



BREVET DE INVENTIE

(12)

Hotărârea de acordare a brevetului de invenție poate fi revocată
în termen de 6 luni de la data publicării

(21) Nr. cerere: **94-00515**

(22) Data de depozit: **29.03.94**

(30) Prioritate:

(41) Data publicării cererii:
30.10.95 BOPI nr. 10/95

(42) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului:
30.04.96 BOPI nr. 4/96

(45) Data eliberării și eliberării și publicării brevetului:
BOPI nr.

(61) Perfecționare la brevet:
Nr.

(62) Divizată din cererea:
Nr.

(86) Cerere internațională PCT:
Nr.

(87) Publicare internațională:
Nr.

(56) Documente din stadiul tehnicii:
RO 95354; 95355

(71) Solicitant: **Institutul de Biologia Dezvoltării, București, RO**

(73) Titular: **(71)**

(72) Inventatori: **Moldovan Lucia, Oancea Anca - Olguța, Caloianu Maria, Bobe Gheorghe, RO**

Mandatar:

(54) Biopreparat peliculogen, cu efect protector și cicatrizant și procedeu de obținere

(57) Rezumat: Prezenta invenție se referă la un biopreparat peliculogen, cu efect protector și cicatrizant și la procedeul de obținere a acestuia. Biopreparatul peliculogen este constituit din 0,8 ... 1,6 părți în greutate de soluție 0,3 ... 0,6 % de collagen, cu greutatea moleculară medie 280000 ... 350000 și puritatea de 80 ... 95 %, 0,2 ... 0,5 părți în greutate soluție 0,1 ... 0,3 % de glicozaminoglicani, cu greutatea moleculară medie 15000 ... 25000 și conținut în hexozamine de 20 ... 35 % și 0,002 ... 0,010 părți în greutate glicerină și este condiționat sub formă de pelicule sterile. Procedeul de obținere a preparatului peliculogen constă în aceea că 1 - 2 părți în greutate, cornee bovină, se supun extracției cu 3 ... 6 părți NaOH 0,5 M timp de 20 ... 30 h, la 4°C, după care se separă, prin centrifugare și soluția obținută se amestecă cu 0,03 ... 0,1 părți celiță și se lasă în repaus 24 h, la 4°C, se centrifughează, iar

supernatantul obținut se aduce la pH-ul fiziologic și se precipită cu 2 ... 3 volume etanol, ce conține acetat de sodiu 0,5 %, precipitatul obținut se usucă cu etanol absolut, rezultând glicozaminoglicani, sub formă de pulbere, în continuare, țesutul rămas după prima centrifugare este folosit pentru extracția collagenului, prin tratare cu 1 ... 3 părți acid acetic 0,5 M conținând pepsină 1 mg/ml, timp de 20 ... 28 h, la 4°C, se centrifughează, iar soluția obținută se precipită cu NaCl 0,7 M, se lasă în repaus 24 h, la rece, precipitatul astfel obținut se dizolvă în tampon fosfat salin pH=7,4 și se dializează față de același tampon, obținându-se o soluție de collagen, cu un conținut de substanță uscată de 0,7 ... 1,2 % care se amestecă cu soluția de glicozaminoglicani obținută mai sus și cu glicerină.

Revendicări: 2

RO 110780 B



Prezenta invenție se referă la un biopreparat peliculogen, cu efect protector cicatrizant, precum și la

procedeul de obținere al acestuia.
Corneea constituie, alături de sclerotică, tunica rezistentă mecanic a globului ocular. Transparența corneei este dată de organizarea ultrastructurală fină și compoziția biochimică unică a componentelor sale extracelulare - collagen și glicozaminoglicani. Spre deosebire de celelalte țesuturi conjunctive, în corneea cele două componente macromoleculare sunt asociate într-un mod de organizare superior: fibrilele de collagen au diametrul uniform și mic, iar glicozaminoglicanii sunt localizați specific, în spațiile dintre aceste fibrile.

Este cunoscută o compoziție pe bază de collagen pentru membrane medicinale, utilizată în oftalmologie, constituită din 100 - 125 părți soluție 1 - 2 % collagen cu greutate moleculară 250000 - 300000; 100 - 125 părți hidrogel de alcool polivinilic 0,2 - 0,8 %, obținut din pulbere de alcool polivinilic și alcool etilic în raport în greutate de 5:1, dizolvate complet în apă și 0,2 - 0,8 părți glicerină, părțile fiind exprimate în greutate, compoziția având un pH de 6,5 - 7, precum și un procedeu de obținere a membranelor collagenice prin reticularea cu dispersii sau soluții coloidale de collagen cu concentrație 0,5 - 1 % și pH-ul 2,5 - 6,5 cu agenți tananți aleși dintre aldehida formică, aldehida glutarică sau trimetilolmelamină în concentrație de 0,001 - 0,5 % și plastifiați cu glicerină în proporție de 0,2 - 1 %, adăugarea în produsul obținut de substanțe medicamentoase în proporție de până la 4 %, în funcție de scopul terapeutic urmărit și supunerea amestecului obținut operației de uscare sub formă de peliculă, la temperatură sub 37°C.

