



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2017 00753**

(22) Data de depozit: **27/09/2017**

(41) Data publicării cererii:
29/03/2019 BOPI nr. **3/2019**

(71) Solicitant:

• INSTITUTUL NAȚIONAL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE TEXTILE ȘI
PIELĂRIE-SUCURSALA INSTITUTUL DE
CERCETARE PIELĂRIE-INCĂLTĂMINTE,
STR. ION MINULESCU NR.93, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatorii:

• ALBU KAYA MĂDĂLINA GEORGIANA,
BD.TINERETULUI, NR.21, BL.Z6, SC.1,
ET.7, AP.48, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B,
RO;
• LASCĂR IOAN, INTRAREA POIANA
NR.25, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;
• STANCU IZABELA-CRISTINA,
CALEA GRIVIȚEI NR. 232, BL. 2, SC. F,
ET. 1, AP. 167, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B,
RO;

• TITORENCU IRINA DOMNICA,
ALEEA SOLIDARITĂȚII NR. 1, BL. M17,
ET. 2, AP. 29, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B,
RO;

• ZAMFIRESCU DRAGOȘ GEORGE,
SPLAIUL UNIRII NR. 31, BL. M3, SC.1,
AP. 30, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;

• ZEGREA ION, STR. POLONĂ NR. 125,
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;

• MARIN ȘTEFANIA, BD. MATEI BASARAB
NR. 40, BL. 30, SC. B, AP. 21, ET. 5,
SLOBOZIA, IL, RO;

• LUNGU ADRIANA,
STR. DRUMUL TABEREI NR. 96, BL. 521,
AP. 14, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;

• NITIPIR CORNELIA, STR.BRĂNDUȘIILOR
NR.11, BL.H1, SC.3, ET.6, AP.91,
SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;

• TUTUIANU RALUCA, BD.OITUZ NR.33,
SC.B, AP.17, ONEȘTI, BC, RO;

• SIMIONESCU MAYA,
STR. LOUIS PASTEUR NR. 16, SECTOR 5,
BUCUREȘTI, B, RO

(54) **SUPORTURI POROASE STRATIFICATE,
PENTRU TRATAMENT PERSONALIZAT
AL RĂNIILOR DIFICILE, ȘI PROCEDEU
DE OBȚINERE A ACESTORA**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un suport poros pentru creștere celulară în tratamentul personalizat al răniilor dificile, și la un procedeu de obținere a acestuia. Suportul conform inventiei este constituit dintr-un amestec de gel de colagen fibrilar tip I, având un conținut de 1,1...2,2% colagen substanță uscată și 0,5...3% alginat de sodiu soluție în apă distilată, în proporție de 100:0, 60:40,

50:30, precum și 0,2...1,0% agent de reticulare de tip glutaraldehidă. Procedeul conform inventiei constă în amestecarea componentelor și reticularea amestecului, rezultând un gel compozit care este turnat în cutii Petri de sticlă de 2 mm, și liofilizat timp de 48 h.

Revendicări: 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 inventie a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de inventie este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).



SUPORTURI POROASE STRATIFICATE PENTRU TRATAMENT

PERSONALIZAT AL RANILOR DIFICILE SI PROCEDEU DE OBTINERE A ACESTORA

OFICIUL DE STAT PENTRU INVENTII SI MARCI
Cerere de brevet de inventie
Nr. a 2017 nr 753
Data depozit 27 -09- 2017

Domeniul tehnic in care poate fi folosita inventia:

Invenția se referă la suporturi poroase stratificate pe bază de colagen și alginat de sodiu, încarcate cu celule epiteliale autologe utilizate în tratamentul personalizat al ranilor dificile și la un procedeu de obținere a acestora.

Descrierea stadiului actual:

O serie de complicații traumatische și posttraumatische precum și diverse patologii, chirurgia metastazelor și tumorilor extinse și respectiv, chirurgia neuro- sau orala și maxilo-faciala pot conduce la apariția unor defecte de piele. Multe dintre aceste boli ar putea fi asociate (i) cu perturbări celulare sau (ii) cu defecte structurale. Aproximativ 3-6 milioane de persoane (85% dintre acestea cu varsta peste 65 de ani) suferă de rani nevindecabile de origini diferite. Procentul de afectiuni patologice și traumatische care necesită regenerarea pielii devine unul dintre cele mai frecvente motive de handicap din lume. Efortul finanțiar global al societății noastre pentru aceste leziuni este în continuă creștere în fiecare an. Cu toate acestea, suferința pacientilor depășește mult efortul finanțiar, reflectându-se în: incapacitatea de a funcționa în mod normal, limitarea activității, dureri asociate, aspect inestetic. Fără îndoială, toate acestea sunt cel mai greu de vindecat.

