



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2023 00329

(22) Data de depozit: 27/06/2023

(41) Data publicării cererii:
30/12/2024 BOPI nr. 12/2024

(71) Solicitant:
• 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

(54) MATRICE ACELULARĂ DERMICĂ DIN PIELE DE STURION ȘI PROCEDEU DE OBTINERE A ACESTEIA

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unei matrice acelulare dermice obținută din piele de sturion, utilizată în chirurgia plastică și în tratamentul leziunilor foarte grave. Procedeu de obținere conform invenției constă în decarnarea pielii de sturion, degresarea acesteia, tăierea pielii în bucăți cu dimensiunea de 5 x 5 cm și supunerea acestora la un tratament cu acid acetic, tartric, citric sau lactic la un pH cuprins între 2,5...3,0, în urma căruia se separă straturile pielii și se izolează

meccanic stratul dermic care este decelulizat cu o soluție slab alcalină de NaOH, apoi se spală, și se supune dializei până ajunge la un pH fiziologic cuprins între 7,2...7,4, stratul dermic astfel obținut fiind apoi supus unui număr de 3 cicluri de reticulare prin înghețare - dezghețare urmat de liofilizare, obținându-se în final matricea acelulară dermică din piele de sturion.

Revendicări: 1

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.	a 2023 00329
Data depozit 27-06-2023	

RO 138510 A2

8

MATRICE ACELULARA DERMICA DIN PIELE DE STURION SI PROCEDEU DE OBTINERE A ACESTEIA

Domeniul tehnic in care poate fi folosita inventia:

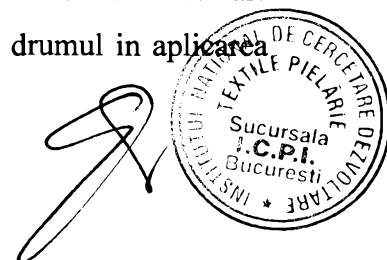
Inventia se refera o matrice acelulara dermica din piele de sturion, utilizabila in chirurgia plastica si in tratamentul leziunilor foarte grave si la un procedeu de obtinere a acestora.

Descrierea stadiului actual:

Imbunatatirea calitatii vietii umane prin regenerarea organelor deteriorate s-a manifestat mai intai prin mit, iar apoi a devenit realitate prin experimente timpurii si prin aparitia chirurgiei moderne in secolul al XIX-lea. Deteriorarea pielii este o cauza semnificativa de mortalitate si morbiditate si este important sa se gestioneze urgent un pacient care a fost internat cu leziuni severe. Pierderea unor portiuni de piele poate aparea din mai multe motive, cum ar fi leziunile traumatice datorate unor dispozitive explozive si accidentelor auto [1], ulceratii si muscaturi de caine, rezectie tumorală (peste 4,2 milioane de operatii anual) [2], tulburari genetice (conditii buloase), rani cronice sau chiar alte interventii chirurgicale, mai ales acum, in zile grele de razboi. Unul dintre cele mai frecvente motive pentru pierderea majora a pielii il reprezinta traumatismul termic, cand zone substantiale ale pielii pot fi deteriorate, adesea fara posibilitatea de regenerare a pielii. Arsurile si oparirile pot duce uneori la rani rapide, extinse si profunde, care nu pot fi tratate cu succes prin tehnici comune si pot duce rapid la moarte. Conform statisticilor recente ale Organizatiei Mondiale de Sanatate [3], 180000 de decese care au loc in fiecare an sunt cauzate de arsuri. Complicatiile apar din cauza infectiilor care duc la afectarea fluxului sanguin si necroza tisulara, care grabesc si mai mult morbiditatea. In ciuda progreselor in managementul ranilor cutanate, mortalitatea ramane ridicata [4]. Pierderea pielii prezinta o problema provocatoare, deoarece functia estetica este strans legata de bunastarea psihologica a pacientului [1].

Datorita importantei mari si cererii pentru produsele de inlocuire a pielii, exista o istorie lunga de dezvoltare a materialelor si multe grupuri de cercetare din intreaga lume s-au concentrat pe crearea de biomateriale pentru regenerarea pielii.

