



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2018 00840

(22) Data de depozit: 26/10/2018

(41) Data publicării cererii:
30/04/2020 BOPI nr. 4/2020

(71) Solicitant:

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

(72) Inventatori:

• MARIN MARIA MINODORA,
SAT PĂUȘEȘTI - OTĂȘĂU,
COMUNA PĂUȘEȘTI, VL, RO;
• ALBU KAYA MĂDĂLINA GEORGIANA,
BDUL.TINERETULUI, NR.21, BL.Z6, SC.1,
ET.7, AP.48, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B,
RO;

• MARIN ȘTEFANIA, BD. MATEI BASARAB
NR. 40, BL. 30, SC. B, AP. 21, ET. 5,
SLOBOZIA, IL, RO;
• DANILA ELENA, SAT GHEBOAIA,
COMUNA FINTA, DB, RO;
• BUMBENECI GEORGETA,
STR.LT.ILIE CAMPEANU NR.3, BL.15A,
SC.2, AP.16, SECTOR 5, BUCUREȘTI, B,
RO;
• ALDEA CORINA,
STR.GENERAL ION CULCER, NR.15,
SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO;
• GHEORGHE COARA,
STR. CAP. PETRE MIȘCĂ, NR.4, BL.M16,
SC.1, ET.8, AP.35, SECTOR 5,
BUCUREȘTI, B, RO;
• ALBU LUMINIȚA FLORICA,
CALEA FERENTARI NR. 23, BL. 129B,
SC. 3, ET. 4, AP. 82, SECTOR 5, O.P.75,
BUCUREȘTI, B, RO

(54) PROCEDEU DE OBTINERE A EXTRACTELOR COLAGENICE
DIN CARTILAJ BOVIN PENTRU APLICAȚII MEDICALE

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a extrac-
telor colagenice din cartilaj bovin, pentru aplicații
medicale. Procedeu conform invenției constă în
tratamentul alcalin al materiei prime, cartilaj bovin,
cu NaOH 1...5 M, raportat la flotă, timp de 5...8 h la
temperatura camerei, urmat de tratamente succesive cu
1...10% acid clorhidric, respectiv, acid citric și acid

lactic, prelucrări mecanice, urmate de filtrare,
omogenizare și purificare, rezultând un gel cu puritate
ridicată, având un conținut de substanță uscată de
1,3...2,6% și pH de 2...4.

Revendicări: 2

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).



21

**Procedeu de obținere a extractelor colagenice din cartilaj bovin pentru aplicații
medicale**

OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI	
Cerere de brevet de invenție	
Nr.	a 218 840
Data depozit	26-10-2018

Domeniul tehnic în care poate fi folosită invenția:

Invenția se referă la procedeul de obținere a extractelor colagenice din cartilaj bovin pentru aplicații medicale.

Descrierea stadiului actual:

Cartilajul este un țesut hialin ce prezintă o elasticitate ridicată, având o grosime de aproximativ 2 – 4 mm. În comparație cu alte țesuturi, cartilajul nu prezintă vase de sânge, vase limfatice și nervi. Acesta este alcătuit dintr-o matrice extracelulară densă (ECM) cu o distribuție redusă a intensității celulelor specializate numite condrocite. Condrocitele furnizează 5% sau mai puțin din volumul total al cartilajului, astfel, proprietățile funcționale ale cartilajului, inclusiv rigiditatea, durabilitatea și distribuția încărcării mecanice, se bazează pe matricea extracelulară. Matricea extracelulară conține collagen de tip II care reprezintă 90% până la 95% din collagen și formează fibrile și fibrele legate între ele cu proteoglicani. Tipurile de collagen I, IV, V, VI, IX și XI sunt de asemenea prezente, dar contribuie doar într-o proporție minoră care ajută la formarea și stabilizarea rețelei de collagen tip II. Comportamentul biomecanic al cartilajului articular este cel mai bine înțeles atunci când țesutul este privit ca un mediu bifazic. Celulele articulare sunt formate din două faze: o fază fluidă și o fază solidă. Apa este componenta principală a fazei lichide, contribuind cu până la 80% din greutatea umedă a țesutului. Faza solidă este caracterizată de ECM, care este poroasă și permeabilă. Relația dintre proteoglicanii agregați și fluidele interstițiale asigură rezistența la compresiune a cartilajului prin forțe negative de repulsie electrostatică. Aplicarea inițială și rapidă a forțelor de contact articulare în timpul încărcării articulației determină o creștere imediată a presiunii fluidului interstițial. Această creștere locală a presiunii determină lichidul să curgă din ECM, generând o mare rezistență la frecare pe matrice. Când încărcarea compresivă este eliminată, fluidul interstițial curge înapoi în țesut. Permeabilitatea scăzută a cartilajului articular împiedică scurgerea rapidă a fluidului din matrice.

