



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2016 00926**

(22) Data de depozit: **28/11/2016**

(41) Data publicării cererii:
30/05/2018 BOPI nr. **5/2018**

(71) Solicitant:

- UNIVERSITATEA POLITEHNICA DIN BUCUREȘTI, SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR.313, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
- INSTITUTUL NAȚIONAL DE CERCETARE CANTACUZINO, SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR. 103, CP 1-525, BUCUREȘTI, B, RO;
- MEDICAL ORTOVIT S.R.L., STR. MIRON COSTIN NR. 8, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:

- STANCU IZABELA- CRISTINA, CALEA GRIVIȚEI NR. 232, BL. 2, SC. F, ET. 1, AP. 167, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;
- CECOLTAN SERGIU, ȘOS. OLTENIȚEI NR. 17J, BL. 7, AP. 13, POPEȘTI-LEORDENI, IF, RO;
- PETRE DANIELA GETA, STR. ELEV ȘTEFĂNESCU ȘTEFAN NR. 51, BL. 422, SC. A, AP. 32, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;
- LUNGU ADRIANA, STR. DRUMUL TABEREI NR. 96, BL. 521, AP. 14, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;

- SERAFIM ANDRADA, STR. ION MIHALACHE NR. 148, BL. 8, SC. A, ET. 9, AP. 37, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;
- DRAGUȘIN DIANA-MARIA, STR. CONSTANTIN MOISIL NR. 1, BL. 4, SC. D, AP. 2, PITEȘTI, AG, RO;
- VASILE EUGENIU, STR.NADA FLORILOR NR.2, BL.2, SC.2, ET.7, AP.74, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;
- MARINESCU RODICA, STR.EROU IANCU NICOLAE NR.12-26, VILA 70, VOLUNTARI, IF, RO;
- SALAGEANU AURORA, STR. MARIA ROSETTI NR. 10, AP. 28, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;
- TUCUREANU CĂTĂLIN, STR. CETATEA HISTRIA NR. 5, BL. MIIB/15, SC. A, AP. 22, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
- CARAS IULIANA, STR. VLĂDEASA NR. 4, BL. C75, SC. 1, ET. 3, AP. 18, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
- TOFAN VLAD- CONSTANTIN, STR. SERGENT MAJOR CARA ANGHEL NR. 12, BL. C8, SC. D, ET. 4, AP. 39, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
- ISTODORESCU MIRCEA, BLD. GLORIEI, NR.20, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO

Data publicării raportului de documentare:
30/05/2018

(54) **SUPORTURI HIDRATATE BIOCOMPOZITE
CU COMPONENTĂ POLIPEPTIDICĂ RETICULATĂ
ENZIMATIC, PENTRU CREȘTERE CELULARĂ
ȘI REGENERARE/MODELARE TISULARĂ,
ȘI PROCEDEU DE OBTINERE A ACESTORA**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unor substraturi biocompozite hidratate, cu utilizare în regenerare/modelare tisulară. Procedeu conform invenției constă în aceea că se prepară separat o soluție de gelatină din piele de pește de apă rece, și o soluție de alginat de sodiu în tampon fosfat alcalin 0,05 M, pH de 7,4, se amestecă cele două soluții în raport 1:1, timp de 2 h la temperatura de 37°C, rezultând o soluție de polimeri care se răcește până la temperatura de 4°C, și

se adaugă transglutaminază, urmată de turnarea amestecului în forma dorită, cu incubarea gelului rezultat într-o baie de clorură de calciu 0,45 M, la temperatura camerei, simultan cu formarea de alginat de calciu și fază minerală fosfo-calcică, rezultând un biocompozit pe bază de hidrogel gelatină-alginat de calciu.

Revendicări: 5

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).



26
30

SUPTURI HIDRATATE BIOCUMPOZITE CU COMPONENTA POLIPEPTIDICĂ RETICULATA ENZIMATIC, PENTRU CREȘTERE CELULARA SI REGENERARE/MODELARE TISULARA SI PROCEDEU DE OBTINERE A ACESTORA

Inventatori:

STANCU Izabela-Cristina, CECOLTAN Sergiu, PETRE Daniela Geta, LUNGU Adriana, SERAFIM Andrada, DRĂGUȘIN Diana-Maria, SĂLĂGEANU Aurora, ȚUCUREANU Cătălin, CARAȘ Iuliana, TOFAN Vlad-Constantin, VASILE Eugeniu, ISTODORESCU Mircea, MARINESCU Rodica

REZUMAT

Prezenta cerere de brevet se refera la obtinerea de suporturi hidratate biocompozite cu componenta polipeptidica reticulata enzimatic, pentru crestere celulara si regenerare/modelare tisulara si procedeu de obtinere a acestora, in stare hidratata, intr-o varietate de forme si dimensiuni. Biocompozitele au faza organica pe baza de gelatina din piele din peste de apa rece (GP), alginat de calciu (AlgCa) si faza minerala fosfo-calcica similara mineralului din tesuturile dure.

