



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) **DD** (11) **233 785 A1**

4(51) A 61 F 2/10

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) WP A 61 F / 276 137 8

(22) 05.11.84

(44) 12.03.86

(71) VEB Lederwerk „August Apfelbaum“, 2808 Neustadt-Glewe, PSF 3, DD

(72) Biedermann, Manfred, Dr. rer. nat. Dipl.-Chem.; Winkel, Eckart, Dipl.-Chem.; Golz, Karin, Dr. rer. nat. Dipl.-Chem.; Pachurka, Rita, DD

(54) **Verfahren zur Herstellung von Hämostyptika aus Tierhautkollagen**

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Hämostyptika aus Tierhautkollagen, vorzugsweise Schweinhautkollagen. Das Anwendungsgebiet der Erfindung befindet sich in der Pharmazeutika herstellenden Industrie. Ziel der Erfindung ist es, die Pharmazeutika herstellenden Betriebe mit einem Verfahren auszustatten, das es ihnen ermöglicht, aus Tierhautkollagen Hämostyptika für die Bereiche der Human- und Veterinärmedizin zu fertigen, die sich durch ausgezeichnete blutungsstillende Wirkung, hohes Wasser- und Serumaufnahmevermögen, rückstandsfreie Resorbierbarkeit, minimierte Antikörperbildung und ausreichende mechanische Festigkeit auszeichnen. Das Wesen der Erfindung besteht in einer auf größtmöglichen Erhalt der Nativität von Tierhautkollagen ausgerichteten Behandlung der Tierhäute. Dazu wird eine pneumatische Auflockerung des Kollagenfasergefüges vorgenommen. Die pneumatische Auflockerung geschieht durch chemische oder enzymatische Gasentwicklung im Innern des Coriums von Tierhäuten bzw. Einbringen von physiologisch unbedenklichen Gasen über Düsenbatterien in das Innere des Coriums von Tierhäuten. Zur Verhinderung unkontrollierbarer Mikroorganismen-tätigkeit wird mit Tierhautkollagen, Bakteriziden und Fungiziden behandelt. Das gereinigte Corium von Tierhäuten wird desantigenisiert.

Titel der Erfindung

Verfahren zur Herstellung von Hämostyptika aus Tierhautkollagen

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung ist dort anzuwenden, wo die Notwendigkeit besteht, Hämostyptika in Form von Kollagenvliesen herzustellen, vorzugsweise in Betrieben der pharmazeutischen Industrie, jedoch auch in Kombinat und Betrieben anderer Industriezweige, in denen in spezialisierten Werken, Betriebsteilen bzw. Abteilungen Pharmazeutika, insbesondere Kollagenvliese zur Verwendung als Hämostyptika gefertigt werden.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Nach Bekanntwerden der hervorragenden blutungsstillenden Eigenschaften von Kollagen bei Anwendung als lokale Hämostyptika (Hummel, K.; Halse, T.; Klin. Wochenschr. 30 (1952) 20, Köhnlein, H.E.; Mergard, U.E.; Chirurg 43 (1972) 378, Haußmann, P., Mergard, U.E.; Köhnlein, H.E.; Fortschr. Med. 92 (1974) 13) beinhalteten die Fertigungsverfahren zunächst die Herstellung von Kollagenpulvern nach dem Prinzip der Solubilation und Regenerierung durch intensive, langzeitige, alkalische und/oder saure bzw. enzymatische Behandlung von Kollagen aus tierischen Häuten, Sehnen, Hautteilen,

vorzugsweise aus Rindshäuten, durch anschließende mechanische Zerkleinerung, Dialyse, Gefrier- oder Lösungsmitteltrocknung (Battista, O.A.; Journ. of Applied Polymer Science 11 (1967) 481; Hait, M.R.; Battista, O.M.; Stark, R.B., Mc Card C.W.; Surg. Forum 14 (1969) 51; Hait, M.R.; Am J. Surg. 120 (1970) 330).