Cartilajul articular este viscoelastic și prezintă un comportament dependent de timp atunci când este supus unei sarcini sau unei deformări constante. Două tipuri de mecanisme sunt responsabile de viscoelasticitatea cartilajului articular: mecanismul dependent de flux și cel independent de flux. Mecanismul dependent de flux depinde de fluidul interstițial și de fricțiunea asociată cu acest flux. Frânarea rezultată din fluidul interstițial este cunoscută drept comportament viscoelastic bifazic. Componenta independentă de flux a viscoelasticității este

determinată în mod specific de mișcarea macromoleculară. Ca urmare, presiunea fluidului asigură o componentă semnificativă a suportului încărcăturii totale, reducând astfel tensiunea care acționează asupra matricei solide.

Cartilajul prezintă, de asemenea, un răspuns stres-relaxare. Atunci când se aplică o presiune constantă asupra țesutului, deformarea acestuia crește odată cu timpul și se va deforma până când va atinge o valoare de echilibru. În mod similar, atunci când cartilajul este deformat și menținut la o presiune constantă, stresul va crește până la un vârf, care va fi urmat de un ritm lent stres-relaxare până la atingerea unei valori de echilibru. Deoarece cartilajul articular tinde să rămână cu o tensiune crescută, acesta nu poate fi descris de modulul lui Young. Întinderea fibrelor de collagen distribuite aleatoriu asigură cartilajului răspunsul la tensiunea de forfecare. Proprietățile rezistenței la tracțiune derivă din aranjamentul molecular precis al fibrelor de collagen. Stabilizarea și rezistența maximă la tracțiune a fibrei de collagen sunt considerate a rezulta din legăturile încrucișate intra- și intermoleculare.

Din cauza potențialului limitat de regenerare, repararea cartilajului articular se prezintă ca una dintre cele mai dificile sarcini, iar o modalitate de a rezolva această problemă este reprezentată de biomateriale. Aceste biomateriale trebuie să prezinte anumite caracteristici speciale precum biocompatibilitate și bioresorbabilitate, trebuie să susțină creșterea celulară, proliferarea și diferențierea, să asigure proprietăți mecanice ideale și să asigure transportul nutrienților și deșeurilor celulare. În ultimii ani, cercetătorii au testat atât biomateriale naturale cât și sintetice cu scopul de a crea un mediu propice care să furnizeze semnalele biologice necesare să orienteze comportamentul celular către repararea cartilajului și către suport celular. Aceste biomateriale pot fi împărțite în două clase: materiale naturale și materiale sintetice. Materialele naturale precum collagenul, chitosanul, alginatul, fibrina, celuloza etc. prezintă proprietăți mecanice slabe, iar proprietățile lor fizice pot să varieze, în funcție de sursă. Materialele sintetice precum acidul poli (lactic-glicolic) (PLGA), acidul polilactic (PLA), policaprolactona (PLC) etc. prezintă avantajul că dețin proprietăți mecanice consistente, controlabile și precise precum rigiditate, porozitate sau elasticitate dar au dezavantajul că unele dintre acestea pot induce citotoxicitate.

Collagenul reprezintă componenta principală a matricei extracelulare. Collagenul este o proteină naturală cu o structură triplu-helicoidală și prezintă o compatibilitate excelentă a țesuturilor, biodegradabilitate lentă, iar produsele sale de degradare sunt absorbite cu ușurință de organism fără inflamație.

Astfel extractele collagenice din cartilaj bovin reprezintă un candidat ideal pentru aplicațiile medicale ce implică regenerarea cartilajului afectat.

Brevetul CN106916870 (A) descrie o metodă de obținere a collagenului tip II din cartilaj bovin prin hidroliză enzimatică. Metoda cuprinde următoarele etape: degresare, dezinfectare, omogenizare, hidroliză enzimatică, filtrare și uscare. În etapa de hidroliză enzimatică, pH-ul suspensiei obținute în etapa de omogenizare este ajustat la 2,5-8,5, se adaugă o enzimă reprezentând 0,001-2% din greutatea cartilajelor; hidroliza enzimatică se realizează la 25-50° C timp de 12-48.