DESCRIEREA STADIULUI ACTUAL

Dezvoltarea de noi substraturi pentru cresterea de celule si regenerare/modelare tisulara reprezinta o prioritate in domeniul biomaterialelor. Una dintre cele mai promitatoare abordari consta in dezvoltarea unor substraturi inspirate din caracteristicile compositionale, morfo-structurale si functionale ale matricei extracelulare (MEC). MEC prezinta specificitate anatomo-fiziologica si consta intr-o retea hidratata acelulara, complexa din punct de vedere compositional, in care sunt dispuse celule si vase de sange. In tesuturile dure MEC este un material bifazic, bionanocompozit, a carui principala componenta organica este reprezentata de colagen. Proteoglicanii si glicozaminoglicanii sunt la randul lor constituinti organici importanti, cu rol in mentinerea apei in tesut. Faza minerala este reprezentata de cristale nanometrice de hidroxiapatita formate pe fibrele de colagen.

Colagenul este o proteina structurala intens investigata si utilizata ca atare sau in combinatie cu alte componente, intr-o gama larga de aplicatii biomedicale. Prin prelucrarea solutiilor de colagen se pot obtine geluri, filme, membrane si acoperiri biofunctionale exemple de procedee de obtinere fiind descrise in brevetele US 20120114763 A1, RO 122673 B1, US 2006/0199170 A1, RO 120820 B1. Utilizarea colagenului fibrilar in astfel de produse este limitata de solubilitatea redusa a acestuia, concentratia uzuala fiind mai mica de 4% (w/v), iar riscul de alterare structurala la sterilizare este crescut (Parenteau-Bareil, Gauvin, & Berthod, 2010).

<i>[Signature]</i>	<i>[Signature]</i>	<i>[Signature]</i>	<i>[Signature]</i>	<i>[Signature]</i>	<i>[Signature]</i>	<i>[Signature]</i>
<i>[Signature]</i>	<i>[Signature]</i>	<i>[Signature]</i>	<i>[Signature]</i>	<i>[Signature]</i>	<i>[Signature]</i>	<i>[Signature]</i>

[Signature]

Gelatina pastreaza avantajele compositionale ale colagenului oferind posibilitatea de a creste semnificativ continutul de proteina in diversele tipuri de substraturi. In prezent se utilizeaza gelatina de origine bovina, porcina, recombinanta si din piele de peste. Avantajele utilizarii gelatinei din piele de peste in aplicatii biomedicale sunt evidentiata recent deoarece ofera o solutie unor constrangeri socio-culturale si elimina riscul de transmitere a unor boli precum encefalopatia spongiforma bovina datorita unei distante filogenetice mari si absentei unor patogeni comuni (A. Serafim et al., 2015).

Gelatina din peste este utilizata pentru blocarea reactiilor specifice de tip antigen-anticorp avantajul fiind lipsa reactiilor incrucisate cu anticorpii de mamifere. In plus, gelifierea unor tipuri de gelatina de peste, mai specific gelatina din piele de peste de apa rece, are loc la temperaturi reduse (sub 8°C) permitand o manipulare facila la temperatura camerei a solutiilor cu concentratie mare (20-50%) (A. Serafim et al., 2015). Acest comportament reprezinta un avantaj de fabricare important fata de gelatinele mamifere ce necesita aport termic si a caror procesare este limitata la concentratii mai mici (<20%). Solubilitatea gelatinelor in medii apoase si degradarea prin mecanism enzimatic conduc la necesitatea fixarii acestor substraturi prin reticulare, pentru anumite aplicatii. Reticulara se poate realiza fizic, chimic sau enzimatic. Cele mai utilizate metode chimice de reticulare a colagenului si gelatinei se bazeaza pe 1) reactii intre functiuni amina primara si aldehide precum formaldehida si glutaraldehida [(Sung, Huang, Chang, Huang, & Hsu, 1999), WO2009109963 A, WO2011124640 A1], 2) reactii cu carbodiimide (de exemplu sistemul EDC-NHS (EDC: 1-etil-3-(3-dimetil aminopropil) carbodiimida si NHS: N-hidroxisuccinimida)) [US 20120114763 A1, WO2013121429] si, mai recent, 3) prin fotopolimerizare cu formare de retea utilizand fotoinitiatori, dupa modificarea in prealabil a proteinei prin introducerea de grupari polimerizabile C=C (Dragusin et al., 2012; Hutson et al., 2011; Klotz, Gawlitta, Rosenberg, Malda, & Melchels, 2016; Loessner et al., 2016; Nichol et al., 2010; Andrada Serafim et al., 2014; Yue et al., 2015; Zhao et al., 2016). Reticularile cu carbodiimide, prin polimerizare cu formare de retea sau enzimatic sunt preferate celor cu aldehide din perspectiva reducerii riscului de potentiala toxicitate (J. Y. Lai, 2012; J.-Y. Lai, Li, & Wang, 2010) asociat uneori cu reticularea cu aldehide.

