



(12)

BREVET DE INVENȚIE

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

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

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **29/11/2022** BOPI nr. **11/2022**

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

(73) Titular:

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

(72) Inventatori:

• **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;**
• **NITIPİR CORNELIA, STR. BRÂNDUȘILOR
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**

(56) Documente din stadiul tehnicii:
WO 2016/061450 A1; KR 101449906 B1

(54) **PROCEDEU DE OBTINERE DE SUPTURI POROASE
TRISTRATIFICATE**



RO 133133 B1

1 Invenția se referă la un procedeu de obținere de suporturi poroase tristratificate pe
bază de colagen și alginat de sodiu, încărcate cu celule epiteliale autologe utilizate în
3 tratamentul personalizat al rănilor dificile și la un procedeu de obținere a acestora.

5 O serie de complicații traumatiche și posttraumatice precum și diverse patologii,
chirurgia metastazelor și tumorilor extinse și respectiv, chirurgia neuro- sau orală și maxilo-
7 facială 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
9 persoane (85% dintre acestea cu vârsta peste 65 de ani) suferă de răni nevindecabile de
origini diferite. Procentul de afecțiuni patologice și traumatiche care necesită regenerarea pielii
11 devine unul dintre cele mai frecvente motive de handicap din lume. Efortul financiar global
al societății noastre pentru aceste leziuni este în continuă creștere în fiecare an. Cu toate
13 acestea, suferința pacienților depășește mult efortul financiar, reflectându-se în: incapaci-
tatea de a funcționa în mod normal, limitarea activității, dureri asociate, aspect inestetic. Fără
îndoială, toate acestea sunt cel mai greu de vindecat.

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

17 Până în prezent, s-au utilizat ca soluție pentru reconstrucția tegumentară grefa de
piele autologă, alogrefele, heterogrefele/xenogrefele, substituenții sintetici sau semisintetici.
19 Substituenții dermali au o importanță majoră în tratarea defectelor ce afectează toată
grosimea tegumentară, atât în cazul leziunilor acute cât și a patologiei cronice. Sunt deja
21 comercializate multiple produse cu caracter de substituent dermic sau dermo-epidermic utile
în repararea cutanată. Integra[®] (Integra LifeSciences Corp., Plainsboro, NJ, USA) este cel
23 mai cunoscut substituent dermal utilizat în prezent. Acesta este constituit din condroitin 6-
sulfat, colagen bovin și o membrană de silicon. AlloDerm[®] este un substituent dermal
25 acelular obținut din pielea de cadavru crioconservată, dezepidermizată. Oferă suport dermal,
peste care se aplică o grefă de piele, foarte subțire autologă; aplicarea grefei se poate face
27 în același timp operator ceea ce constituie un avantaj în comparație cu Integra. S-au obținut
rezultate bune ale cicatrizării pe termen lung și o bună integrare pe patul receptor. Apligraf[®]
29 (pansament celular, Novartis, Organogenesis) este un substituent de piele viu format din
keratinocite și fibroblaști alogeni cu aplicabilitate în rănilor acute umane. S-a constatat ca
31 celulele alogenice sunt înlocuite de către celulele gazdă, pansamentul nemaifiind identificat
după 6 săptămâni de la aplicare. Suporturile tridimensionale (3D) poroase sunt necesare
33 pentru găzduirea celulelor și pentru furnizarea unui suport temporar necesar formării și
dezvoltării de țesut nou, inclusiv derulării fenomenului de angiogeneză.

35 Suporturile poroase stratificate pe bază de polimeri naturali, colagen (sau derivați de
colagen) și polizaharide (alginat sau hialuronan), de grad medical, care fac subiectul
37 prezentei invenții imită matricea extracelulară (MEC) și pot constitui suporturi pentru celule
epiteliale autologe în tratamente personalizate.

39 Brevetul **CN 106178072 (A)** descrie obținerea unui pansament chirurgical din fibre
de alginat, bambus și colagen care se degradează parțial, are proprietăți hemostatice și de
41 absorbție bune și sunt rezistente la acțiunea bacteriană. Alte preparate terapeutice pre-
zentate în brevetul **CN 105797203 (A)** - pansamente spongioase din fibre de alginat și cola-
43 gen obținute prin uscare liberă și **CN105327383 (A)** - pansament hemostatic pe bază de
colagen, alginat și chitosan obținut prin liofilizare au fost utilizate ca tratament al traumelor
45 locale ale pielii. Acestea au rolul de a regenera țesutul moale, acționând ca un substituent
acelular sau pansament pentru răni. Alte produse pe bază de colagen și alginat sunt des-
47 crise în brevetele: **US 2014271610 (A1)** - compoziții pe bază de colagen, ioni de calciu și
alginat care polimerizează *in situ* în contact cu sângele și **CN 1337271 (A)** - material

