatul de plachete (HPL).

Deși lizatele plachetare umane (HPL) sunt în curs de dezvoltare ca o posibilă alternativă în înlocuirea SFB în culturile celulare MSC sau de alt tip, se recomandă foarte multă precauție la manipularea produselor de origine umană, în scopul evitării transmiterii bolilor infecțioase. De aceea, se preferă ca lizatele plachetare umane (HPL) aplicate în condiții clinice să fie fabricate în conformitate cu aceleași reglementări stricte practicate în centrele de procesare a sângelui și din mediul spitalicesc.

Un alt considerent implică utilizarea de donatori umani necesari pentru producerea de HPL și plasmă bogată în plachete. Dar, până în prezent, există deja un deficit de donatori de sânge și plachete și prin urmare, este de dorit să nu se concureze această nevoie de plachete proaspete cu cea a băncilor de sânge sau a centrelor de transfuzii.

Este cunoscut deasemeni, că timpul de viață al unităților plachetare este foarte scurt, datorită riscului crescut de contaminare cu agenți patogeni după câteva zile de depozitare la temperatura camerei, și care nu este legată de funcționalitatea plachetelor. Cererea de plachete variază, ceea ce îngreunează estimarea necesarului de unități plachetare pentru băncile de sânge. S-a raportat că aproximativ 20% din totalul unităților plachetare expiră înainte de a putea fi folosite, și sunt prin urmare, eliminate. După o perioadă scurtă, de 5-7 zile, unitățile plachetare nu mai sunt considerate sigure pentru transfuzii umane, chiar dacă funcția plachetelor poate fi încă intactă.

Dupa cum se arată în Cerere OSIM nr. **A0050** din **19.07.2016**, lizatul de plachete umane (HPL sau hPL) obținut din unitățile plachetare expirate poate fi utilizat ca o alternativă a SFB, similar cu HPL produs din unitățile plachetare proaspăt izolate. Utilizarea lizatului plachetar derivat din unitățile plachetare expirate (hPL-e) poate fi făcută atât ca substitut al SFB cât și ca supliment de creștere pentru mediile celulare



complete (cu 10% SFB), la diferite concentrații (variind între 2,5 - 10%), reușindu-se astfel îmbunătățirea celor mai importanți parametri ai culturilor celulare folosite,

Problema pe care o rezolvă prezenta invenție este obținerea unui biomaterial biocompozit cu aplicații biomedicale în medicina regenerativă și ingineria tisulară a cartilajului, sub formă de membrană biocompatibilă suplimentată cu lizat plachetar din unitățile plachetare expirate, cu rol de îmbunătățire a parametrilor culturilor celulare

Conform invenției, biomaterialul este constituit din 100 părți soluție de collagen (tip I) sau (tip III) obținut din tendoane și piele bovină prin tratamentul enzimatic cunoscut și utilizat în domeniu, cu o concentrație de 0,5-1% și masă moleculară medie 400 000 – 500 000 conținând 10-15 părți extract plachetar derivat din unitățile plachetare expirate (hPL-e).

Avantajele invenției constau în următoarele:

- Utilizarea de unități plachetare expirate din Centrele de Transfuzie și Institutele de Hematologie și în concluzie, o valorificare superioară a acestui produs;
- Obținerea HPL-e din plachete ajunse la limita duratei de conservare în centrele de transfuzii precum și posibilitatea stocării acestora la -80°C , asigură îndeplinirea criteriilor stricte de securitate, fabricarea în conformitate cu standardele acceptate care se aplică la producerea materialelor de transfuzie pentru pacienți umani, sterilitatea și stabilitatea condițiilor de depozitare precum și trasabilitatea completă a produsului de la donare la utilizarea de către pacient;
- Obținerea unei expansiuni celulare mult superioară pe biomaterialul de collagen conținând HPL-e, față de multiplicarea celulară în prezență de SVF;
- Înlocuirea totală a serului fetal bovin la culturile celulare destinate ingineriei tisulare.

Se dă în continuare exemplul de realizare a invenției cu titlul „*Biomaterial pe bază de collagen și lizat din unități de plachete umane expirate utilizabil ca suport (scaffold) pentru culturi celulare și inginerie tisulară cu aplicații biomedicale*”

O unitate de transfuzie cu concentrat plachetar (CP) obținut prin afereză, cu un volum de 50 ml/unit, conținând $5,5 \times 10^{10}$ în plasmă, pH 6,2, a fost conservată la



temperatura camerei (20°C), timp de 7 zile după colectare, sub agitare, până la expirare, iar apoi a fost depozitată la -80°C. Înainte de prelucrare, unitatea congelată a fost dezghețată la 37°C, pe baie de apă, ceea ce a condus la liza trombocitelor. Proba a fost centrifugată timp de 30 minute la 4500g, fiind recuperat supernatantul. Pentru obținerea unui lizat filtrat, supernatantul a fost filtrat pe un filtru de 0,45 μm (Millipore, MA, USA). Filtratul obținut a fost alicotat în criotuburi și depozitat la -80°C. Înainte de utilizare, probele alicotate au fost după dezghețare recentrifugate 15 minute la 4500g și s-au folosit numai supernatantele.

