



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2020 00648

(22) Data de depozit: 15/10/2020

(41) Data publicării cererii:
30/03/2021 BOPI nr. 3/2021

(71) Solicitant:
• INSTITUTUL NAȚIONAL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE ÎN DOMENIUL
PATOLOGIEI ȘI ȘTIINȚELOR
BIOMEDICALE "VICTOR BABEȘ",
SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR. 99-101,
SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:
• ALBULESCU RADU NICOLAE AUREL,
STR. ROȘIA MONTANĂ NR. 6, BL. 07,
SC. C, ET. 2, AP. 125, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;
• TANASE CRISTIANA,
CALEA 13 SEPTEMBRIE NR.126, BL.P 34,
SC.1, AP.30, SECTOR 5, BUCUREȘTI, B,
RO;
• CODRICI ELENA,
STR. CÂMPIA LIBERTĂȚII NR. 4,
BL. PM 51, SC. 3, ET. 7, AP. 117,
SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;
• POPESCU IONELA DANIELA,
BD.THEODOR PALLADY, NR.4, BL.M2,
SC.A, AP.28, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B,
RO;

• MIHAI SIMONA, BD. CAMIL RESSU
NR. 76, BL. S1B-S1C, SC. B, AP. 34,
SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;
• ENCIU ANA-MARIA, STR. PLUGARILOR
NR. 1, BL. 94, SC. A, AP. 15, SECTOR 4,
BUCUREȘTI, B, RO;
• POP SEVINCI, STR. POIANA, NR.4, AP.12,
SIBIU, SB, RO;
• LUPU-ADI MIHAELA, ALEEA UCEA, NR.1,
BL.P11, SC.1, AP.M3, SECTOR 4,
BUCUREȘTI, B, RO;
• BLEOTU CORALIA,
ALEEA LUNCA BRADULUI NR. 2, BL. H5,
SC. 6, AP. 2, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B,
RO;
• CHIFIRIUC MARIANA CARMEN,
STR. COSTACHE STAMATE NR. 5, BL. A8,
SC. 1, ET. 9, AP. 37, SECTOR 4,
BUCUREȘTI, B, RO;
• GRADISTEANU GRAȚIELA, STR.AVIATIEI
NR.15, BL.7D, SC.2, ET.2, AP.28,
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;
• TIHAUAN BIANCA,
STR.CODRII NEAMȚULUI NR.5-7, BL.A,
SC.A, AP.8, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO

(54) **PRODUS PE BAZĂ DE COLAGEN PENTRU APLICAȚII
ÎN INGINERIA TISULARĂ ȘI METODE DE TESTARE
A SIGURANȚEI ȘI EFICACITĂȚII ACESTUIA**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unui produs pe bază de colagen pentru aplicații în ingineria tisulară. Procedeu, conform invenției, constă în procesarea prin metode mecanice, chimice și enzimactice a unei surse de colagen de tip tendonul lui Ahile recoltat de la bovine, fiind adus la o formă cvasi-solubilă care este filtrată prin membrane de 0,8 μm, rezultând un gel de colagen, cu o valoare pH de 2,3...2,5, aspect

albicios-translucid, consistență vâscoasă, având o capacitate moderată de promovare a proliferării celulare și o capacitate bună de a induce repararea tisulară.

Revendicări: 3

Figuri: 6

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).



OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI Cerere de brevet de invenție Nr. <u>a 2020 ep 648</u> Data depozit <u>15-10-2020</u>
--

42

Produs pe baza de colagen pentru aplicații în ingineria tisulară și metode de testare a siguranței și eficacității acestuia

DESCRIERE

Stadiul cunoașterii

Numeroase publicații științifice se ocupă de prepararea și utilizarea în aplicații biologice a colagenului de diferite origini, ca de ex. colagen bovin (sursa predominantă fiind colagenul din piele), colagen din organisme marine (de ex., colagen din piele de rechin), colagen din tendoane (cabaline, de coadă de șobolan, etc).

Ne vom rezuma la aplicațiile care au în vedere orientările către inginerie tisulară.

Selim et al în US 9649341 folosește colagen uman și colagen bovin pentru a realiza matrici de regenerare tisulară. Sunt utilizate o serie de teste de proliferare celulară, folosind testele Alamar Blue și Luciferase.

US 6974679 descrie obținerea de colagen din piele de bovine și utilizarea acestuia pentru testarea in vitro a eficacității unor produse conținând colagen poros acoperit cu un strat de membrana de colagen. Testele de eficacitate sunt efectuate pe piese de derm reconstituit, utilizând ca metodă de detecție testul MTT.

