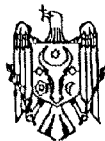




MD 1171 Y 2017.07.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **1171** (13) **Y**
(51) Int.Cl: *C12N 5/071* (2016.01)
A61K 35/407 (2006.01)

(12) **BREVET DE INVENȚIE
DE SCURTĂ DURATĂ**

În termen de 6 luni de la data publicării mențiunii privind hotărârea de acordare a brevetului de invenție de scurtă durată, orice persoană poate face opoziție la acordarea brevetului	
(21) Nr. depozit: s 2016 0156 (22) Data depozit: 2016.12.23	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2017.07.31, BOPI nr. 7/2017
(71) Solicitant: UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "NICOLAE TESTEMIȚANU" DIN REPUBLICA MOLDOVA, MD (72) Inventatori: JIAN Mariana, MD; NACU Viorel, MD; COBZAC Vitalie, MD; PALADI Constantin, MD; PANTEA Valeriana, MD (73) Titular: UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "NICOLAE TESTEMIȚANU" DIN REPUBLICA MOLDOVA, MD (74) Mandatar autorizat: COȘNEANU Elena	

(54) **Metodă de prelucrare a matricei decelularizate a ficatului pentru sporirea adeziunii celulare**

(57) **Rezumat:**

1
Invenția se referă la medicina regenerativă și ingineria tisulară și poate fi utilizată pentru prelucrarea matricei decelularizate a ficatului pentru sporirea adeziunii celulare.

Esența invenției constă în aceea că se spală matricea decelularizată a ficatului prin injectarea în vena portă a unui amestec de soluție tampon fosfat salin, streptomicină 100 µg/ml, penicilină 100 U/ml și amfotericină B 0,25 µg/ml, în cantitate de 20 ml/10 g de ficat

2
dcelularizat, apoi se injectează soluție de collagen tip I, obținut din tendonul Achile de bovină în concentrație de 0,01%, dizolvat în 0,1M de acid acetic, în cantitate de 160...240 ml/10 g de ficat decelularizat, după care matricea hepatică se perfuzează cu soluție tampon fosfat salin cu un pH 7,4 în cantitate de 300 ml/10 g de ficat cu o viteză de 5 ml/min.

Revendicări: 1

MD 1171 Y 2017.07.31

(54) Method for treating the decellularized liver matrix to enhance cell adhesion

(57) Abstract:

1
The invention relates to regenerative medicine and tissue engineering and can be used for treating the decellularized liver matrix to enhance cell adhesion.

Summary of the invention consists in that is washed the decellularized liver matrix by injecting into the portal vein a mixture of phosphate buffered saline, streptomycin 100 µg/ml, penicillin, 100 U/ml and amphotericin B 0.25 µg/ml, in an amount of 20 ml/10 g of

2
decellularized liver, then is injected a solution of type I collagen, obtained from bovine Achilles tendon in a concentration of 0.01%, dissolved in acetic acid 0.1 M, in an amount of 160...240 ml/10 g of decellularized liver, after which the hepatic matrix is perfused with phosphate buffered saline with a pH 7.4 in an amount of 300 ml/10 g of liver at a rate of 5 ml/min.

Claims: 1

(54) Метод обработки внеклеточного матрикса печени для повышения клеточной адгезии

(57) Реферат:

1
Изобретение относится к регенеративной медицине и тканевой инженерии и может быть использовано для обработки внеклеточного матрикса печени для повышения клеточной адгезии.

Сущность изобретения состоит в том, что промывают внеклеточный матрикс печени путем инъекции в воротную вену смеси, состоящей из фосфатно-солевого буферного раствора, стрептомицина 100 мкг/мл, пенициллина, 100 ед./мл и амфотерицина В 0,25 мкг/мл, в количестве

2
20 мл/10 г внеклеточной печени, затем вводят раствор коллагена 1-го типа, полученный из бычьего ахиллова сухожилия в концентрации 0,01%, растворенный в 0,1 М уксусной кислоты, в количестве 160...240 мл/10 г внеклеточной печени, после чего печеночный матрикс перфузируют фосфатно-солевым буферным раствором с pH 7,4 в количестве 300 мл/10 г печени со скоростью 5 мл/мин.

П. формулы: 1

Descriere:

5 Invenția se referă la medicina regenerativă și ingineria tisulară și poate fi utilizată pentru prelucrarea matricei decelularizate a ficatului pentru sporirea adeziunii celulare.