Tegumentul uman este cel mai mare organ al corpului, cu o suprafață de aproximativ 1,7 m² la adult, are o structură bilaminată, alcătuit din epiderm și derm.

Până în prezent, s-au utilizat ca soluție pentru reconstrucția tegumentară grefă de piele autologă, alogrefele, heterogrefele/xenogrefele, substituentii sintetici sau semisintetici.

Substituentii dermali au o importanță majoră în tratarea defectelor ce afectează întreaga grosimea tegumentară, atât în cazul leziunilor acute cât și a patologiei cronice. Sunt deja comercializate multiple produse cu caracter de substituent dermic sau dermo-epidermic utilă în repararea cutanată. Integra® (Integra LifeSciences Corp., Plainsboro, NJ, USA) este cel mai cunoscut substituent dermal utilizat în prezent. Aceasta este constituit din condroitin 6-sulfat, colagen bovin și o membrană de silicon. AlloDerm® este un substituent dermal acelular obținut din pielea de cadavru criocoartată, dezepidermizată. Ofere suport dermal, peste care se aplică o grefă de piele, foarte subțire autologă; aplicarea grefei se poate face în același timp operator ceea ce constituie un avantaj în comparație cu Integra. S-au obținut rezultate bune ale

cicatrizarii pe termen lung si o buna integrare pe patul receptor. Apligraf® (pansament celular, Novartis, Organogenesis) este un substituent de piele viu format din keratinocite si fibroblasti alogeni cu aplicabilitate in ranile acute umane. S-a constatat ca celulele alogenice sunt inlocuite de catre celulele gazda, pansamentul nemafiind identificat dupa 6 saptamani de la aplicare. Suporturile tridimensionale (3D) poroase sunt necesare pentru gazduirea celulelor si pentru furnizarea unui suport temporar necesar formarii si dezvoltarii de tesut nou, inclusiv derularii fenomenului de angiogeneza.

Suporturile poroase stratificate 3D pe bază de polimeri naturali, colagen (sau derivati de colagen) si polizaharide (alginat sau hialuronan), de grad medical, care fac subiectul prezentei inventii imita matricea extracelulara (MEC) si pot constitui suporturi pentru celule epiteliale autologe in tratamente personalizate.

Brevetul CN106178072 (A) descrie obtinerea unui pansament chirurgical din fibre de alginat, bambus si colagen care se degradeaza partial, are proprietati hemostatice si de absorbtie bune si sunt rezistente la actiunea bacteriana. Alte preparate terapeutice prezentate în brevetul CN105797203 (A) – pansamente spongioase din fibre de alginat si colagen obtinute prin uscare libera si CN105327383 (A) – pansament hemostatic pe baza de colagen, alginat si chitosan obtinut prin liofilizare au fost utilizate ca tratament al traumelor locale ale pielii. Acestea au rolul de a regenera țesutul moale, actionand ca un substituent acelular sau pansament pentru rani. Alte produse pe baza de colagen si alginat sunt descrise în brevetele: US2014271610 (A1) – compositii pe baza de colagen, ioni de calciu si alginat care polimeizeaza in situ in contact cu sangele si CN1337271 (A) – material biodegradabil implantabil pentru os care contine sare de fosfat de calciu, colagen si alginat. Aceste produse nu sunt destinate regenerarii pielii. Suporturi pentru cresteri de celule au fost descrise in brevetele MX2014016099 (A) – matrice colagen/alginat ca suport pentru condrocite pentru regenerarea cartilagiului si KR101449906 (B1) – hidrogel 3D compozit pe baza de aragoza-colagen-alginat ca suport pentru cresteri de celule. Acestea nu au la baza celule autologe si sunt proiectate pentru utilizari *in vitro*. Brevetele MX2016008442 (A) – hidrogeluri alginat/colagen care contin factori de crestere ai fibroblastelor FGF-18 pentru tratamentul defectelor de cartilagii si WO2016061450 (A1) – construct pentru regenerare tisulara pe baza de teancuri de folii de colagen laminate si solutie de alginat, factori de crestere si citocine, contin colagen si alginat, iar pentru o regenerare mai eficienta contin si factori de crestere/citocine. Brevetele descrise mai sus au avantajul de a dezvolta produse care sunt utilizate ca suporturi pentru cresterea celulara, care trateaza diverse rani sau regenereaza cartilajul sau

osul, dar în comparație cu prezenta invenție, nu au o structură poroasă structurată care să imite pielea și nu contin celule epiteliale autologe.