Der Nachteil dieser Verfahren besteht in der großen Intensität des Kollagenabbaues, die zu Erzeugnissen führt, die infolge ihrer Leichtheit von stärkeren Blutströmen fortgeschwemmt werden und für die Behandlung tieferer Wunden nicht geeignet sind.

Mit der Vertiefung der Kenntnisse über die Zusammenhänge bei der Blutgerinnung und über die Wirkung der Hämostyptika, insbesondere des Kollagens, die in einem wesentlichen Punkt darin bestehen, daß die Nativität des Kollagens in größtmöglichem Maße erhalten bleiben muß, (Wuppermann, T.; Hörmann, H.; Klin. Wochenschrift 52 (1974) 409) wurden die Verfahren schrittweise diesen Anforderungen angepaßt.

In DE AS 2730623 und DE OS 2943520 werden noch zeit- und materialintensive z. T. mehrwöchige Alkali-, Säure- und/oder Enzymbehandlungen unter Zusatz von Peroxiden, Emulgatoren, Antibiotika geschützt.

Diese Verfahren ermöglichen es, nach mechanischer Zerkleinerung des chemisch bzw. enzymatisch intensiv behandelten Kollagens und Lösungsmittel- oder Gefrier Trocknung Flächengebilde, beispielsweise Kollagenschwämme, zu fertigen, von allerdings losem Zusammenhalt. Der immer noch weitgehende Abbau des Kollagens vermittelt zwangsläufig dem Erzeugnis eine sehr hohe Solubilität in Wasser und physiologischer Kochsalzlösung sowie mechanische Instabilität, also negative Eigenschaften, denen durch Einbau von physiologisch unbedenklichen Weichmachern und Vernetzungsmitteln begegnet wird.

Verfahren, nach denen intakt gebliebenes kollagenes Material durch nachträgliches Gerben mechanisch stabilisiert wird, liefern für die Verwendung als Hämostyptikum ungeeignete Erzeugnisse (DE OS 1669531, DE OS 1929856, DE AS 1494740, DE OS 1616288), da die nichtkollagenen Anteile zu hoch sind

und damit der Verunreinigungsgrad zu groß ist.

Neuere Verfahren zeichnen sich folgerichtig dadurch aus, daß sie Kollagenerzeugnisse in großer Reinheit, möglichst unversehrter Nativität und ausreichender mechanischer Stabilität liefern, deren Anwendungsbreite durch Modifizierungen in Richtung Verklebbarkeit, Kohärenz, Resorbierbarkeit erhöht wird.

Die DE OS 2359949, DE OS 2706317, US PS 3742955, US PS 3810493 beschreiben die Säurebehandlung von frischem Kuhhaut-Corium mit 50 %iger bis 90 %iger Ab-sättigung des Säurebindungsvermögens des Kollagens durch ionisierbare Säure, vorzugsweise Salzsäure, die anschließende mechanische Zerfaserung, Aufschlammung in wasserarmen Äthanol oder anderen organischen Lösungsmitteln, Abschöpfung der Kollagenfasern in einer oder mehreren Schichten, gegebenenfalls Abpressen der Aufschlammflüssigkeit und Gefriertrocknung.

Die Verfahren berücksichtigen bereits die Erhaltung der Ursprünglichkeit der Kollagenstruktur und führen zu Erzeugnissen mit zufriedenstellender blutungsstillender Wirkung. Der Hauptmangel liegt darin, daß die erfindungsgemäßen Verfahrensschritte einen nur sehr losen Zusammenhalt der Kollagenvliese bewirken, der die Handhabung erschwert.

In DE OS 3037513 und DE OS 3212412 werden wasserunlösliche Kollagenvliese mit SH-Gruppenmodifizierten Biopolymeren, beispielsweise Fibrinogen, Gelatine, Oxyzellulose in Verbindung gebracht. Die SH-Gruppenmodifizierung der Biopolymere soll die hämostyptische Wirkung nicht beeinträchtigen und dem Kollagen-Biopolymer-Verbund Klebbarkeit vermitteln, die ein Fortschwemmen auch bei langanhaltenden, heftigen Blutungen verhindert.