Dezvoltarea de bioadezivi, biomateriale injectabile si de sigilare a ranilor a stimulat gasirea unor metode de generare in situ, in conditii fiziologice, a retelelor macromoleculare pornind de la precursori netoxici precum colagen si gelatina. Brevetul WO2013121429 se refera la bioadezivi pe baza de gelatina combinata cu alginat, reticulabili in situ utilizand sistemul EDC/NHS. O serie de bioadezivi pe baza de gelatina porcina si alte componente, inclusiv alginat a fost descrisa de Sung et al. (Sung et al., 1999). Sistemul gelatina porcina - alginat a fost reticulat folosind carbodiimida, la pH 4.5.

O metoda bioinspirata de reticulare a colagenului si gelatinei consta in folosirea enzimelor ce participa la structurarea colagenului din tesuturi (Ehrbar et al., 2007). Brevetul US20110110882 descrie utilizarea transglutaminazei (TGase) pentru



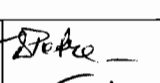
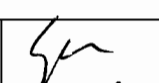
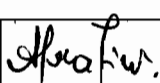
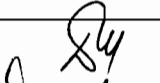
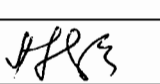
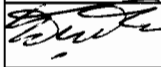
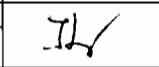
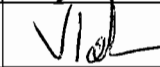
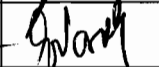
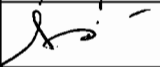


	IV					

24
28

reticularea polipeptidelor inclusiv gelatinei vizand in special actiunea hemostatica si de sigilare tisulara cu stoparea pierderii de fluide corporale. Acelasi brevet indica si posibilitatea includerii alginatului in compozitia de reticulat, rolul alginatului fiind insa numai de aditiv ce marestre viscozitatea precursorului ce urmeaza a fi reticulat. Alt brevet, US2016178611 (A1), prezinta utilizarea reticularii cu TGase pentru generarea de modele de investigare tumorala constand din matrici tridimensionale pe baza de gelatina (gelatina bovina, concentratia 6%) pentru cresterea de sferoizi tumorali.

Biocompozitele pe baza de collagen si mineral fosfo-calcic similar fazei minerale din tesuturile dure au fost investigate intens in ultimii ani din dorinta de producere a unor substraturi implantabile cu performante superioare pentru umplerea defectelor osoase si regenerare tisulara asa cum raporteaza brevetele US5455231, US5231169, WO 93/12736, US 5320844. Asemenea materiale sunt recunoscute pentru stimularea aderarii celulelor si osteointegrarii. Brevetul WO2016156992 raporteaza utilizarea TGase pentru reticularea collagenului si gelatinei in vederea obtinerii unor compozitii injectabile, scaffold-uri si adezivi tisulari. Autorii mentioneaza si posibilitatea combinarii cu compusi osteoconductivi precum hidroxiapatita (HA) si fosfat tricalcic (TCP). In ultimii ani, atentia specialistilor s-a indreptat catre utilizarea unor procedee biomimetice sau bioinspirate de sinteza/fabricare, in care nanocristalele minerale se formeaza direct in retea macromoleculara fibrilara. Brevetele RO 127725 B1, US 5320844, US 6384196, US 6384197, US 6300315 si US 6417166 raporteaza generarea de biocompozite collagen/mineral prin utilizarea precursorilor anorganici in compozitie. Alte doua brevete, US 2006/0204581 si US 6589590, indica generarea mineralului in retea polimerica prin dubla difuzie a ionilor de calciu si fosfat.