Simpson et al US 8586345 descriu obținerea și utilizarea colagenului electroprocesat, inclusiv utilizarea sa ca matrice extracelulară pentru inginerie tisulară, inclusiv fabricarea de organe și țesuturi implantabile, procesul fiind realizat prin electrodepunere de colagen și celule. Ca și precedentele două brevete, se menționează reticularea colagenului, ceea ce conferă o soliditate mărită a acestui produs. Brevetul nu revendică specific metode de evaluare a eficacității compusului.

Numeroase publicații științifice se ocupă de prepararea și utilizarea în aplicații biologice a colagenului de diferite origini, ca de ex. colagen bovin (sursa predominantă fiind colagenul din piele), colagen din organisme marine (de ex., colagen din piele de rechin), colagen din tendoane (cabaline, de coadă de șobolan, etc).

Ceea ce aduce original procedeul propus spre brevetare este în primul rând, utilizarea unei noi surse colagen, respectiv tendonul lui Ahile recoltat de la bovine. Materialul biologic este procesat prin metode mecanice, chimice și enzimatic, fiind adus la o formă cvasi-solubilă, ce

permite filtrarea sterilizantă prin membrane de 0,8 micrometri. Ulterior etapei preparative, materialul este supus controlului analitic, precum și testelor biologice *in vitro* pentru a evalua citotoxicitatea, suportul pentru activitatea proliferativă celulară, capacitatea de a suporta în timp real migrarea și atașarea celulară, capacitatea de a suporta regenerarea tisulară. Combinația de metode pentru testarea proprietăților biologice nu este menționată ca atare în literatură.

Invenția va fi în continuare ilustrată prin exemple, care au un caracter ilustrativ și nicidecum limitativ.

Figuri:

Figura 1. Efectul exercitat *in vitro* de pudra de colagen hidrolizat asupra fibroblastelor Hs27, tratate 24 de ore. Integritatea membranei plasmatică a fost evaluată prin testul eliberării LDH, iar rezultatele sunt prezentate ca medie \pm SEM pentru probele analizate în triplicat.

Figura 2. Efectul exercitat *in vitro* de pudra de colagen hidrolizat asupra monocitelor/macrofagelor, tratate 24 de ore. Integritatea membranei plasmatică a fost evaluată prin testul eliberării LDH, iar rezultatele sunt prezentate ca medie \pm SEM pentru probele analizate în triplicat.

Figura 3. Evaluarea viabilității celulare pentru probele de **colagen hidrolizat pulbere** furnizate de către agentul economic și **colagen hidrolizat pulbere comercial**, timp de expunere 24 de ore, test MTS.

Figura 4. Evidențierea aderenței celulare la 5 ore de la însămânțare cu ajutorul măsurării impedanței electrice.

Figura 5. Evidențierea proliferării celulare la 72 de ore de la însămânțare cu ajutorul măsurării impedanței electrice.

Figura 6. Monitorizarea în timp real cu ajutorul videomicroscopiei – testul de scratching, în vederea evidențierii refacerii / proliferării celulare sub influența colagenului produs de agentul economic.

Se dau în continuare exemple de aplicare a invenției

Exemplul 1.**OBȚINEREA HIDROLIZATULUI DE COLAGEN**

Pentru obtinerea materialului colagenic, au fost utilizate surse bogate de colagen, respectiv materii prime de origine bovina de origine controlată din punct de vedere sanitar-veterinar. Metodologiile de prelucrare a materiilor prime s-au desfasurat in arii de lucru dedicate pentru fiecare etapa a procesului tehnologic, in conditii de mediu si igiena controlate. Materia prima atent selectionata si cu trasabilitate inregistrata a fost prelucrata in etapa tehnologica preliminara, ce cuprinde o succesiune de operatii, respectiv de decontaminare, dezghetare controlata, indepartarea partilor necolagenice sau lipidice, spalare cu minim cinci volume de apa pura (raportate la materia prima prelucrata). Ulterior, s-a realizat o prelucrare secundara (etapa tehnologica controlata, ce presupune maruntirea materiei prime cu ajutorul unui toicator industrial, cu sita Sirman, cu diametrul ochiurilor de 3-5 mm).

Materia prima prelucrata, a fost portionata, sub forma de pachete gata de utilizat si supuse congelarii rapide la -20°C . Au fost respectate regulile de control interfazic specific materiilor prime de origine animala, iar loturile de materie prima exploatate au fost introduse în baza de date privind trasabilitatea extinsă a produsului.