10 Cu aceeași destinație, în condiții de laborator matricea decelularizată a unui lob al ficatului este recelularizată cu câte $1,5 \times 10^7$ hepatocite la fiecare 10 min până se ajunge la 2×10^8 celule [1]. În timpul procesului de recelularizare nu se utilizează suplimentar nici o substanță pentru mărirea aderenței celulelor la matricea extracelulară a ficatului decelularizat.

Dezavantajul constă în aceea că în timpul procesului de recelularizare are loc pierderea excesivă de hepatocite din cauza adeziunii insuficiente a hepatocitelor injectate de matricea hepatică decelularizată.

15 Problema pe care o rezolvă invenția constă în utilizarea unei metode noi, ce ar permite amplificarea adeziunii hepatocitelor de matricea decelularizată a ficatului și ar împiedica pierderea lor excesivă după injectare.

20 Esența invenției constă în aceea că se spală matricea decelularizată a ficatului prin injectarea în vena portă a unui amestec de soluție tampon fosfat salin, streptomicină 100 $\mu\text{g/ml}$, penicilină 100 U/ml și amfotericină B 0,25 $\mu\text{g/ml}$, în cantitate de 20 ml/10 g de ficat decelularizat, apoi se injectează soluție de collagen tip I, obținut din tendonul Achile de bovină în concentrație de 0,01%, dizolvat în 0,1M de acid acetic, în cantitate de 160...240 ml/10 g de ficat decelularizat, după care matricea hepatică se perfuzează cu soluție tampon fosfat salin cu un pH 7,4 în

25 cantitate de 300 ml/10 g de ficat cu o viteză de 5 ml/min.

Avantajele metodei revendicate constau în aceea că este simplă, economă și eficientă. Metoda propusă ameliorează și majorează viteza procesului de recelularizare a ficatului prin sporirea adeziunii matricei extracelulare hepatice.

30 Rezultatul constă în aceea că respectiva metodă – eficientă, sigură, economă și ușor de implementat, permite o adeziune mai rapidă, evitându-se pierderi excesive de hepatocite injectate în matricea hepatică decelularizată în timpul procesului de recelularizare.

35 În scopul creșterii adeziunii hepatocitelor de matricea extracelulară a ficatului decelularizat și evitării pierderii lor excesive, s-a utilizat soluție de collagen tip I obținut din tendon Achile de bovină cu o concentrație de 0,01% dizolvat în 0,1 M de acid acetic, care se injectează foarte încet în matricea hepatică decelularizată prin vena portă.

40 Modalitatea de creștere a adeziunii hepatocitelor de matricea extracelulară a ficatului decelularizat constă în injectarea soluției collagen tip I obținut din tendon Achile de bovină, cu concentrația de 0,01% dizolvat în 0,1 M de acid acetic, după o spălare prealabilă cu soluție PBS și un compus antibiotic-antimicotic (streptomicină 100 $\mu\text{g/ml}$, penicilină 100 U/ml, amfotericină B 0,25 $\mu\text{g/ml}$). Cantitatea de soluție de collagen injectată este direct proporțională cu masa ficatului. La 10 g de masă umedă de ficat se utilizează 200 ml $\pm$ 40 ml de soluție de collagen, acesta se injectează foarte

45 lent pentru a permite atașarea fibrelor de collagen de matricea hepatică decelularizată evitând formarea conglomeratelor și obturarea vaselor intrahepatice. Pentru a verifica dacă vasele matricei decelularizate nu sunt obturate de fibrele de collagen și a aduce pH-ul la unul normal de 7,2...7,4 pentru a asigura viabilitatea celulelor, matricea hepatică se perfuzează cu PBS în volum de 300 ml/10 g ficat decelularizat,

50 cu o viteză de 5 ml/min și un pH egal cu 7,4. Totodată se urmărește umplerea și extravazarea uniformă a lichidului din matricea hepatică decelularizată.

Exemplu

Prin vena portă matricea extracelulară a 10 g de ficat decelularizat se spală cu 20 ml soluție PBS și antibiotic antimicotic. Apoi cu viteza de 1 ml/min se injectează

55 200 ml de soluție de collagen tip I de 0,01%, obținut din tendon Achile de bovină dizolvat în acid acetic de 0,1 M. Ulterior, matricea decelularizată se spală cu o viteză de 5 ml/min cu 300 ml soluție PBS cu pH-ul de 7,4.

Metoda corespunde cerințelor și normelor sanitare, necesită utilizarea soluției de colagen de 0,01% și a matricei hepatice decelularizate și se efectuează în condiții sterile.

- 5 Această metodă se utilizează pentru mărirea adeziunii hepatocitelor în timpul recelularizării ficatului decelularizat în cadrul Laboratorului de Inginerie Tisulară și Culturi Celulare.