In ciuda avantajelor considerabile in intelegerea proprietatilor fizice si chimice ale materialelor, doar putine asa-numite biomateriale inteligente si-au gasit drumul in aplicarea clinica pana acum.



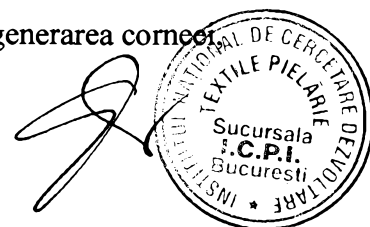
Matricea acelulara dermica (ADM acellular dermal matrix) este un biomaterial obtinut prin tratamentul special al pielii alogene pentru a indeparta componentele celulare care pot provoca respingerea. ADM a fost din ce in ce mai utilizat si dezvoltat pe scara larga datorita caracteristicilor sale convenabile, sigure si eficiente.

Exista mai multe tipuri de matrice acelulara dermica (ADM) datorata sursei speciei (cadavru uman, bovin, porc) [10, 11] sursa de tesut (de exemplu, derm, pericard, mucoasa intestinala), aditivi (de exemplu, antibiotice, surfactanti), hidratare (umeda, liofilizata) si pregatirea necesara (clatiri multiple, rehidratare). Ca alternativa la transplant, matricea acelulara dermica este biomaterialul de ultima generatie in reconstructia tisulara. S-a dovedit a fi un biomaterial eficient pentru utilizarea in reconstructiile pelvine, abdominale si ale peretelui toracic, reparare durala, chirurgia mainii, reconstructie ortopedica, neurochirurgicala, uroginecologica si uretrala; chirurgia arsurilor, fistula anala si procedurile de grea gingivala, defecte dupa rezectia carcinomului hipofaringian, contribuind la repararea, intarirea si regenerarea tesutului. Breuing a raportat pentru prima data in 2005 utilizarea dermului acellular uman in reconstructia sanului pe baza de implant [12].

Numarul de vizite postoperatorii la cabinet pentru pacientii care au fost tratati cu ADM a scazut, iar costul a fost mai mic decat al tratamentului clasic. Avantajele utilizarii matricei acelulare dermice fata de efectuarea tehnicilor submusculare traditionale includ reducerea durerii postoperatorii, rezultatul estetic imbunatatit si scaderea timpului operator.

Fiind biomateriale inovatoare noi, doar cateva ADM sunt disponibile pentru a fi utilizate de catre chirurgii reconstructivi, inclusiv FlexHD® complet hidratat de origine umana (Ethicon, Somerville, NJ); AlloDerm® liofilizat (LifeCell, Branchburg, NJ), Neoform™ (Mentor, Santa Barbara, CA), DermaMatrix™ (Synthes, West Chester, PA); Permacol™ derivat de origine porcina (Covidien, Boulder, CO) si Strattice® (LifeCell) [13].

Inventia CN105126170A prezinta o matrice acelulara dermica si o metoda de preparare a acesteia dupa urmatoarele etape: efectuarea pre-procesarii pielii unui mamifer pentru a obtine derma animala, efectuarea degresarii, inactivare virusi, efectuarea secventiala de deshidratare, liofilizare si pentru a obtine matrice acelulara dermica. Matricea acelulara dermica are viteza de degradare si biocompatibilitatea adecvata si o capacitate buna de inductie osoasa. CN107412867A se refera la obtinerea eterogena a matricei acelulare dermice din piele de porc tratata cu chitosan care are o imunogenitate scazuta, structura stereoscopica tridimensionala a fibrelor de collagen si o biocompatibilitate excelenta. CN104288837A reda procedeul de obtinere a unei matrice acelulare dermice pentru inlocuirea / regenerarea corneei.