In prezent, numeroase substraturi pentru tratament plagi si regenerare tisulara sunt obtinute / comercializate sub forma deshidratata / liofilizate, cu forme si dimensiuni prestabilite, care de multe ori limiteaza utilizarea sau presupun pasi suplimentari preparativi (de exemplu decuparea in forma si dimensiunea dorita, hidratarea sau echilibrarea in mediu) inaintea utilizarii. Pulberea absorbabila sterila Gelfoam® (obtinuta din burete absorbabil), din gelatina porcina este recomandata ca material hemostatic cu aplicatii inclusiv in sangerari la nivelul osului spongios, cu atentionarea evitarii aglomerarii la nivelul cavitatilor osoase datorita potentialelor riscuri asociate gonflarii materialului ("DESCRIPTION," n.d.). Un alt produs de tip burete hemostatic din gelatina, SURGISPON, absoarbe de 40-50 de ori greutatea sa in apa sau sange presupunand manevrare suplimentara, iar produsul este complet degradabil in 3-4 saptamani [2016-10-14, Absorbable Haemostatic Gelatin Sponge - Absorbable Haemostatic Gelatin Sponge Exporter, Manufacturer & Supplier, Ahmedabad, India, www.surgispon.com/absorbable-haemostatic-gelatin-sponge-719333.html]. Alte produse absorbabile pe baza de bureti/particule de gelatina sunt Spongostan, Ethicon® SURGIFOAM®, KolSpon® Plug. In acest context, principalul dezavantaj practic al produselor existente este necesitatea efectuarii unor etape

Hau

preparative suplimentare inainte de utilizare, precum si riscul de gonflare necontrolata in situsul de aplicare.

In acest context in prezent sunt necesare substraturi pentru stimularea biointeractiunilor cu celulele si regenerare/modelare tisulara, cu manevrabilitate si performante superioare. **Principala problema tehnica rezolvata de prezenta inventie** consta in posibilitatea de generare in situ (in placi de cultura, in matrite cu forma si dimensiunile adecvate utilizarii finale sau direct in defecte tisulare cu forma si dimensiuni variabile), printr-un procedeu biomimetic, netoxic, a unor substraturi biocompozite hidratate, cu compozitie si microstructura bioinspirate de MEC a tesutului osos, care stimuleaza interactiuni celulare si procese de regenerare tisulara. Faza organica a biocompozitelor descrise este formata din GP care mimeaza colagenul din MEC si AlgCa care mimeaza componentele polizaharidice, iar faza minerala este reprezentata de nanocristale de apatita similare mineralului din os. Formarea retelei macromoleculare stabilizate enzimatic (componenta GP) si ionic (componenta AlgCa) are loc in paralel cu mineralizarea acesteia cu generare de nanoparticule fosfo-calcice similare fazei minerale osoase. Procedeu descris permite obtinerea substraturilor fara constrangeri legate de forma si dimensiunile matritei/defectului, in conditii preparative blande, biomimetice, permitand si o potentiala incarcare cu medicamente sau factori bioactivi.

Avantajele aplicarii inventiei fata de stadiul tehnic actual sunt urmatoarele:

1. usurinta de umplere a unor defecte tisulare, placi de cultura si matrite cu diversitate de forme si dimensiuni, pentru inginerie tisulara/regenerativa
1. reactia de reticulare a proteinei la temperatura fiziologica
2. mineralizare derulata in paralel cu reticularea alginatului
3. obtinerea acestor produse nu implica folosirea unor agenti de reticulare ce contin grupari aldehidice, sau a altor compusi ce pot genera un raspuns citotoxic
4. produsul se obtine direct in stare hidratata, cu stabilitate in medii simulate cat si in mediu de culturi celulare si poate fi conservat minim 6 luni
5. produsul interactioneaza favorabil cu celule datorita compozitiei si structurii sale bioinspirate din MEC

<i>[Signature]</i>	<i>[Signature]</i>	<i>[Signature]</i>	<i>[Signature]</i>	<i>[Signature]</i>	<i>[Signature]</i>	<i>[Signature]</i>
<i>[Signature]</i>	<i>[Signature]</i>	<i>[Signature]</i>	<i>[Signature]</i>	<i>[Signature]</i>	<i>[Signature]</i>	<i>[Signature]</i>

[Signature]

DESCRIERE

In continuare prezentam exemple de realizare a inventiei.