(56) Referințe bibliografice citate în descriere:

1. 1. Uygun B., Price G., Saedi N., Izamis M., Berendsen T., Yarmush M., Uygun K. Decellularization and Recellularization of Whole Livers. JoVE, 48, 2011. <http://www.jove.com/details.php?id=2394>

(57) Revendicări:

Metodă de prelucrare a matricei decelularizate a ficatului pentru sporirea adeziunii celulare, care constă în aceea că se spală matricea decelularizată a ficatului prin injectarea în vena portă a unui amestec de soluție tampon fosfat salin, streptomicină 100 µg/ml, penicilină 100 U/ml și amfotericină B 0,25 µg/ml, în cantitate de 20 ml/10 g de ficat decelularizat, apoi se injectează soluție de colagen tip I, obținut din tendonul Achile de bovină în concentrație de 0,01%, dizolvat în 0,1M de acid acetic, în cantitate de 160...240 ml/10 g de ficat decelularizat, după care matricea hepatică se perfuzează cu soluție tampon fosfat salin cu un pH 7,4 în cantitate de 300 ml/10 g de ficat cu o viteză de 5 ml/min.

Şef Secție Examinare:

LEVIȚCHI Svetlana

Examinator:

GROSU Petru

Redactor:

LOZOVANU Maria

RAPORT DE DOCUMENTARE

I. Datele de identificare a cererii

(21) Nr. depozit: s 2016 0156

(22) Data depozit: 2016.12.23

(71) Solicitant: **UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "NICOLAE TESTEMIȚANU" DIN REPUBLICA MOLDOVA, MD**

(54) **Titlul: Metodă de prelucrare a matriței decelularizate a ficatului pentru spirirea adeziunii celulare**

II. Clasificarea obiectului invenției:

(51) **Int.Cl: C12N 5/071 (2016.01)**
A61K 35/407 (2006.01)

III. Colecții și Baze de date de brevete cercetate (denumirea, termeni caracteristici, ecuații de căutare reprezentative)

MD - Intern « Documentare Invenții » (inclusiv cereri nepublicate; trunchiere automată stanga/dreapta): **Int.Cl: C12N 5/071 (2016.01)**
A61K 35/407 (2006.01)

hepatocite, adeziunea hepatocitelor, recelularizare hepatică

EA, CIS (Eapatis): Int.Cl: C12N 5/071 (2016.01)
A61K 35/407 (2006.01)

гепатоциты, адгезия гепатоцитов, печеночная рецелюляризация

SU (nonpublic): Int.Cl: C12N 5/071 (2016.01)
A61K 35/407 (2006.01)

гепатоциты, адгезия гепатоцитов, печеночная рецелюляризация

IV. Baze de date și colecții de literatură nonbrevet cercetate

V. Documente considerate a fi relevante

Categoria*	Date de identificare ale documentelor citate si, unde este cazul, indicarea pasajelor pertinente	Numărul revendicării vizate
A	MD 1015 Y 2016.03.31	1
A	SU1578192 (A1) 1990-07-15	1
A	SU1513390 (A1) 1989-10-07	1
A	SU1463757 (A1) 1989-03-07	1

A	SU1673969 (A1) 1991-08-30	1
A	SU1564550 (A1) 1990-05-15	1
A	SU1310426 (A1) 1987-05-15	1
A	SU1289437 (A1) 1987-02-15	1
A	SU1053803 (A1) 1983-11-15	1
A	SU952958 (A1) 1982-08-23	1

*** categoriile speciale ale documentelor citate:**

A – document care definește stadiul anterior general	T – document publicat după data depozitului sau a priorității invocate, care nu aparține stadiului pertinent al tehnicii, dar care este citat pentru a pune în evidența principiul sau teoria pe care se bazează invenția
X – document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată nouă sau implicând activitate inventivă când documentul este luat în considerație de unul singur	E – document anterior dar publicat la data depozit național reglementar sau după aceasta dată
Y – document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată ca implicând activitate inventivă când documentul este asociat cu unul sau mai multe documente de aceeași categorie	D – document menționat în descrierea cererii de brevet
O - document referitor la o divulgare orală, un act de folosire, la o expoziție sau la orice alte mijloace de divulgare	C – document considerat ca cea mai apropiată soluție
	& – document, care face parte din aceeași familie de brevete
P - document publicat înainte de data de depozit, dar după data priorității invocate	L – document citat cu alte scopuri

Data finalizării documentării 2017.05.12

Examinator GROSU Petru