Se prepară o soluție de collagen (tip I) sau (tip III) obținut din tendoane și piele bovină prin tratamentul enzimatic cunoscut utilizat în domeniu, cu o concentrație de 0,5-1% și masă moleculară medie 400 000 – 500 000, pH 5,5-7,5. Într-un amestecator planetar de laborator se amestecă 100 părți soluție collagen 0,5 – 1% și se adaugă 10ml extract plachetar. Se omogenizează timp de 2 ore. După omogenizarea completă se scade turația aparatului și se continuă agitarea până la dezaerare completă, se depun pe suprafețe plane de polietilenă sau teflon și se usucă 48 ore la 37°C. Membranele rezultate se ambalează în pungi de polietilenă și se sterilizează la UV.

Testare

Condrocitele umane (HCH Human Chondrocytes), furnizate de PromoCell la pasajul 2 s-au cultivate pe substrat colagenic cu HPL expirate, în plăci de 24 godeuri (100 μl/godeu, 30 min fără capac sub hotă și 24 h la 37°C).

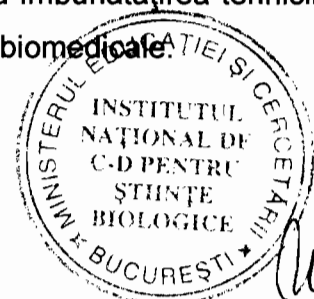
Condrocitele au fost dispersate în număr de $4,5 \times 10^4$ celule/godeu pentru fiecare probă de biomaterial și cultivate în mod independent, și analizate la 3 și 5 zile de cultură (Figura 1). Pentru culturile respective s-a utilizat, în vederea expansiunii viitoare, mediu DMEM simplu și au fost cultivate într-un incubator cu 5% CO₂, 95% umiditate și 37°C.

În urma numărării condrocitelor după 5 zile de cultură s-au găsit:

$2,8 \times 10^5$ celule/ml în proba martor cu 10%SVF, (92% viabilitate);

$2,2 \times 10^6$ celule/ml în proba 10%HPL-e (93% viabilitate).

Cercetările efectuate au indicat cu claritate posibilitatea cultivării condrocitelor pe suport (scaffold) de collagen având înglobat 10% HPL-e pentru îmbunătățirea tehnicilor de cultură celulară în ingineria tisulară a cartilajului, cu aplicații biomedicale.



Revendicări

1. Biomaterial membranar suport (scaffold) de colagen având înglobat 10% HPL-e (lizat plachetar derivat din unitățile plachetare expirate (hPL-e) pentru îmbunătățirea tehnicilor de cultură celulară în ingineria tisulară a cartilajului, cu aplicații biomedicale.



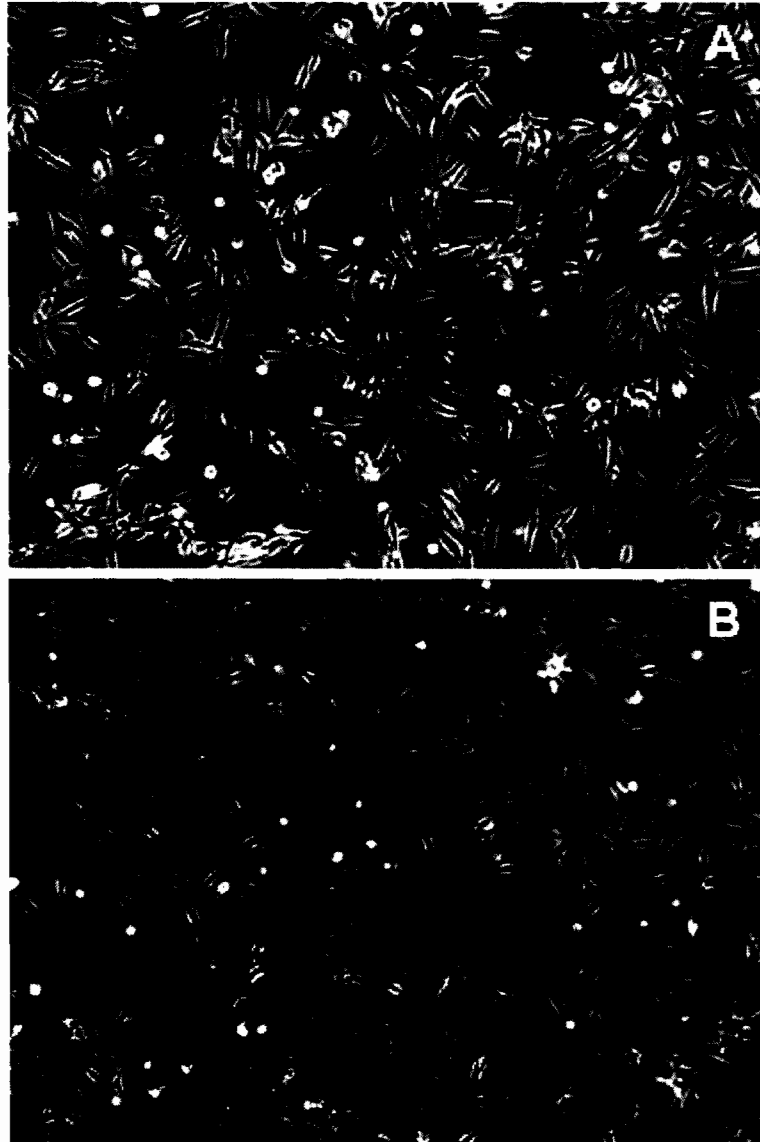


Fig.1. Analiza prin microscopie optică a condrocitelor umane cultivate în mediu DMEM suplimentat cu SVF 10% (A) și HPL-p 10% (B) după 5 zile de cultivare (10x).