Colagenul a fost obtinut prin tehnici de solubilizare, in mediu acid, in prezenta enzimei proteolitice pepsina. A fost utilizat un echipament de tip omogenizator industrial prevazut cu cuve interschimbabile de capacitate utila de 50 L, care asigura omogenitate crescuta in masa de reactie, cu viteza de rotatie controlata (minim 40 rotatii/minut). Amestecul de extractie a colagenului, a presupus un mediu acid (pH 2-3), asigurat de o solutie de acid acetic 0.5M (20L), si enzima preteolitica, pepsina raportul dintre pepsina și substanta uscata a țesutului luat în lucru, fiind de 1:9. Obtinerea colagenului s-a desfasurat pe o perioada de 48 de ore, in conditii controlate de temperatura ($20-25^{\circ}\text{C}$), cu agitate intermitenta monitorizata (40 de rotatii/minut, timp de 20 minute). Indepartarea țesutului nedigerat s-a efectuat prin centrifugare (4°C , 9000 rpm, timp de 15 minute), obtinandu-se un gel de colagen, cu o valoare de pH 2.3-2.5, cu aspect albicios-translucid, cu consistenta vascoasa.

Hidroliza neutră a gelatinei obtinute s-a efectuat folosind un masterclav, la temperatura de 125°C, în condiții de sterilizare; Hidroliza s-a efectuat pe durata a 22 de ore și 33 minute (timp de lucru: 4 zile - în care s-au efectuat câte 3 cicluri x 99 minute/ zi).

Masterclavul a fost programat pentru menținerea soluției la o temperatura de 70 °C; la finalul a trei cicluri, au fost prelevate probe, pentru determinarea grupărilor alfa-amino; iar hidroliza a fost oprită în momentul obținerii a două valori identice pentru grupările alfa-amino. Soluția de hidrolizat a fost racită, în masterclav, până la temperatura de 60 °C, sub agitare. Concentrarea soluției de hidrolizat de collagen s-a realizat prin evaporare. Soluția concentrată s-a maturat la temperatura de 40 °C, timp de o oră. Soluția caldă (circa 40 °C) de hidrolizat a fost filtrată, utilizând un filtru ceramic de 20nm și ulterior a fost supusă liofilizării.

Determinarea cantitativa a aminoacizilor din hidrolizatul de collagen a fost realizată prin HPLC. Pentru fiecare probă, 10 mg hidrolizat de collagen au fost supuse unei reacții de hidroliză în prezență de HCl 6M, la temperatura de 110°C, timp de 24 ore. Reziduul a fost redizolvat în apă ultrapură cu 0.1% acid formic și adus la balon cotat de 25mL. Din soluțiile obtinute s-a făcut o diluție 1:10 direct în tubul de reacție. Soluțiile standard de aminoacizi (Leucină, Alanină, Tirozină, Triptofan, Fenilalanină) au fost preparate la concentrații diferite (0.5;1;2;3;4;5 ppm) în vederea trasării curbei de calibrare, prin dizolvare în 0.1% acid formic.

Exemplul 2

Testarea citotoxicității

Citotoxicitatea pudrei de collagen hidrolizat a fost testată pe liniile celulare umane normale: linia celulară de monocite/macrofage (ATCC CTR-9855TM) și linia celulară de fibroblaste umane Hs27 (ATCC CRL-1634), pe culturi expuse timp de 24 de ore. Citotoxicitatea a fost evaluată cu kitul **CytoTox® 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay** (LDH), Promega, prin adăugarea a 10 μL soluție de liză 10X (pentru 100μL volum original) în godeurile de control, cu 45 de minute înainte de adăugarea reactivului CytoTox96®, în vederea obținerii unui **Control maxim al eliberării LDH**. Ulterior au fost recoltați câte 50 μL supernatant din fiecare proba pentru determinarea LDH eliberat, peste care s-a adăugat reactivul CytoTox®. Probele au fost incubate la temperatura camerei, timp de 30 minute, la întuneric, ulterior având loc stoparea reacției și citirea

absorbanțelor probelor (densitatea optica - DO) la spectrofotometru la 450 nm. Cantitatea de LDH eliberata a fost direct proporțională cu DO citită (Figura 1, Figura 2).