Avantajul invenției este că suporturi poroase triplu stratificate pe bază de colagen și alginat în diferite proporții, cu porozitate și grosime controlată, asigură un mediu propice pentru proliferarea și diferențierea de fibroblaste și keratinocite autologe, asigurând un tratament personalizat al ranilor dificile.

Problema tehnică

Având în vedere incidența mare a ranilor dificile rezultate în urma arsurilor, defecte tegumentare posttraumatici, operații chirurgicale, problema tehnică pe care o rezolvă invenția constă în realizarea unor suporturi poroase triplu stratificate din diferite proporții de colagen și alginat, populate cu celule fibroblastice și keratinocite care să asigure un tratament eficient, personalizat pentru rani dificile.

Soluția tehnică

Suporturile poroase stratificate 3D conform invenției înlătură dezavantajele menționate prin aceea că sunt constituite din următoarele componente: a) un amestec de polimeri naturali: i) colagen fibrilar tip I, obținut din derma pielii de vițel, sub formă de gel, cu structură nativă triplu helicoidală, cu un continut de 1.1 ... 2.2% colagen substanță uscată, pH = 7.4 și ii) 0.5 ... 3% alginat de sodiu sub formă de soluție în apă distilată, în proporții de 100:0 (A), 80:20 (B), 60:40 (C) și 50:50 (D) și b) 0.2% ... 1.0% agent de reticulare, glutaraldehidă care se amestecă în compoziția finală sub formă de soluție 0.2% ... 0.3% în apă distilată.

Procedeul de obținere a suporturilor 3D constă în aceea că, în prealabil, gelul de colagen:alginat în proporțiile stabilite, se omogenizează și se reticulează. Compozițiile obținute se toarnă în cutii Petri în straturi cu grosimi de 2 și 3 mm și se liofilizează obținându-se structuri poroase dense pentru culturi de keratinocite și respectiv fibroblaste. Pentru a obține o structură 3D tristratificată substraturile de 2 și 3 mm se suprapun sub forma de sandwich care conține un gel de colagen reticulat (i) și se ususca la etuva timp de 24 ore la 35°C.

Se obțin astfel structuri triplu stratificate cu o grosime de aprox 6 mm, cu porozități diferite care, cultivate cu celule fibroblastice / keratinocite constituie un tratament pentru rani dificile. În figurile 1-5 sunt prezentate cîteva caracteristici de bază ale substraturilor care alcătuiesc suportul sandwich.

Compozitia materialelor bicomponente influenteaza dimensiunea porilor substraturilor obtinute prin liofilizare. Se observa existenta porilor interconectati. Cresterea continutului de alginat de sodiu subtiaza peretii si dimensiunea porilor.

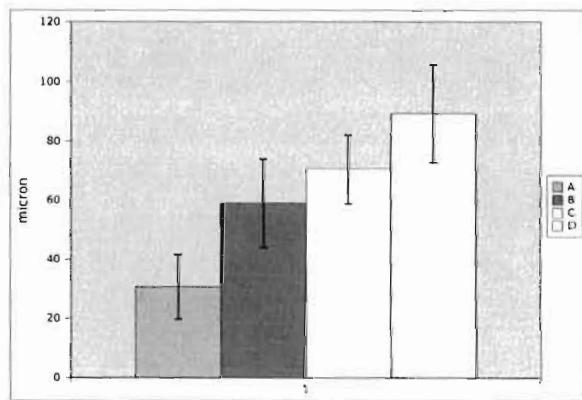


Figura 1. Influenta componetiei asupra dimensiunii porilor matricilor spongioase.
Diametrul mediu pori in matricile spongioase A-D

Se observa marirea dimensiunii porilor cu cresterea cantitatii de alginat din matricile bicomponente.