RO 133133 B1

biodegradabil implantabil pentru os care conține sare de fosfat de calciu, collagen și alginat. Aceste produse nu sunt destinate regenerării pielii. Suporturi pentru creșteri de celule au fost descrise în brevetele **MX 2014016099 (A)** - matrice collagen/alginat ca suport pentru condrocite pentru regenerarea cartilagiului și **KR 101449906 (B1)** - hidrogel 3D compozit pe bază de aragoza-collagen-alginat ca suport pentru creșteri de celule. Acestea nu au la bază celule autologe și sunt proiectate pentru utilizări *in vitro*. Brevetele **MX 2016008442 (A)** - hidrogeluri alginat/collagen care conțin factori de creștere ai fibroblastelor FGF-18 pentru tratamentul defectelor de cartilajii și **WO 2016061450 (A1)** - construct pentru regenerare tisulară pe bază de teancuri de folii de collagen laminate și soluție de alginat, factori de creștere și citocine, conțin collagen și alginat, iar pentru o regenerare mai eficientă conțin și factori de creștere/citokine. Brevetele descrise mai sus au avantajul de a dezvolta produse care sunt utilizate ca suporturi pentru creșterea celulară, care tratează diverse răni sau regenerează cartilajul sau osul, dar în comparație cu prezenta invenție, nu au o structură poroasă structurată care să imite pielea și nu conțin celule epiteliale autologe.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția constă în prezentarea unui procedeu de obținere de suporturi poroase triplu stratificate din diferite proporții de collagen și alginat, populate cu celule fibroblaste și keratinocite care să asigure un tratament eficient, personalizat pentru răni dificile.

Procedeu conform invenției înlătură dezavantajele de mai sus prin aceea că peste componentul a) constituit din 60/80% collagen fibrilar tip I, obținut din derma de vițel, sub formă de gel, cu structură nativă triplu helicoidală, cu un conținut de 1,2...1,4% collagen substanță uscată, se adaugă componentul b) 40/20% soluție de 2% alginat de sodiu și componentul c) 0,5% agent de reticulare, respectiv glutaraldehidă, care se amestecă în compoziția finală sub formă de soluție 0,2...0,3% în apă distilată obținându-se astfel gelurile compozite, care au fost turnate în cutii Petri din sticlă, în straturi de 2 și 3 mm și liofilizate timp de 48 h, obținându-se forme spongioase care au fost lipite între ele cu un gel de collagen de concentrație 1%, pH 7,4 și care au fost uscate în etuvă la 28°C timp de 24 h, obținându-se un suport triplu stratificat care poate fi însămânțat atât cu keratinocite cât și cu fibroblaste pentru a fi utilizat ca tratament pentru răni.

Prin aplicarea invenției se obțin următoarele avantaje:

- suporturile poroase triplu stratificate pe bază de collagen 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 rănilor dificile.

- realizarea unui tratament personalizat pentru răni grave ale pielii, cu aplicare locală, sub forma unor suporturi spongioase pe bază de polimeri naturali cu celule autologe fibroblaste și keratinocite care imită matricea extracelulară;

- utilizarea acestor suporturi/substituenți de piele este mult mai avantajoasă comparativ cu administrarea unor pansamente biologice aceluare sau cu celule alogene;

- suporturile poroase furnizează un mediu propice regenerării țesuturilor, sunt biocompatibile, biodegradabile în timp permițând celulelor să-și sintetizeze propria matrice în perioada în care acestea se biodegradează.

Suporturile poroase stratificate sunt constituite din următoarele componente: a) un amestec de polimeri naturali: i) collagen fibrilar tip I, obținut din derma pielii de vițel, sub formă de gel, cu structură nativă triplu helicoidală, cu un conținut de 1,1...2,2% collagen 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

RO 133133 B1

1 0,2...0,3% în apă distilată. Procedul de obținere a suporturilor 3D constă în aceea că, în
prealabil, gelul de collagen alginat în proporțiile stabilite, se omogenizează și se reticulează.
3 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
5 fibroblaste. Pentru a obține o structură tristratificată substraturile de 2 și 3 mm se suprapun
sub formă de sandwich care conține un gel de collagen reticulat (i) și se usucă la etuvă timp
7 de 24 h la 35°C.