In aceasta inventie s-au folosit urmatoarele materiale:

Alginat de sodiu din alge brune cu viscozitate medie, fosfat de sodiu dibazic, fosfat de sodiu monobazic, solutie tampon de fosfat de sodiu 65mM pH 7.4, gelatina din piele de peste de apa rece, transglutaminaza microbiana 2U-5U/ml, HEPES (acid (4-(2-hidroxietil)-1-piperazin etan sulfonic)) solutie de 25 mM pH 7.4, NaOH 1M, clorura de calciu dihidrat 450mM, apa dublu distilata (aparatus de bidistilare GFL), filtre de 0.2µm (Merk Millipore), placi de sticla model Bio-Rad mini protean cu spatiator de 1mm.

Exemplul 1: Pentru obtinerea unor membrane hidratate cu grosime prestabilita, a fost folosita o solutie de 20% m/v GP si AlgNa de 4% m/v la temperatura 70°C timp de 3h, polimerii fiind dizolvati in TFS 0.05M pH 7.4. Solutiile de polimeri obtinute sunt combinate in raport de 1:1 omogenizate timp de 2h la temperatura de 37°C concentratia finala de polimeri fiind 10%GP si 2%AlgNa, apoi sunt racite pe baie de gheata pana T de 4°C cu agitare continua. Peste solutia de polimeri rece se adauga Tgase sub forma de pulbere cu concentratia finala de 5Unitati/g GP, se omogenizeaza in continuare pe baie cu gheata timp de 1h. Solutia finala este turnata intre placi de sticla intre care se fixeaza un spatiator silionic cu grosime 0.75 mm si incubata la 37°C timp de 8h. Gelul obtinut este transferat in baie de clorura de calciu de 0.45M si incubat la TC 2h. In timpul incubarii in clorura de calciu are loc reticularea AlgNa cu formare de AlgCa si obtinerea fazei minerale fosfo-calcice distribuita in toate matricea. Gelul biocompozit este spalat cu apa bidistilata pentru inlaturarea clorurii de calciu si clorurii de sodiu. Membrana obtinuta este hidratata si are dimensiuni predefinite corespunzatoare dimensiunii placilor de sticla si distantei dintre acestea; reticularea enzimatica a GP stabilizeaza membrana suficient pentru ca aceasta sa isi conserve forma si dupa tratamentul cu clorura de calciu. Membrana este alba si catifelata (datorita prezentei fazei minerale fosfo-calcice).

Exemplul 2: Substratul biocompozit este obtinut conform procesului descris in Exemplul 1 cu exceptia concentratiei molare de TFS care a fost de 0.1M (dublu fata de Exemplul 1). Toate manevrele ulterioare sunt similare din Exemplu 1.

Exemplul 3: Substratul biocompozit este obtinut conform procedului descris in Exemplul 1 cu concentratia molară a TFS in care au fost dizolvati polimerii conform Exemplului 2, cu urmatoarea deosebire fata de Exemplele 1 si 2: dupa etapa de reticulare/mineralizare descrisa in Exemplul 1, dupa indepartarea din baia de clorura de calciu, produsul este imersat in TFS (0.1M pH 7.4) timp de 1h, la TC. Aceasta etapa permite difuzia ionilor fosfat din TFS in substratul mineralizat continand inca cationi de calciu imobilizati fizic, conducand la incarcarea suplimentara a materialului cu mineral fosfo calcic.

<i>[Signature]</i>	<i>[Signature]</i>	<i>[Signature]</i>	<i>[Signature]</i>	<i>[Signature]</i>	<i>[Signature]</i>	<i>[Signature]</i>
<i>[Signature]</i>	ILV	VLD	<i>[Signature]</i>	<i>[Signature]</i>	<i>[Signature]</i>	

[Signature]

29
25

Exemplul 4. Pentru obtinerea substratului in placi de cultura, se procedeaza conform procesului descris în Exemplul 1, cu deosebirea ca turnarea solutiei se realizeaza direct in godeurile placii.

Exemplul 5. Pentru obtinerea substratului intr-un defect osos se procedeaza conform procesului descris în Exemplul 4, cu deosebirea ca turnarea solutiei se realizeaza direct in defectul vizat.

Aceasta inventie prezinta potential de a fi implementata si aplicata, tinand cont de interesul manifestat in prezent, de utilizare a unor metode netoxice de reticulare, fixare si structurare, de obtinerea a unor substraturi cu utilizari in culturi celulare si regenerare tisulara care sa prezinte elemente compositionale si microstructurale biomimetice sau bioinspirate si, foarte important, de eliminare a restrictiilor de forma si dimensiune sau a necesitatii de pregatire / manevrare suplimentara a esantioanelor.