Datele experimentale arată că viabilitatea celulară pentru ambele tipuri celulare utilizate nu este influențată în urma expunerii la diferite concentrații de pudră de colagen hidrolizat timp de 24 de ore. Totodată, acest rezultat este susținut de faptul că pudra de colagen hidrolizat nu modifică static semnificativ eliberarea LDH, ceea ce indică faptul că produsul nu afectează integritatea membranei celulare.

Exemplul 3

Testarea proliferării celulare

Numărul de celule metabolic active în cultură a fost determinat prin testul reducerii MTS. Rezultatele sunt prezentate ca medie \pm SEM pentru probe în triplicat. În testul de proliferare s-au utilizat celule Hs27. După o expunere la produsele testate timp de 24 de ore, s-a efectuat evaluarea utilizând kitul CellTiter 96 Aqueous One Solution cell proliferation assay (MTS), Promega, conform indicațiilor producătorului, prin adăugarea a 20 μ L reactiv/godeu, apoi, după o perioadă de incubare de 3 ore a fost citită densitatea optica (DO) la 450 ... 490nm. Numărul de celule viabile a fost proporțional cu DO citită (Figura 3)

Datele arată că preparatul de colagene are o capacitate ridicată de a sprijini proliferarea celulară, densitățile optice înregistrate la toate dozele fiind semnificativ mai ridicate față de valoarea control.

Exemplul 4

Evaluare în timp real a proliferării și viabilității celulare cu ajutorul măsurării impedanței electrice

În vederea cuantificării proliferării și viabilității celulare a fibroblastelor umane, cu ajutorul platformei xCELLigence, în prezența pulberilor de analizat, au fost folosite plăci E-Plate 16, conform protocolului furnizat de producător.

Rezultatele experimentale au fost obținute pe linia de fibroblaste umane HS27 (număr variabil de celule, între 50000 - 3000 per godeu), în prezența unor concentrații diferite de colagen – produs inovativ vs produs comercial (concentrații între 150 - 5 μ g/mL). Rezultate prezentate sunt

realizate într-un cadrul unui experiment derulat timp de 72 de ore, pe 3000 celule/godeu, cu aceleași concentrații de produs inovativ, respectiv produs comercial (150 $\mu\text{g/mL}$, respectiv 5 $\mu\text{g/mL}$) (Figura 4, Figura 5).

Legendă de culori pentru figurile 4 și 5:

control	150 $\mu\text{g/mL}$ produs inovativ	150 $\mu\text{g/mL}$ produs comercial	5 $\mu\text{g/mL}$ produs inovativ	5 $\mu\text{g/mL}$ produs comercial
---------	--------------------------------------	---------------------------------------	------------------------------------	-------------------------------------

În urma analizei rezultatelor experimentelor pe 3000 de celule, s-a constatat faptul că, atât din punct de vedere al aderenței (2-5 ore), cât și din punct de vedere al proliferării celulare (72 de ore), nu au fost înregistrate diferențe între produsul inovativ și cel comercial. De asemenea, nu au fost înregistrate diferențe atunci când au fost comparate între ele cele 2 concentrații analizate.

Exemplul 5

Monitorizarea în timp real cu ajutorul videomicroscopiei

Cuantificarea proliferării și viabilității celulare a fibroblastelor umane HS27 a fost realizată cu ajutorul platformei BioStation, în prezența pulberilor de colagen de analizat, în plăci HiQ4, cu 4 camere. Pentru evidențierea regenerării celulare, în urma realizării unui test scratching și sub efectul pulberilor de colagen hidrolizat, s-a realizat monitorizarea celulelor timp îndelungat (24 ore), prin videomicroscopie în timp real (Figura 6).

Testele de videomicroscopie și monitorizare în timp real a impedanței celulare au confirmat rezultatele anterioare, respectiv testul de viabilitate-proliferație celulară/citotoxicitate: MTS/LDH.

Produs pe baza de colagen pentru aplicații în ingineria tisulară și metode de testare a siguranței și eficacității acestuia

REVEDICĂRI

1. Procedul de obținere a hidrolizatului pe baza de colagen.
2. Produsul obținut conform revendicării 1 caracterizat prin aceea că prezintă biocompatibilitate și eficacitate crescute conform experimentelor din descriere.
3. Procedee de evaluare/Metode de testare a biocompatibilității și eficacității produsului.

Figura 1.