Prezenta invenție se referă la obținerea unui biopreparat peliculogen cu efect protector și cicatrizant al țesutului cornean, prin asocierea optimă a principalelor componente extracelulare ale corneei: collagen și glicozaminoglicani.

Biopreparatul peliculogen, con-

form invenției, este constituit din 0,8 ... 1,6 părți în greutate de soluție 0,3 ... 0,6 % de collagen cu greutatea moleculară medie 280000 ... 350000 și puritatea de 80 ... 95 %, 0,2 ... 0,5 părți în greutate soluție 0,1 ... 0,3 % de glicozaminoglicani cu greutatea moleculară medie 15000 ... 25000 și conținut în hexozamine de 20 ... 35 % și 0,002 ... 0,010 părți în greutate glicerină și este condiționat sub formă de pelicule sterile.

Procedeul de obținere al preparatului peliculogen constă în aceea că 1 - 2 părți în greutate corneea bovină se supun extracției cu 3 - 6 părți NaOH 0,5 M, timp de 20 - 30 h la 4°C, după care se separă prin centrifugare și soluția obținută se amestecă cu 0,03 - 0,1 părți celită și se lasă în repaus 24 h la 4°C, se centrifughează, iar supernatantul obținut se aduce la pH-ul fiziologic și se precipită cu 2 - 3 volume etanol ce conține acetat de sodiu 0,5 %, precipitatul obținut se usucă cu etanol absolut, rezultând glicozaminoglicani sub formă de pulbere, în continuare țesutul rămas după prima centrifugare este folosit pentru extracția collagenului prin tratare cu 1 - 3 părți acid acetic 0,5 M conținând pepsină 1 mg/ml, timp de 20 - 28 h la 4°C, se centrifughează, iar soluția obținută se precipită cu NaCl 0,7 M, se lasă în repaus 24 h la rece, precipitatul astfel obținut se dizolvă cu tampon fosfat salin pH 7,4 și se dializează față de același tampon, obținându-se o soluție de collagen cu un conținut de substanță uscată de 0,7 - 1,2 %, care se amestecă cu soluția de glicozaminoglicani obținută mai sus și cu glicerină.

Invenția prezintă următoarele avantaje:

- se obține printr-un procedeu relativ simplu, din materii prime indigene;
- este biocompatibil și bine tolerat de mucoasa globului ocular;
- asigură hidratarea uniformă a ochiului, precum și regenerarea leziunilor țesutului cornean;
- crează un cadru matriceal asemănător celui natural, având rol protec-

tor și terapeutic.

Se dau, în continuare, 2 exemple de realizare a invenției

Exemplul 1. Se ia o cantitate de 500 g corneei bovine ce s-au obținut prin disecție din ochi proveniți de la animale adulte și se curăță de țesuturile aderente. Se spală cu apă rece și se mărunțesc mecanic în bucăți de 1 - 3 mm. Țesutul mărunțit se suspendă de 2 - 3 ori în tampon fosfat salin pH 7,4 la temperatura de 4°C. Pentru extracția glicozaminoglicanilor corneeni se tratează țesutul cu 2000 ml soluție NaOH 0,5 M și se lasă la rece timp de 24 h. Prin centrifugare la 3000 rot/min timp de 30 min, se separă soluția care conține glicozaminoglicanii de țesut rămas, ce conține collagen. Peste soluția astfel obținută se adaugă, pentru clarificare, 15 g celită și se lasă la rece timp de 24 h. Se îndepărtează apoi impuritățile prin centrifugare la 4000 rot/min timp de 30 min, iar soluția limpede obținută se aduce la pH neutru. Purificarea glicozaminoglicanilor din această soluție se face prin adăugare de 2,5 volume alcool etilic, în care s-a dizolvat, în prealabil, 0,5 % acetat de sodiu. Uscarea precipitatului se realizează cu etanol absolut. Se obține astfel o pulbere alb-gălbui de glicozaminoglicani solubilă în apă, având următoarele caracteristici: hexozamine 28 %, acizi uronici 11 %, hexoze neutre 10 %, azot total 3 %, sulf 2 %, greutate moleculară medie 22000. Țesutul rămas după extracția glicozaminoglicanilor este folosit pentru extracția collagenului utilizând pepsină în mediu de acid acetic. Peste acest țesut se adaugă 1500 ml acid acetic 0,5 M în care s-a dizolvat pepsină în concentrație de 1 mg/ml lăsându-se 24 h sub agitare la 4°C, urmată de centrifugare la 3000 rot/min timp de 30 min. Supernatantul obținut este precipitat cu NaCl 0,7 M și se lasă în repaus peste noapte la rece pentru stabilizare. Separarea precipitatului de collagen din această soluție se realizează prin centrifugare la 4000 rot/min timp de 40 min; precipitatul obținut se dizolvă în tampon fosfat salin pH= 7,4 și se dializează, față

de același solvent, până la îndepărtarea totală a clorurii de sodiu. Se obține astfel o soluție de collagen de concentrație 0,9 % substanță uscată de puritate 92 % și greutate moleculară medie 320000.