6

Stav	Gold	Deke	Se	Herold	Sty	HK3
Stav	Sty	Viola	Stav	Sty	Sty	

Herold

REVENDICARI

R1. Procedeu de obtinere a unor substraturi biocompozite hidratate, care se caracterizeaza prin aceea ca se lucreaza in conditii blande, netoxice, fiind necesare urmatoarele etape experimentale:

Se pregateste o solutie de GP cu concentratie 10+80% (w/v) in 0.05 M tampon fosfat salin (TFS) cu pH 7.4, la temperatura camerei. Se prepara o solutie de AlgNa (concentratie de 2+8%, w/v) in 0.05 M TFS, pH 7.4, la o temperatura de 70°C. Amestecul final de reactie cu continut de 5+40% GP substanta uscata, respectiv 1+4% AlgNa substanta uscata (procente gravimetrice) se obtine prin combinarea in proportiile necesare a solutiilor de GP si AlgNa descrise anterior. Initial se realizeaza reticularea enzimatica a componentei proteice. In amestecul final de reactie continand GP si AlgNa, racit pe baie de gheata, se adauga, sub agitare continua, agentul de reticulare Tgase, intr-un continut de 2+10 unitati/g componenta proteica. Solutia astfel generata se toarna in forma dorita (vas Petri, placi de cultura, placi din sticla cu spatiator de diferite dimensiuni, alte tipuri de matrite). Dupa reticularea GP timp de 8 ore la 37°C, reactia de reticulare enzimatica a GP este inactivata prin difuzia in substrat a clorurii de calciu (folosind o baie de incubare cu concentratia 0.45 M, timp de incubare variabil, cuprins intre 60 minute si 12h, in functie de particularitatile geometrice ale substratului), simultan cu reticularea AlgNa cu generarea AlgCa si formarea fazei minerale fosfo-calcice. Se obtine in final un biocompozit pe baza de hidrogel GP-AlgCa.

R2. Metoda simpla de generare a fazei minerale fosfo-calcice (constituita majoritar din nano-hidroxiapatita similar fazei minerale din tesutul osos) **caracterizata prin aceea, ca** are loc simultan cu reticularea macromoleculor, conform procedurii descris la R1. Metoda descrisa la R1 presupune difuzia cationilor de calciu divalenti in profunzimea matricei macromoleculare in care sunt distribuiti omogen anioni fosfat din TFS.

R3. Materialele / substraturile hidratate biocompatibile obtinute conform procedurii descris la R1 si metodei de generare a fazei minerale biomimetice conform R2, **caracterizate prin aceea ca** pot fi sintetizate sub forma de produse hidratate intr-o varietate de forme si dimensiuni, prin efectuarea sintezei direct in placa de cultura, matrita sau defectul tisular vizate si ca prezinta un continut de 5+40% GP substanta uscata, respectiv 1+4% AlgCa substanta uscata (procente gravimetrice in amestecul final de reactie) si mineral fosfo-calcic asemanator fazei minerale din os.

R4. Materialele / substraturile bioactivate suplimentar cu molecule biologice active (peptide de aderenza celulara, factori de crestere, medicamente etc.), **caracterizate prin aceea ca** moleculele pot fi immobilizate fizic inca din timpul sintezei sau adsorbite/absorbite ulterior in/pe materialele/suporturile descrise la R3 si obtinute prin procedeele detaliate la R1 si R2:

R5. Utilizare ca suport biocompatibil/biomimetic a materialelor/suporturilor descrise la R3 si R4 si obtinute prin procedeele detaliate la R1 si R2, pentru

7

<i>[Signature]</i>	<i>[Signature]</i>	<i>[Signature]</i>	<i>[Signature]</i>	<i>[Signature]</i>	<i>[Signature]</i>	<i>[Signature]</i>
<i>[Signature]</i>	<i>[Signature]</i>	<i>[Signature]</i>	<i>[Signature]</i>	<i>[Signature]</i>	<i>[Signature]</i>	<i>[Signature]</i>

[Signature]

cresterea *in vitro* a celulelor aderente (fibroblaste, preosteoblaste) **caracterizata prin aceea ca** acest tip de substrat ofera situsuri de legare pentru complexul de aderență celulară atât prin prezența componentei derivate din colagen (gelatina) cât și prin faza minerală structurată sub forma de nanohidroxiapatita.