avand la baza stratul dermic papilar al pielii de porc. US2012329034A1 se refera la o metoda pentru obtinerea matricei aceluare dermice, in care zaharoza este adaugata la ingredientele de baza constand din glicerol, propilenglicol si un solvent sau o solutie de baza astfel incat sa produca un crioprotector; solutia este injectata in piele sub epiderma si derma din care au fost indepartate celulele si se efectueaza apoi liofilizarea. Brevetele CN105268022A si CN105727367A prezinta obtinerea unei matricei aceluare xenodermice din piele de porc proaspata sarata si se folosesc metode de combinare fizica, chimica si biochimica. Pielea de porc este supusa unei serii de tratamente de degresare, umflare alcalina, eliminare alcalina a umflaturilor, prelucrare a cheratinazei, tratament secundar cu enzime si se obtine o matrice cu performante medicale excelente in arsuri si chirurgie plastica. O alta sursa folosita de autorii brevetului CN114259603A a fost pielea de pui embrionar. CN108187140A prezinta pielea de peste ca sursa pentru obtinerea matricei aceluare dermice. Metoda cuprinde urmatoarele etape (1) de pretratare a pielii de peste; (2) tratament de sterilizare si dezinfectie; (3) tratament de ungere; (4) tratament de decolorare; (5) tratament cu permeabilitate ridicata si scazuta; (6) baza puternica si tratament de ablatie, (7) tratament multigelare; si (8) liofilizare si tratament de dimensionare. CN112618799A reda obtinerea matricei aceluare dermice tot din piele de peste care este supusa proceselor de curatare, dezinfectie, tratament aceluare, inactivare a virusului, curatare pentru indepartarea metalelor grele, tratament cu o solutie de protectie, sterilizare terminala si altele asemenea. Conform metodei de preparare a matricei aceluare dermice din pielea de peste, nu se utilizeaza un agent chimic de reticulare, nu este necesar sa se introduca un solvent organic, riscurile de poluare ale pirogenilor, bacteriilor si altele asemenea pot fi controlate eficient, controlabilitatea procesului de preparare este ridicata, ADM din piele de peste conform metodei furnizate de inventie are o stabilitate termica mai mare decat o materie prima derivata din peste si este mai potrivit pentru regenerarea tesuturilor moi umane. O noua membrana de regenerare orala avand ca sursa sursa pielea de peste a fost prezentata in brevetul CN109078222A. Aceasta a fost obtinuta prin reticulare cu agentii de reticulare EDC/NHS. Metoda de preparare a membranei de regenerare orala include urmatoarele etape: procurarea pielii proaspete de peste ca materie prima, indepartarea carnii de peste, curatarea pielii pestelui fara carnea de peste, efectuarea degresarii enzimatic si decolorarea cu apa oxigenata, distrugerea celulelor printr-o metoda alcalina si un modul auxiliar cu ultrasunete si eliminarea impuritatilor; inmuiera pielii de peste in agentii de reticulare EDC/NHS, duc la realizarea unei membrane de regenerare orala din sursa de piele de peste. WO2013144727A2 descrie un suport care are la baza matricea aceluara dermica din

peste pentru ingrijirea ranilor si/sau alte aplicatii de vindecare a tesuturilor. Materialul suport



include o matrice extracelulara decelularizata din piele de peste si poate include, de asemenea, lipide din stratul lipidic al pielii de peste, celule viabile (de exemplu, fibroblaste si/sau keratinocite) pentru regenerarea tesuturilor.

Datorita structurii sale specifice si proprietatilor biologice bune date de continutul ridicat de collagen, cercetatorii din multe domenii au atras atentia asupra matricei aceluare dermice (ADM), care este benefica pentru a ajuta la regenerarea tesuturilor. In prezent, matricea aceluara dermica are ca sursa principala pielea bovina, porcina si cadaverica. Datorita constrangerilor religioase in special in iudaism si islam si a encefalopatiei spongiforme bovine ADM de origine umana si animala are limitari si optiunile de terapie actuale nu sunt suficiente. Sursa marina reprezinta o solutie rezonabila la situatia actuala a medicinei.

Nu exista pana in prezent date de piata sau in literatura (inclusiv brevete) despre matricea aceluara dermica din piele de sturion.