În continuare, invenția va fi explicată mai în detaliu prin următoarele exemple de
9 realizare în legătură cu figurile care reprezintă:

- fig. 1, influența compoziției asupra dimensiunii porilor matricilor spongioase.
11 Diametrul mediu al porilor în matricile spongioase A-D;

- fig. 2, materiale poroase A-D, în stare hidratată, observate în secțiune transversală:
13 stânga- imagine 2D; dreapta- imagine 3D;

- fig. 3, absorbția de apă a scaffold-urilor A, B, C și D;

15 - fig. 4, viabilitatea și proliferarea fibroblaștilor umani (pasaj 4) la 5 zile de la
însămânțare pe matricile A, B, C și D;

17 - fig. 5, viabilitatea și proliferarea keratinocitelor umane la 1 și 5 zile de la
însămânțare pe matricile A, B, C și D.

19 Se obțin astfel structuri triplu stratificate cu o grosime de aproximativ 6 mm, cu poro-
zități diferite care, cultivate cu celule fibroblaste/keratinocite constituie un tratament pentru
21 răni dificile. În fig. 1...5 sunt prezentate câteva caracteristici de bază ale substraturilor care
alcătuiesc suportul sandwich.

23 Compoziția materialelor bicomponente influențează dimensiunea porilor substraturilor
obținute prin liofilizare. Se observă existența porilor interconectați. Creșterea conținutului de
25 alginat de sodiu subțiază pereții și dimensiunea porilor.

În fig. 3 este prezentată comportarea matricilor la absorbția de apă la o oră și o zi.

27 Din fig. 3 se poate observa că toate probele au fost foarte hidrophile, absorbând o
cantitate de $47,6 \div 51,5$ g/g în 24 h. Cea mai hidrophilă matrice este cea cu un conținut de 2:1
29 collagen:alginat, scaffold-ul C.

Viabilitatea și proliferarea fibroblaștilor umani a fost ridicată în cazul tuturor probelor
31 testate. În cazul probelor de Coll 80%:Alg 20% și Coll 40%:Alg 60% viabilitatea și proliferarea
celulelor la 5 zile de la cultivare a fost comparabilă cu a celor cultivate pe proba martor (Coll),
33 însă în cazul celulelor cultivate pe proba de Coll 50%:Alg 50% s-a înregistrat o viabilitate și
proliferare mai scăzută comparativ cu restul probelor și cu proba martor (fig. 4).

35 În cazul keratinocitelor umane s-a constatat că viabilitatea și proliferarea la 24 h de
la însămânțarea pe matricile de collagen:alginat a fost asemănătoare cu cea înregistrată pe
37 matricea de collagen martor (fig. 5). La 5 zile de la însămânțare s-a constatat o creștere a
viabilității în cazul celulelor cultivate pe matricile de Coll 80% - Alg 20% și Coll 60% - Alg
39 40%, celulele dezvoltate pe matricea de Coll 60% - Alg 40% prezentând o viabilitate
asemănătoare cu cea înregistrată în celulele cultivate pe matricea control (fig. 5). Și în cazul
41 testelor de proliferare s-a constatat o creștere a multiplicării celulelor cultivate pe matricile
de Coll 80% - Alg 20% și Coll 60% - Alg 40%, însă proliferarea cea mai ridicată a fost
43 înregistrată la keratinocitele cultivate pe matricea Coll 80% - Alg 20% (fig. 5). Cea mai
scăzută proliferare la 5 zile de la însămânțare s-a înregistrat în cazul celulelor cultivate pe
45 matricea de Coll 50% - Alg 50%, caz confirmat și de testul de viabilitate (fig. 5).

Pe baza testelor de viabilitate și proliferare realizate pe linia stabilizată de keratinocite
47 umane și fibroblaști izolați de la pacienți au fost selectate două dintre matricile de
collagen:alginat: Coll 80% - Alg 20% (B) și Coll 60% - Alg 40% (C). Aceste matrici constituie
49 părțile principale ale suportului sandwich care sunt populate cu keratinocite și fibroblaști
izolați de la subiecți umani pentru un tratament personalizat în regenerarea rănilor.

RO 133133 B1

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 grăsimea trebuie să fie nedetectabile la analiza calitativă și cantitativă, iar pH-ul gelului este acid, 2...3,5. Alginatul de sodiu utilizat în această invenție este o substanță comercială, care trebuie să aibă 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 glutarică care trebuie să fie 0,2-1,5% raportat la conținutul de colagen.

Exemplul 1

Se utilizează 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 h. Probele au fost obținute în formă spongioasă (matrici) și utilizate ca suporturi pentru creștere de keratinocite.

Exemplul 2

Gelul compozit pe bază 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 obținută a fost mai densă, cu pori mai mici.

Exemplul 3

Gelul compozit pe bază 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 h. Probele au fost obținute în formă 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 etuvă la 28°C timp de 24 h. Se obține astfel un suport triplu stratificat care poate fi însămânțat atât cu keratinocite cât și cu fibroblaste pentru a fi utilizat ca tratament pentru răni dificile.