O altă metodă de obținere a collagenului tip II prin hidroliză enzimatică este descrisă în brevetul US5840848 (A), prin tratarea țesuturilor din stern de pui care conțin collagen tip II mai întâi cu pepsină și apoi cu tripsină. Enzimele au fost îndepărtate prin spălare și/sau dializă sau diafiltrare.

Brevetul CN101301490 (A) descrie o metodă de obținere a collagenului tip II cu aplicații medicale din cartilaj articular prin tratamente acide, folosind soluții de acid clorhidric și acid acetic, apoi pepsină adăugată de două ori sub agitare, supernatantul a fost îndepărtat prin centrifugare, iar inactivarea pepsinei s-a realizat cu ajutorul unei soluții de EDTA.

Brevetul CN102146428 (A) prezintă o metodă pentru extracție a collagenului de tip II din cartilajul animal, supus metodelor de enzimoliză, ultrafiltrare și uscare prin pulverizare.

În brevetul CN103352063 (A) este descrisă o metodă de extracție a collagenului din țesut cartilaginos articular prin tratamente acide, alcaline, enzimatică și centrifugare. O altă metodă de obținere a collagenului din surse de cartilaj animal este prezentată în brevetul CN105331662 (A), unde sunt utilizate hidrolize acide, bazice, enzimatică și tratamente cu ultrasunete. Metoda de preparare cuprinde următoarele etape: luarea cartilajelor animale proaspete și trasabile ca materii prime; efectuarea unui tratament de purificare pe cartilagiile animale prin procedee de congelare repetată, de degresare cu ultrasunete, de înmuiere bazică - acidă; desfășurarea proceselor de îndepărtare a zahărurilor, tratare cu enzime compuse, purificare centrifugală pe mai multe perioade, dializă cu membrană și uscare, obținându-se astfel collagen spongios nedenaturat tip II.

Brevetele descrise mai sus prezintă metode de extracție a collagenului din țesuturi cartilaginoase utilizând atât enzime, cât și acizi și baze, combinând aceste trei metode, dar au dezavantajul de a obține un produs greu de purificat, etapă esențială în aplicațiile medicale. De asemenea, un alt dezavantaj îl reprezintă și timpul îndelungat de obținere al acestora.

Invenția propusă înlătură dezavantajele enunțate prin aceea că procedeul, conform invenției, permite obținerea de extracte collagenice din țesuturi cartilaginoase doar prin hidroliză acidă și alcalină, fără a utiliza enzime care sunt greu de inactivat.

Problema tehnica

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția constă în procedeul de obținere a extractelor colagenice din cartilaj bovin pentru aplicații medicale, având ca scop îmbunătățirea calității vieții a persoanelor cu probleme articulare.

Soluția tehnica

Procedeul de obținere a extractelor colagenice din cartilaj bovin, conform invenției, constă în aceea că, materia primă a fost spălată cu o soluție de detergent bio 0,1...1 %, timp de 1-2 ore, ulterior cu apă timp de 2-3 ore, iar apoi a fost supusă unui tratament alcalin NaOH 1...5 M, raportat la flotă pentru îndepărtarea țesuturilor necolagenate (grăsimi), timp de 5-8 ore la temperatura camerei (20...25°C).

După tratamentul alcalin a fost efectuată spălarea timp de 6 ore sub jet de apă continuu, ulterior fiind supuse unor operații mecanice specifice, pastrându-se doar țesutul cartilaginos.

Pentru gonflare, cartilajul bovin a fost supus unor tratamente acide succesive (pH 3, la temperatura camerei: 20-25°C), utilizând pe rând: acid clorhidric 1...10%, raportat la flotă, acid lactic 1...10%, raportat la flotă și acid citric 1 - 10%, timp de 8-24 ore fiecare tratament acid. Fiecare tratament acid a fost urmat de câte o spulare, timp de 1-2 ore. După gonflare au fost realizate prelucrări mecanice ale cartilajului bovin în vederea obținerii extractelor colagenice. În final au fost efectuate filtrarea și omogenizarea, obținându-se extracte colagenice cu un conținut de substanță uscată de 1,3...2,6%, cenușă nedetectabilă și pH 2...4.