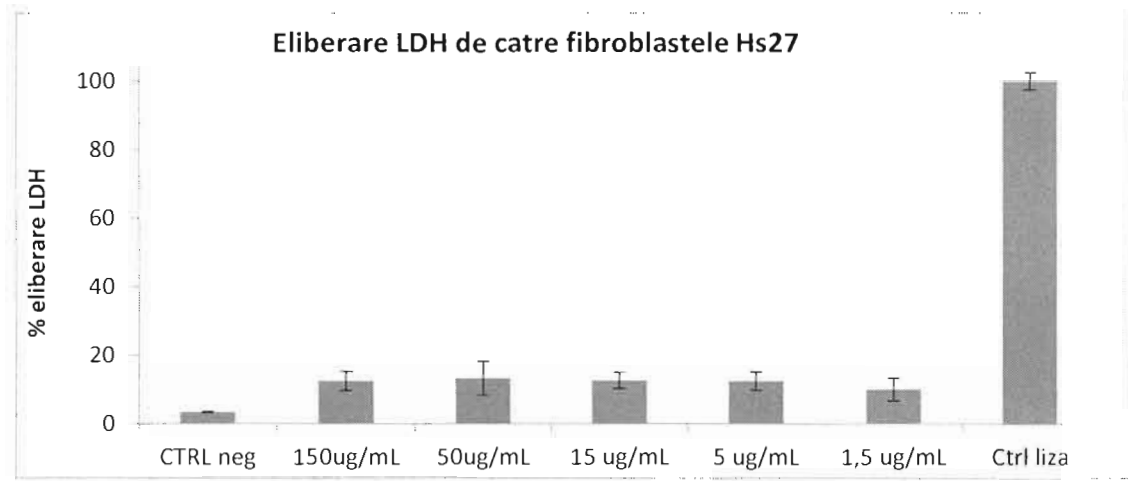


Figura 2.

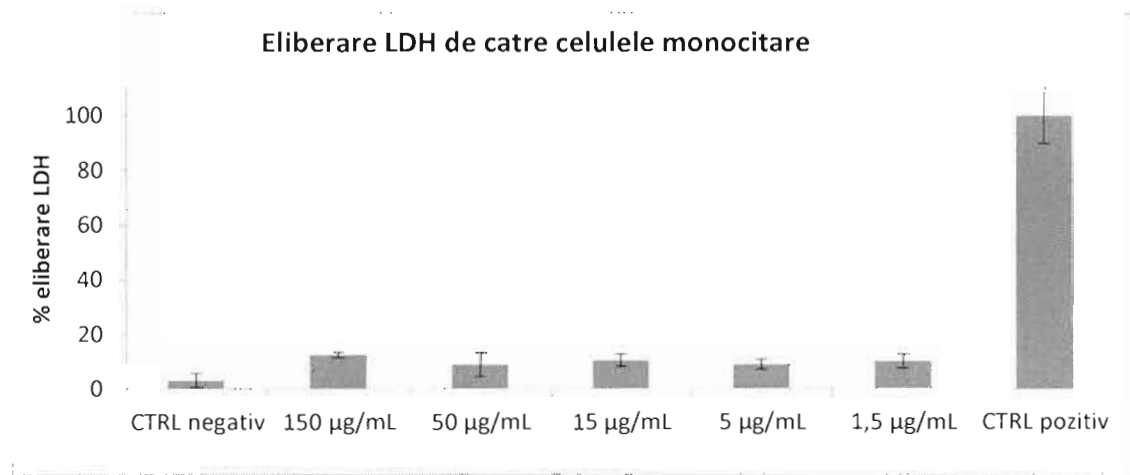


Figura 3.

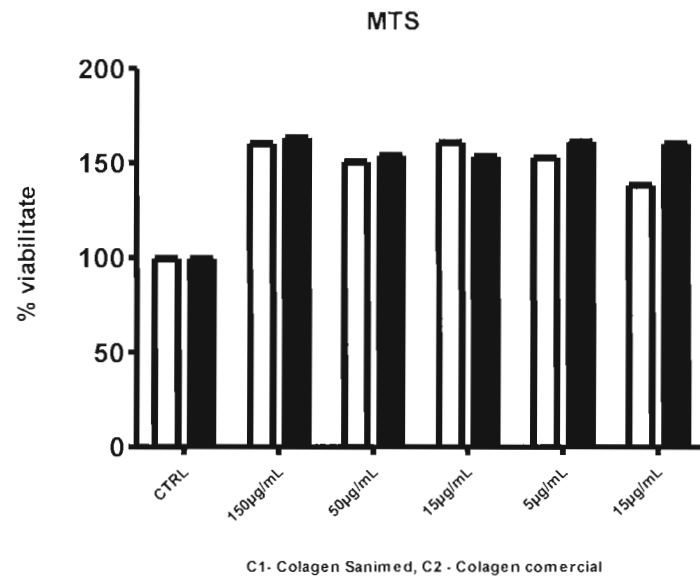


Figura 4.