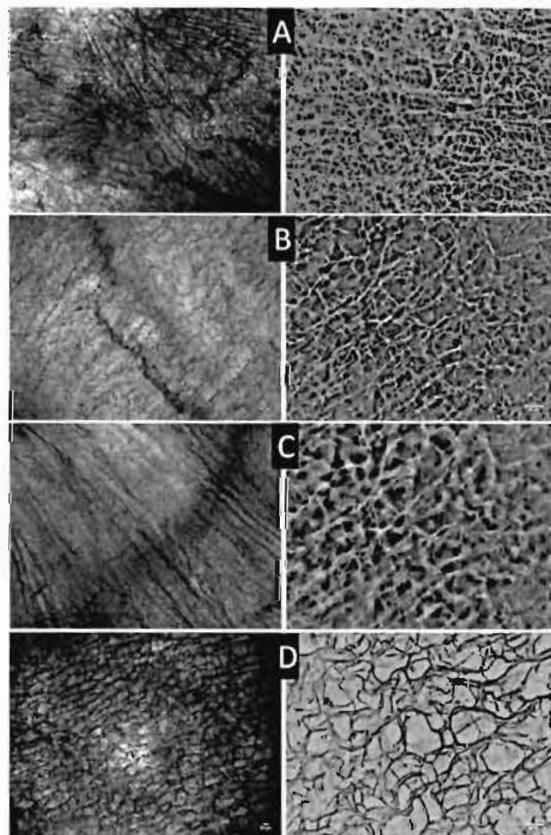


Figura 2. Materiale poroase A-D, in stare hidratata, observate in sectiune transversala: stanga – imagine 2D; dreapta - imagine 3D

In figura 3 este prezentata comportarea matricilor la absorbtia de apa la o ora si o zi.

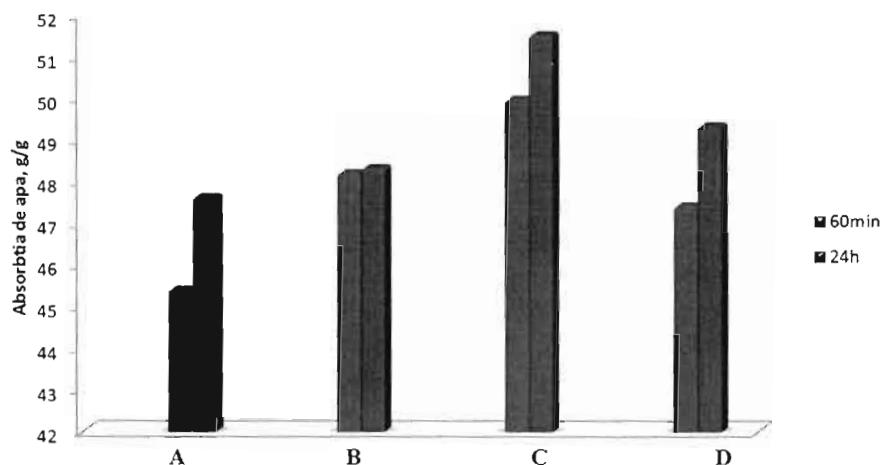


Figura 3. Absorbtia de apa a scaffold-urilor A, B, C si D

Din figura 3 se poate observa ca toate probele au fost foarte hidrofile, absorband o cantitate de $47.6 \div 51.5$ g/g in 24 de ore. Cea mai hidrofila matrice este cea cu un continut de 2:1 colagen:alginat, scaffold-ul C.

Viabilitatea si proliferarea fibroblastilor umani a fost ridicata in cazul tuturor probelor testate. In cazul probelor de Coll 80%:Alg 20% si Coll 40%:Alg 60% viabilitatea si proliferarea celulelor la 5 zile de la cultivare a fost comparabila cu a celor cultivate pe proba martor (Coll), insa in cazul celulelor cultivate pe proba de Coll 50%:Alg 50% s-a inregistrat o viabilitate si proliferare mai scazuta comparativ cu restul probelor si cu proba martor (Fig. 4).