RO 133133 B1

1

Revendicare

3

Procedeu de obținere de suporturi poroase tristratificate, **caracterizat prin aceea că**,
peste componentul a) constituit din 60/80% collagen fibrilar tip I, obținut din derma de vițel,
sub formă de gel, cu structură nativă triplu helicoidală, cu un conținut de 1,2...1,4% collagen
substanță uscată, se adaugă componentul b) 40/20% soluție de 2% alginat de sodiu și
componentul c) 0,5% agent de reticulare, respectiv glutaraldehidă, care se amestecă în
compoziția finală sub formă de soluție 0,2...0,3% în apă distilată obținându-se astfel gelurile
compozite, care au fost turnate în cutii Petri din sticlă, în straturi de 2 și 3 mm și liofilizate
timp de 48 h, obținându-se forme spongioase care au fost lipite între ele cu un gel de
colagen de concentrație 1%, pH 7,4 și care au fost uscate în etuvă la 28°C timp de 24 h,
obținându-se un suport triplu stratificat care poate fi însămânțat atât cu keratinocite cât și cu
fibroblaste pentru a fi administrat ca tratament pentru răni.

11

13

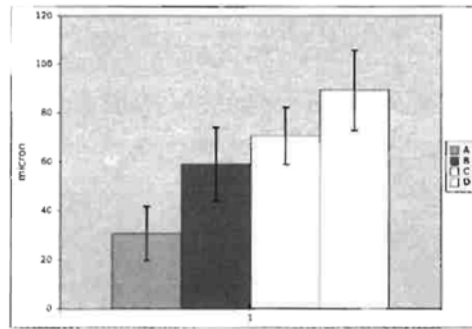


Fig. 1

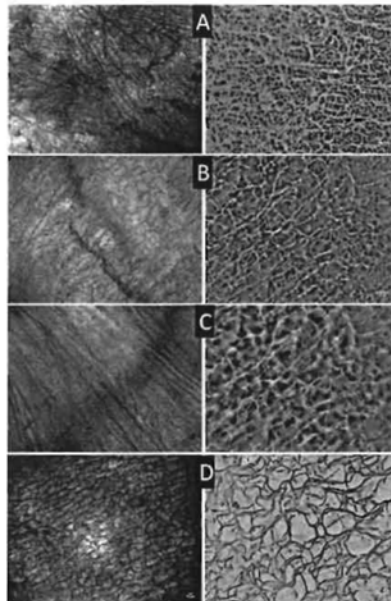


Fig. 2

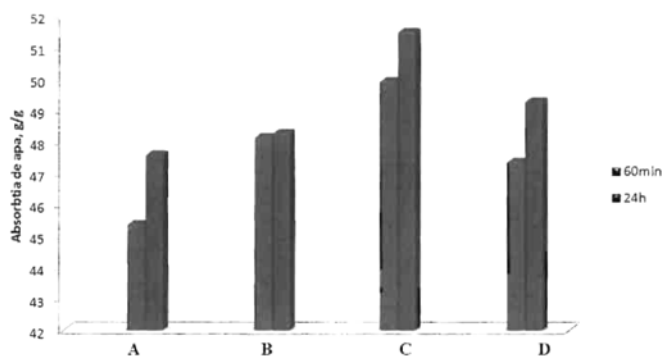


Fig. 3

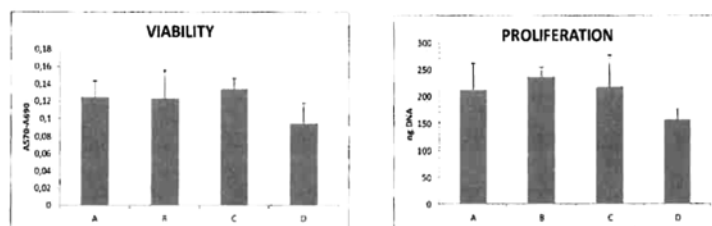


Fig. 4

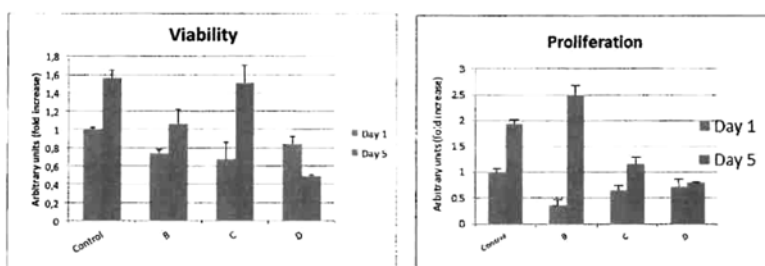


Fig. 5