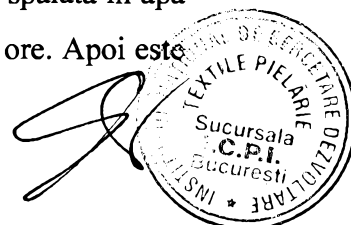
Avantajul inventiei este ca matricea aceluara dermica din piele de sturion este un biomaterial sigur, comparativ cu cele obtinute din piele de mamifer care au riscul de a transmite prioni, timpul de prelucrare este mult mai scurt (zile in loc de saptamani in cazul mamiferelor), sunt antigenice, biocompatibile si foarte rezistente mecanic. Pot inlocui cu succes tesuturi sau pot fi utilizate in leziuni care necesita o perioada lunga de regenerare.

Problema tehnica

Avand in vedere accidentele tot mai dese care au ca rezultat pierderea sau deteriorarea unor tesuturi umane, problema tehnica pe care o rezolva inventia consta in realizarea unei matricei aceluare dermice obtinute din piele de sturion cu scopul de a vindeca sau inlocui tesuturile lezate.

Solutia tehnica

Matricea aceluara dermica din piele de sturion conform inventiei inlatura dezavantajele mentionate prin aceea ca procedeul de obtinere consta in aceea ca, in prealabil, pielea de sturion este decarnata si degresata, apoi taiata in bucati (5 x 5 cm) care nu contin zone cartilaginoase. Bucatile de piele din sturion se supun apoi unui tratament acid, la un pH = 2.5-3.0 timp de 48-72 ore. Bucatile de piele de sturion se gonfleaza usor in acest timp in prezenta acizilor, se separa straturile pielii si apoi se inlatura epiderma si hipoderma, printr-un proces mecanic. Derma astfel izolata va fi spalata cu o solutie foarte slaba de NaOH (0.01M) pentru a indeparta toate urmele de grasime sau componente celulare. Apoi derma este spalata in apa distilata pana va ajunge la pH-ul fiziologic si tinuta la dializa pentru inca 24 de ore. Apoi este



supusa la trei cicluri de inghet-dezghet, iar ulterior liofilizata si sterilizata pentru a obtine matricea acelulara dermica. Matricea acelulara dermica are un continut de 100% collagen de origine marina, este foarte rezistenta si poate fi utilizata in chirurgie plastica.

Avantajele inventiei in raport cu stadiul tehnicii

Aplicarea inventiei conduce la urmatoarele avantaje:

- realizarea unui membrane naturale (matrice acelulara dermica - ADM) din piele de sturion pentru inlocuirea sau vindecarea unor tesuturi lezate; pana in prezent exista ADM-uri numai din piele de porc, bovina si cadaverica;
- utilizarea unor surse marine, sigure in locul tesuturilor mamifere care transmit prioni, sau diferite microorganisme sau chiar si boli;
- utilizarea ADM-urilor in locul pansamentelor din collagen au avantajul ca sunt mult mai greu degradabile si pot inlocui chiar unele tesuturi.

Descrierea detaliata a inventiei:

Pielea de sturion de decarneza, degreseaza, se taie in bucati si se supune tratamentului acid la un pH – 2.5-3.0. Acizii folositi sunt acizi organici, cum ar fi acidul acetic, acidul tartaric, acidul citric si acidul lactic. In urma tratamentului acid se separa straturile pielii si se izoleaza mecanic stratul dermic. Acesta este decelularizat printr-o solutie slab alcalina de NaOH si se spala si se supune dializei pana ajunge la un pH fiziologic de 7.2 – 7.4. Stratul dermic este apoi supus unor cicluri de reticulare prin inghetare-dezghetare, urmat de liofilizare.

Inventia va fi explicata mai in detaliu prin urmatoarele exemple:

Exemplul 1

Pielea de sturion decarnata, degresata si taiata in bucati de 5x5 cm este supusa unui tratament cu acid acetic 0.5M timp de 3 zile. Dupa acest timp, pielea se separa in cele trei straturi si derma este izolata si tratata in continuare. O solutie de NaOH 0.01M este utilizata pentru inlaturarea grasimilor si componentelor celulare ale dermei urmate de spalare si dializa pana la pH-ul fiziologic. Derma astfel obtinuta este supusa unor cicluri de inghetare-dezghetare (3 cicluri) si apoi liofilizata pentru a obtine matricea acelulara dermica din piele de sturion.