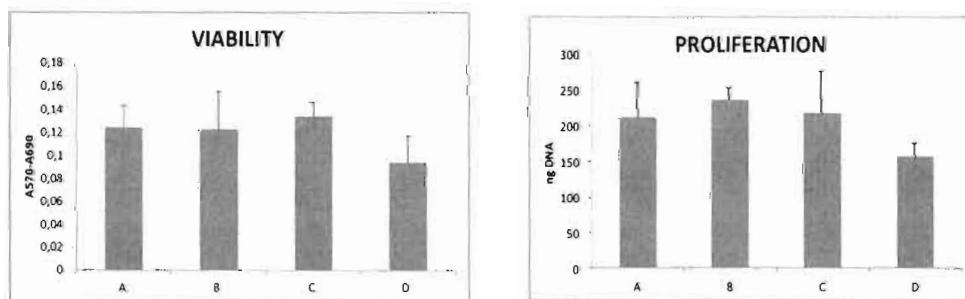


Figura 4. Viabilitatea si proliferarea fibroblastilor umani (pasaj 4) la 5 zile de la insamantarea pe matricile A, B, C si D

In cazul keratinocitelor umane s-a constatat ca viabilitatea si proliferarea la 24 de ore de la insamantarea pe matricile de colagen:alginat a fost asemanatoare cu cea inregistrata pe matricea de colagen martor (Fig. 5). La 5 zile de la insamantare s-a constat o crestere a viabilitatii in cazul celulelor cultivate pe matricile de Coll 80% - Alg 20% si Coll 60% - Alg 40%, celulele dezvoltate pe matricea de Coll 60% - Alg 40% prezentand o viabilitate

asemanatoare cu cea inregistrata in celulele cultivate pe matricea control (Fig. 5). Si in cazul testelor de proliferare s-a constatat o crestere a multiplicarii celulelor cultivate pe matricile de Coll 80% - Alg 20% si Coll 60% - Alg 40%, insa proliferarea cea mai ridicata a fost inregistrata la keratinocitele cultivate pe matricea Coll 80% - Alg 20% (Fig. 5). Cea mai scazuta proliferare la 5 zile de la insamantare s-a inregistrat in cazul celulelor cultivate pe matricea de Coll 50% - Alg 50%, caz confirmat si de testul de viabilitate (Fig. 5).

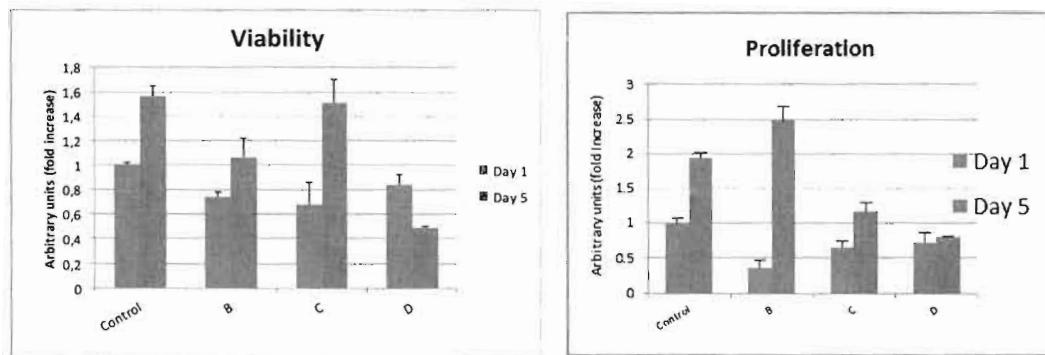


Figura 5. Viabilitatea si proliferarea keratinocitelor umane la 1 si 5 zile de la insamantarea pe matricile A, B, C si D

Pe baza testelor de viabilitate si proliferare realizate pe linia stabilizata de keratinocite umane si fibroblasti izolati de la pacienti au fost selectate doua dintre matricile de colagen:alginat: Coll 80% - Alg 20% (B) si Coll 60% - Alg 40% (C). Aceste matrici constituie partile principale ale suportului sandwich care sunt populate cu keratinocite si fibroblasti izolati de la subiecti umani pentru un tratament personalizat in regenerarea ranilor.

Avantajele invenției în raport cu stadiul tehnicii

Aplicarea invenției conduce la următoarele avantaje:

- realizarea unui tratament personalizat pentru rani grave ale pielii, cu aplicare locala, sub forma unor suporturi 3D spongioase pe baza de polimeri naturali cu celule autologe fibroblaste si keratinocite care imita matricea extracelulara;
- utilizarea acestor suporturi / substituenti de piele este mult mai avantajoasa comparativ cu administrarea unor pansamente biologice acelulare sau cu celule alogene;
- suporturile poroase 3D furnizeaza un mediu propice regenerarii ţesuturilor, sunt biocompatibile, biodegradabile in timp permitand celulelor să-și sintetizeze propria matrice în perioada in care acestea se biodegradeaza.