Avantajele invenției în raport cu stadiul tehnicii

Aplicarea invenției conduce la următoarele avantaje:

- procedeul conform invenției permite obținerea de extracte colagenice din țesuturi cartilaginoase doar prin hidroliză acidă și alcalină, fără a utiliza enzime care sunt greu de inactivat;
- procedeul conform invenției este simplu, aplicabil la temperatura camerei: 20...25°C, cu consum redus de energie și cu aparatură simplă, permițând obținerea de extracte cu puritate ridicată, specifică materialelor pentru aplicații medicale.

Descrierea detaliată a invenției:

Procedeul de obținere, conform invenției, constă în supunerea cartilajului bovin unui tratament alcalin cu NaOH 1...5 M și tratamente acide succesive, utilizând pe rând: acid clorhidric 1...10%, raportat la flotă, acid lactic 1...10%, raportat la flotă și acid citric 1 - 10%.

În final au fost efectuate prelucrări mecanice ale cartilajului bovin, urmate de filtrare, omogenizare și purificare obținându-se extracte colagenice sub formă de gel. Extractele de colagen sub formă de gel, obținute conform procedeului enunțat au un conținut de substanță uscată de 1,3...2,6%.. Cenușa și grăsimea trebuie să fie nedetectabile la analiza calitativă și cantitativă, iar pH-ul este acid, 2...4.

Invenția este explicată în detaliu prin următoarele exemple:

Exemplul 1

În această invenție materia primă – cartilajul bovin, a fost spălată cu o soluție de detergent bio 0,1 %, timp de 1-2 ore, ulterior cu apă timp de 2-3 ore, iar apoi a fost supusă unui tratament alcalin NaOH 1 M, raportat la flotă pentru îndepărtarea țesuturilor necolagenice (grăsimi), timp de 5-8 ore la temperatura camerei (20-25°C). După tratamentul alcalin a fost efectuată spălarea timp de 6 ore sub jet de apă continuu, ulterior fiind supuse unor operații mecanice specifice, pastrându-se doar țesutul cartilaginos. Pentru gonflare, cartilajul bovin a fost supus unor tratamente acide succesive (pH 3, la temperatura camerei: 20-25°C), utilizând pe rând: acid clorhidric 8%, raportat la flotă, acid lactic 10%, raportat la flotă și acid citric 10%, timp de 8-24 ore fiecare tratament acid. Fiecare tratament acid a fost urmat de câte o spalare, timp de 1-2 ore. După gonflare au fost realizate prelucrări mecanice ale cartilajului bovin în vederea obținerii extractelor colagenice. În final au fost efectuate filtrarea și omogenizarea, obținându-se extracte colagenice sub formă de gel.

Exemplul 2

Procedeul de obținere a fost similar cu cel descris în Exemplul 1, exceptând procentul de acid citric care a fost de 8%, raportat la flotă.

Exemplul 3

Procedeul de obținere a fost similar cu cel descris în Exemplul 2, exceptând procentul de acid lactic care a fost de 8%, raportat la flotă.

Exemplul 4

Procedeul de obținere a fost similar cu cel descris în Exemplul 1, exceptând tratamentul alcalin care a fost efectuat cu NaOH 5 M, raportat la flotă.

REVENDICĂRI

1. Procedeul de obținere a extractelor colagenice din cartilaj bovin pentru aplicații medicale, **caracterizat prin aceea că**, materia primă – cartilajul bovin a fost supusă unui tratament alcalin NaOH 1...5 M, raportat la flotă pentru îndepărtarea țesuturilor necolagenate (grăsimi), timp de 5-8 ore la temperatura camerei (20-25°C) și tratamente acide succesive, utilizând pe rând: acid clorhidric 1...10%, raportat la flotă, acid lactic 1...10%, raportat la flotă și acid citric 1 - 10%, prelucrări mecanice, urmate de filtrare, omogenizare și purificare.

2. Procedeul de obținere definit în revendicarea 1, **caracterizat prin aceea că**, extractele de collagen rezultate sub formă de gel, de puritate ridicată, au un conținut de substanță uscată de 1,3...2,6%, cenușa și grăsimea trebuie să fie nedetectabile la analiza calitativă și cantitativă, iar pH-ul este acid, 2...4.