Exemplul 2

Pielea de sturion decarnata, degresata si taiata in bucati de 5x5 cm asa cum este descris in Exemplul 1 a fost supusa unui tratament acid, exceptand acidul, care a fost acid lactic in proportie de 1% (v/v) (raportat la flota). Procesele de inghetare-dezghetare si liofilizare au



fost similare cu cele descrise in Exemplul 1. S-a obtinut matricea acelulara dermica din piele de sturion.

Exemplul 3

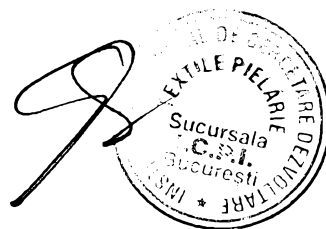
Pielea de sturion decarnata, degresata si taiata in bucati de 5x5 cm asa cum este descris in Exemplul 1 a fost supusa unui tratament acid, exceptand acidul, care a fost acid citric in proportie de 1.5% (v/v) (raportat la flota). Procesele de inghetare-dezghetare si liofilizare au fost similare cu cele descrise in Exemplul 1. S-a obtinut matricea acelulara dermica din piele de sturion

Exemplul 4

Pielea de sturion decarnata, degresata si taiata in bucati de 5x5 cm asa cum este descris in Exemplul 1 a fost supusa unui tratament acid, exceptand acidul, care a fost acid tartric in proportie de 0.5% (w/v) (raportat la flota). Procesele de inghetare-dezghetare si liofilizare au fost similare cu cele descrise in Exemplul 1. S-a obtinut matricea acelulara dermica din piele de sturion.

Bibliografie

1. Iwen W, Jennifer E "Biomaterials and Tissue Engineering for Soft Tissue Reconstruction" in *Natural and Synthetic Biomedical Polymers* **2014**, 14, 235-241.
2. American Society of Plastic Surgeons, 2012 Plastic Surgery Statistics Report, 2012.
3. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/burns> accesed at March 17, 2022.
4. Chawla R et al, *Regen. Med. Appl. Organ Transpl.* **2014**, 55, 771-782.
5. Wang F et al, *Materials Science and Engineering C* **2015**, 52, 155-162.
6. Gautam S et al, *Materials Science and Engineering: C* **2014**, 34, 402-409.
7. Park JB, Bronzino JD "Biomaterials. Principles and applications" *CRC Press* **2002**, 250.
8. Layland KS, Nerem RM, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2011**, 63, 195-196.
9. Nectow AR, Marra KG, Kaplan LD, *Tissue Eng Part B Reviews* **2012**, 18(1), 40-50.
10. Stanizzi A et al *JPRAS Open* **2021**, 28, 56-60.
11. Headon H et al., *Surgical Oncology* **2016**, 25, 104-110.
12. Breuing KH, Warren SM *Annals of Plastic Surg.* **2005**, 55(3), 232-239.
13. <http://emedicine.medscape.com/article/1851090-overview#a1>, accessed 15/03/2022.



REVENDICARI

1. Procedeele de obtinere a matricei acelulara dermica din piele de sturion, definite in revendicarea 1, **caracterizate prin aceea ca**, pielea de sturion de decarneza, degreseaza, se taie in bucati de 5x5 cm si se supune tratamentului acid la un pH – 2.5-3.0 cu acid acetic, tartric, citric sau lactic. In urma tratamentului acid se separa straturile pielii si se izoleaza mecanic stratul dermic. Acesta este decelularizat cu o solutie slab alcalina de NaOH si se spala si se supune dializei pana ajunge la un pH fiziologic de 7.2 – 7.4. Stratul dermic este apoi supus unor cicluri de reticulare prin inghetare-dezghetare (3 cicluri), urmat de liofilizare. Se obtine matricea acelulara dermica din piele de sturion.