Descrierea detaliată a invenției:

Gelul de colagen fibrilar tip I obținut din piele bovină, având o concentrație de colagen de 1,3 ... 2,5% (w/w) este utilizat în această invenție. Cenușa și grasimea trebuie să fie nedetectabile la analiza calitativa și cantitativa, iar pH-ul gelului este acid, 2 ... 3,5.

Alginatul de sodiu utilizat în această invenție este o substanță comercială, care trebuie să aibă o umiditate sub 15% și pH – 6-8. Mai pot fi utilizate și alte forme ale alginatului de sodiu de grad medical.

Agentul de reticulare este aldehida glutarica care trebuie să fie 0.2 – 1.5% raportat la continutul de colagen.

Invenția va fi explicată mai în detaliu prin următoarele exemple:

Exemplul 1

În această invenție a fost utilizat un gel de colagen fibrilar tip I cu o concentrație gravimetrică de 1.2%, 98.8% apă și pH-ul de aproximativ 7.4. O soluție de 2% alginat de sodiu a fost încorporată în gelul de colagen în proporție de 20%, apoi a fost reticulată cu 0.5% glutaraldehidă. Gelul de colagen:alginat în proporție 80:20 a fost turnat în cutii Petri de sticlă de 2 mm și liofilizat timp de 48 de ore. Probele au fost obținute în forma spongioasă (matrici) și utilizate ca suporturi pentru creștere de keratinocite.

Exemplul 2

Gelul compozit pe baza de colagen și alginat a fost obținut prin procesul descris în Exemplul 1 exceptând procentul de colagen utilizat, care a fost 1.4% (raportat la colagen substanță uscată). Procesul de liofilizare a fost similar cu cel descris în Exemplul 1. Folia spongioasă obținuta a fost mai densă, cu pori mai mici.

Exemplul 3

Gelul compozit pe baza de colagen și alginat de sodiu a fost obținut prin procesul descris în Exemplul 2 exceptând procentul de alginat de sodiu utilizat, care a fost 40%. Gelul de colagen:alginat în proporție 60:40 a fost turnat în cutii Petri de sticlă de 3 mm și liofilizat timp de 48 de ore. Probele au fost obținute în forma spongioasă (matrici) și utilizate ca suporturi pentru creștere de fibroblaste.

Exemplul 4

Suporturile obținute prin procesele descrise în Exemplele 1 și 3 au fost „lipite” cu un gel de colagen de concentrație 1%, pH – 7,4 și uscate în etuva la 28°C timp de 24 de ore. Se obține astfel un suport 3D triplu stratificat care poate fi insamantat atât cu keratinocite cât și cu fibroblaste pentru a fi utilizat ca tratament pentru rani dificile.

REVENDICARI

1. Suporturile poroase stratificate 3D **caracterizate prin aceea că** sunt constituite din urmatoarele componente, exprimate in procente gravimetrice: a) 60 / 80% colagen fibrilar tip I, obținut din derma pielii de vițel, sub formă de gel, cu structură nativă triplu helicoidală, cu un conținut de 1.2% ... 1.4% colagen substanță uscată peste care se adauga componentul b) 40 / 20 % solutie de 2% alginat de sodiu si c) 0.5% agent de reticulare, glutaraldehida, care se amestecă în compoziția finală sub formă de soluție 0.2% ... 0.3% în apă distilată obtinandu-se geluri componzite.
2. Gelul composit definit in revendicarea 1, **caracterizat prin aceea că**, in prealabil, a fost turnat in cutii Petri de sticla in straturi de 2 si 3 mm si liofilizat timp de 48 de ore, obtinandu-se forme spongioase (matrici) utilizate ca suporturi pentru cresterea de keratinocite si respectiv fibroblaste.
3. Suporturile spongioase definite in revendicarea 2, **caracterizata prin aceea că** au fost „lipite” cu un gel de colagen de concentratie 1%, pH – 7,4 si uscate in etuva la 28⁰C timp de 24 de ore, se obtine astfel un suport 3D triplu stratificat care poate fi insamantat atat cu keratinocite cat si cu fibroblaste pentru a fi utilizat ca tratament pentru rani dificile.