Pentru obținerea amestecului celor două componente extrase și purificate ca mai sus, se prepară o soluție de collagen 0,6 % și alta de glicozaminoglicani de concentrație 0,2 %. Peste 400 g soluție de collagen 0,6 % se adaugă, sub agitare, 300 g soluție de glicozaminoglicani 0,2 % și 1,5 g glicerină. Amestecul obținut se toarnă în tăvițe de sticlă pe care s-au fixat folii de polietilenă și se usucă sub formă de pelicule la temperatura de 30°C, folosind un uscător prevăzut cu ventilație. Pelicula obținută se ambalează în folii de plastic, se închide etanș și se sterilizează cu radiații gamma.

Exemplul 2. Soluția de collagen și cea de glicozaminoglicani se prepară ca cea din exemplul 1. Se iau 300 ml soluție de collagen 0,9 %, se diluează la 600 ml cu tampon fosfat salin pH 7,4. Peste această soluție se adaugă, sub agitare continuă, 100 ml soluție glicozaminoglicani 0,2 % și 1,2 g glicerină. Amestecul obținut se condiționează sub formă de pelicule ca în exemplul 1.

Peliculele obținute, conform exemplurilor de mai sus, au fost testate, din punct de vedere al biocompatibilității, pe culturi de fibroblaste de găină în mediu Eagle și ser fetal bovin. La examinarea microscopică s-a observat că fibroblastele cultivate pe aceste pelicule au penetrat în substrat și au proliferat, ceea ce demonstrează că pelicula favorizează creșterea celulară.

Pelicula se prezintă sub formă de folie transparentă, flexibilă, cu o grosime uniformă cuprinsă între 0,1 și 0,5 mm. Se aplică pe rănile oculare, asigurând refacerea țesutului lezat prin resorbția ei parțială sau totală. Substanțele încorporate - collagen și glicozaminoglicani, sunt cedate țesutului lezat în mod lent și în cantitate eficientă. De asemenea, ele asigură o bună permeabilitate a oxigenului și permit creșterea difuziei

acestui în caz de necesitate, precum și o hidratare uniformă a țesutului cornean.

Biopreparatul pelculogen, conform invenției, se utilizează ca pansament oftalmic prin aplicare pe mucoasa globului ocular. Are rol protector și de lubrefiant al ochiului și de cicatrizare și regenerare a leziunilor corneene. Aceste efecte sunt rezultatul asocierii proprietăților de cicatrizare și regenerare a collagenului cu cele antioxidante și osmotice ale glicozaminoglicanilor.

Revendicări

1. Biopreparat pelculogen, cu efect protector și cicatrizant pe bază de collagen și glicerină, **caracterizat prin aceea că**, este constituit din 0,8 - 1,6 părți în greutate de soluție 0,3 - 0,6 % de collagen cu greutatea moleculară medie 280000 - 350000 și puritatea de 80 - 95 %, 0,2 - 0,5 părți în greutate soluție 0,1 - 0,3 % de glicozaminoglicani cu greutatea moleculară medie 15000 - 25000 și conținut în hexozamine de 20 - 35 % și 0,002 - 0,010 părți în greutate glicerină, condiționat sub formă de pelicule sterile.

5

10

15

20

25

30

2. Procedeu de obținere al preparatului pelculogen, **caracterizat prin aceea că**, 1 - 2 părți în greutate corneei bovine se supun extracției cu 3 - 6 părți NaOH 0,5 M timp de 20 - 30 h la 4°C, după care se separă prin centrifugare și soluția obținută se amestecă cu 0,03 - 0,1 părți celită și se lasă în repaus 24 h la 4°C, se centrifughează, iar supernatantul se aduce la pH-ul fiziologic și se precipită cu 2 - 3 volume etanol ce conține acetat de sodiu 0,5 %, precipitatul obținut se usucă cu etanol absolut, rezultând glicozaminoglicani sub formă de pulbere, în continuare țesutul rămas după prima centrifugare este folosit pentru extracția collagenului prin tratare cu 1 - 3 părți acid acetic 0,5 M conținând pepsină 1 mg/ml, timp de 20 - 28 h la 4°C, se centrifughează, iar soluția obținută se precipită cu NaCl 0,7 M, se lasă în repaus 24 h la rece, precipitatul astfel obținut se dizolvă cu tampon fosfat salin pH= 7,4 și se dializează față de același tampon, obținându-se o soluție de collagen cu un conținut de substanță uscată de 0,7 - 1,2 %, care se amestecă cu soluția de glicozaminoglicani obținută mai sus și cu glicerină.

Președintele comisiei de examinare: **farm. Pentelescu Elena**
Examinator: **farm. Anghel Doina**