Offen	coll	Dr. P. P. P.	Gen	Abot. Int.	Dr. P. P. P.	Dr. P. P. P.
Offen	Dr. P. P. P.	Dr. P. P. P.	Dr. P. P. P.	Dr. P. P. P.	Dr. P. P. P.	Dr. P. P. P.

Offen



Serviciul Examinare de Fond: Chimie-Farmacie

Cont IBAN: RO05 TREZ 7032 0F33 5000 XXXX
Trezoreria Sector 3, București
Cod fiscal: 4266081

RAPORT DE DOCUMENTARE

CBI nr. a 2016 00926	Data de depozit: 28/11/2016	Data de prioritate
----------------------	-----------------------------	--------------------

Titlul invenției	SUPTURI HIDRATE BIOCOMPOZITE CU COMPONENTĂ POLIPEPTIDICĂ RETICULATĂ ENZIMATIC, PENTRU CREȘTERE CELULARĂ ȘI REGENERARE/MODELARE TISULARĂ ȘI PROCEDU DE OBTINERE A ACESTORA
------------------	---

Solicitant	UNIVERSITATEA POLITEHNICA DIN BUCUREȘTI, SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR.313, SECTOR 6, BUCUREȘTI, RO; INSTITUTUL NAȚIONAL DE CERCETARE CANTACUZINO, SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR. 103, CP 1-525, BUCUREȘTI, RO; MEDICAL ORTOVIT S.R.L., STR. MIRON COSTIN NR. 8, BUCUREȘTI, RO
------------	--

Clasificarea cererii (Int.Cl.) (CPC)	A61L27/52 ^(2006.01) , A61L27/20 ^(2006.01) , A61L27/22 ^(2006.01) , A61L27/26 ^(2006.01) , A61L27/222 ^(2013.01) , A61L27/27 ^(2013.01)
--------------------------------------	--

Domenii tehnice cercetate (Int.Cl.)	A61L, A61K
-------------------------------------	------------

Colecții de documente de brevet cercetate	
Baze de date electronice cercetate	Softul Comun, RopatentSearch, Epoquet (Epodoc, Patent Full Text, Non Patent Full Text), Google, Google Scholar
Literatură non-brevet cercetată	J. Mater. Sci: Mater Med; J. Mech. Behav. Biomed. Mat.

Documente considerate a fi relevante

Categoria	Date de identificare a documentelor citate și, unde este cazul, indicarea pasajelor relevante	Relevant față de revendicarea nr.
A	I. -C. Stancu & al. "Porous calcium alginate interpenetrated matrix and its biomineralization potential" J. Mater. Sci: Mater Med, 2011, vol. 22, pp. 451-460; întregul document	1,2
A	T. R. Cuadros & al. "Porous matrix of calcium alginate/gelatin with enhanced properties as scaffold for cell culture" Journal of Mechanical Behavior of Biomedical Materials 2015, vol. 46, pp. 331-342; întregul document	1,2

Strada Ion Ghica nr. 5, Sector 3, Cod 030044, București
Telefon centrală: +40-21-306.08.00/01/02/.../28/29
Fax: +40-21-312.38.19
E-mail: office@osim.ro
www.osim.ro