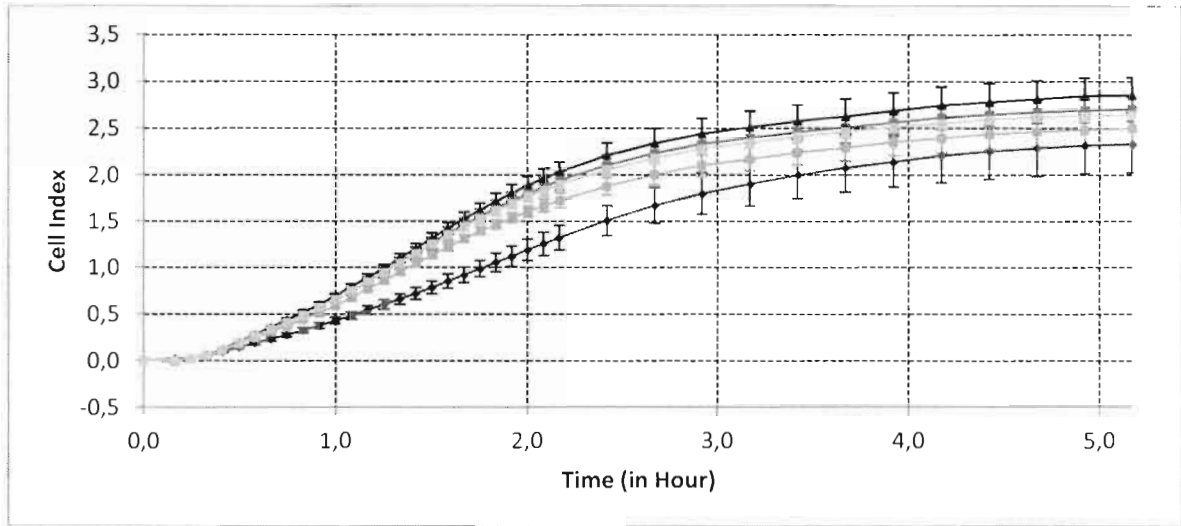


Figura 5.

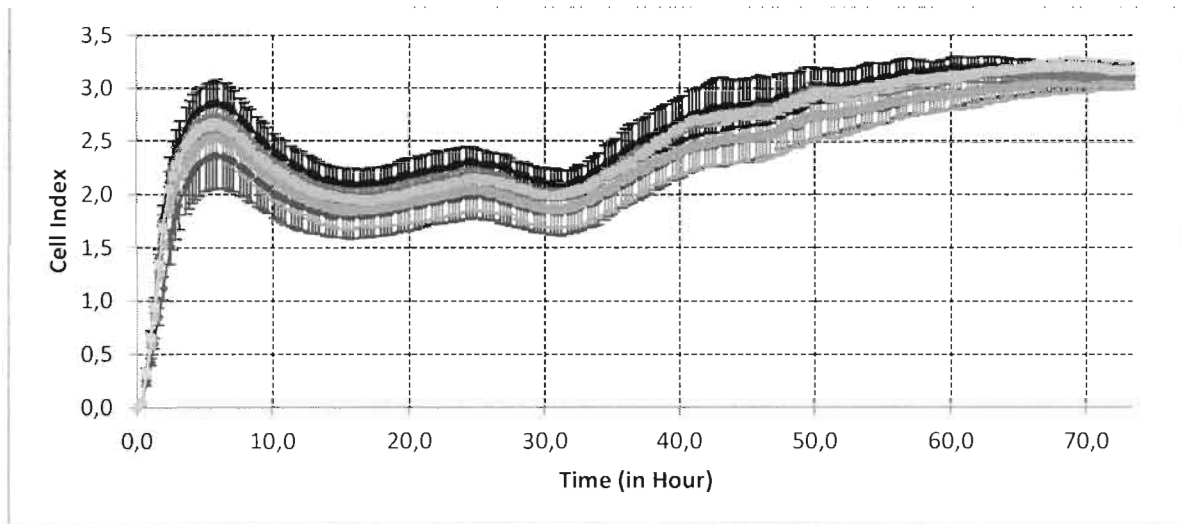


Figura 6.