Documente considerate a fi relevante - continuare		
Categoria	Date de identificare a documentelor și, unde este cazul, indicarea pasajelor relevante	Relevant față de revendicarea nr.
A	US2012/0270810 A1 (Preiss-Bloom et al, IL) 2012.10.25 Paragrafele: [0001]-[0010], [0014]-[0018], [0042], [0053], [0060]	1,2
A	WO2008/076407 A2 (LIFEBOND LTD.,IL) 2008.06.26 Exemplul 1, Revendicări 1, 2, 11, 13	1,2
A	WO2016/007879 A1 (President and Fellows of Harvard College, US) pag. 1-2, rev 1-4	1,2
Unitatea invenției (art.18)	Cererea de brevet de invenție nu satisface condiția de unitate a invenției, aceasta conținând mai mult decât o invenție, astfel: nu este cazul	
Observații:	<p>Revendicările 1 și 2 nu definesc în mod clar și concis obiectele revendicate, așa cum prevede Art. 17 (3) din Legea 64/1991 privind brevetele de invenție, republicată în M.O. Partea I, Nr. 613/19.08.2014 acestea nefiind formulate conform Art. 12, 13 și 18 din Regulamentul de aplicare a Legii publicat în MO partea 1, nr 456/18.VI.2008. Totodată, revendicările 1 și 2 nu au suficient suport în descriere deoarece intervalele valorice indicate în textul acestora nu se regăsesc în descriere, și anume: intervalele de concentrații 10...80% pentru GP, 2...8% pentru AlgNa, 5...40% GP în amestecul final și respectiv 1...4% AlgNa în amestecul final, 2...10 Unități Tgază /g componentă proteică și intervalul de timp necesar incubării în baia de CaCl₂ 60min...12h. Ca urmare, cercetarea documentară s-a efectuat pentru:</p> <p>a) un procedeu de obținere a unor substraturi biocompozite hidratate sau pentru o metodă de generare a fazei minerale fosfo-calcice care cuprind etapele de:</p> <ul style="list-style-type: none"> - preparare a unei soluții de gelatină din piele de pește de apă rece în tampon fosfat salin, - prepararea unei soluții de alginat de sodiu în tampon fosfat salin, - amestecarea celor două soluții și adăugarea în amestecul rezultat de transglutaminază, urmat de turnarea amestecului în forma dorită, - reticularea gelatinei timp de 8 ore la 37°C, - inactivarea reacției de reticulare prin incubarea gelului obținut într-o baie de clorură de calciu 0,45 M, la temperatura camerei, simultan cu formarea de alginat de calciu și fază minerală fosfo-calcică, obținându-se în final un biocompozit pe bază de hidrogel gelatină din piele de pește de apă rece-alginat de calciu, <p><i>luând în considerare exclusiv valorile de concentrație și timp din exemplele concrete de realizare.</i></p> <p>Revendicarea 3 nu îndeplinește prevederile Art. 17 (3) din Lege deoarece intervalele de concentrație 5...40% pentru GP și, respectiv, 1...4% pentru AlgCa, în substratul hidratat biocompozit, nu se regăsesc în descriere. De asemenea, substraturile biocompozite hidratate obținute prin procedeul din revendicarea 1 nu sunt caracterizate fizico-chimic în descriere. Având în vedere că revendicarea 3 nu are suport în descriere, nu se poate lua în considerare la analiza comparativă față de stadiul tehnicii.</p> <p>Revendicările 4 și 5 nu îndeplinesc prevederile Art. 17 (3) din Lege deoarece nu au suport în descriere. Descrierea nu prezintă variante de realizare a suporturilor bioactivate suplimentar cu molecule biologice active prin imobilizare fizică încă din timpul sintezei, sau prin adsorbție/absorbție ulterior în/pe substraturile menționate la revendicarea 3. Totodată, descrierea nu ilustrează concret dezvoltarea <i>in vitro</i> de celule aderente pe aceste substraturi. Din aceste motive, revendicările 4 și 5 nu se pot lua în considerare la analiza comparativă față de stadiul tehnicii</p>	

Data redactării: 26.09.2017

Examinator,
Dr. Biochim. BABALIGEA IRINA



Litere sau semne, conform ST.14, asociate categoriilor de documente citate

A - Document care definește stadiul general al tehnicii și care nu este considerat de relevanță particulară;

D - Document menționat deja în descrierea cererii de brevet de invenție pentru care este efectuată cercetarea documentară;

E - Document de brevet de invenție având o dată de depozit sau de prioritate anterioară datei de depozit a cererii în curs de documentare, dar care a fost publicat la sau după data de depozit a acestei cereri, document al cărui conținut ar constitui un stadiu al tehnicii relevant;

L - Document care poate pune în discuție data priorității/lor invocată/e sau care este citat pentru stabilirea datei de publicare a altui document citat sau pentru un motiv special (se va indica motivul);

O - Document care se referă la o dezvoltare orală, utilizare, expunere, etc;

P - Document publicat la o dată aflată între data de depozit a cererii și data de prioritate invocată;

T - Document publicat ulterior datei de depozit sau datei de prioritate a cererii și care nu este în contradicție cu aceasta, citat pentru mai bună înțelegere a principiului sau teoriei care fundamentează invenția;

X - document de relevanță particulară; invenția revendicată nu poate fi considerată nouă sau nu poate fi considerată ca implicând o activitate inventivă, când documentul este luat în considerare singur;

Y - document de relevanță particulară; invenția revendicată nu poate fi considerată ca implicând o activitate inventivă, când documentul este combinat cu unul sau mai multe alte documente de aceeași categorie, o astfel de combinație fiind evidentă unei persoane de specialitate;

& - document care face parte din aceeași familie de brevete de invenție.