Die breite Anwendbarkeit dieser Verfahren wird durch den Aufwand für die Herstellung der Ausgangsmaterialien zur SH-Gruppenmodifizierung eingeschränkt, die in DE OS 3037513 erfindungsgemäß mit N-Acetylhomocysteinsäurelacton und Silbernitrat in salzsaurer Lösung bei pH 2,5 und anschließender Behandlung mit Thioharnstoff durchgeführt wird.

In dem Bemühen, die Tripelhelixkonfiguration des Kollagens beizubehalten, wird in DE OS 3315678 natürliches wasserunlösliches Kollagen in Würfel der Kantenlänge kleiner 1 mm zerkleinert, in einprozentiger Säure suspendiert, mit Antibiotika versetzt und gefriergetrocknet. Die Kohärenz des Materials soll durch die bei der Gefrier Trocknung auftretende partielle kryogene Zerstörung gewährleistet werden, die assoziative und reaktive Zentren schafft.

Diese Art der Assoziation läßt allerdings keinen festen Zusammenhalt der porösen Kollagenfolie zu, so daß wiederum die bekannten Handhabungsprobleme auftreten.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist es, die Pharmazeutika herstellenden Betriebe mit einem Verfahren auszustatten, das es ihnen ermöglicht, aus Tierhautkollagen vorzugsweise aus Schweinhautkollagen Hämostyptika für die Bereiche der Human- und der Veterinärmedizin zu fertigen, die sich durch ausgezeichnete blutungsstillende Wirkung, hohes Wasser- und Serumaufnahmevermögen, rückstandsfreie Resorbierbarkeit, minimierte Antikörperbildung, ausreichende mechanische Festigkeit und leichte Handhabung auszeichnen.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Das Wesen der Erfindung besteht in einer auf größtmöglichen Erhalt der Nativität von Tierhautkollagen, vorzugsweise Schweinhautkollagen, ausgerichteten Behandlung der Tierhäute. Dazu wird nach einer alkalischen sulfidischen Haarzerstörung mit dem Mindesteinsatz an Sulfid- und Hydroxyl-Ionen und kürzestmöglicher Einwirkungszeit, Neutralisation der Alkalien mit sauren Salzen bzw. Säuren, mehrfach gründlichem Auswaschen der Überschusschemikalien und Reaktionsprodukte und mechanischen Abspalten des Unterhautbindegewebes als wesentlicher Verfahrensschritt erfindungsgemäß eine pneumatische Auflockerung des Kollagenfasergefüges vorgenommen. Die pneumatische Auflockerung des Kollagenfasergefüges erfolgt entweder dadurch, daß im Innern des gereinigten Coriums von Tierhäuten chemisch oder enzymatisch eine Gasentwicklung vorgenommen wird oder daß durch feine, in das Corium unterschiedlich tief hineinsteckende Düsen Gas unter Anlegen eines Überdruckes in das gereinigte Corium von Tierhäuten gedrückt wird. Bei den chemisch oder enzymatisch gebildeten bzw. von außen in das Corium gepreßten Gasen handelt es sich um chemisch reaktionsträge und physiologisch weitgehend inerte Gase, beispielsweise Stickstoff oder Kohlendioxid.

Die chemische Gasentwicklung im Innern des Tierhautkollagens erfolgt erfindungsgemäß dadurch, daß das Corium von Tierhäuten mit zur Gasbildung befähigten Salzen, beispielsweise Alkalikarbonaten, in möglichst hoher Konzentration über den gesamten Querschnitt durchtränkt wird und anschließend mit den die Gasentwicklung auslösenden Chemikalien, beispielsweise Salzsäure behandelt werden. Praktischerweise werden die im Beispiel angeführten mit Karbonationen durchtränkten Stücke des Tierhautcoriums in wäßrige Lösungen von überschüssiger Salzsäure überführt werden. ES sollte darauf geachtet werden, daß außer den gasförmigen Reaktionsprodukten physiologisch unbedenkliche chemische Verbindungen entstehen, beispielsweise Natriumchlorid.

Die enzymatische Gasentwicklung im Innern des Tierhautkollagens erfolgt erfindungsgemäß dadurch, daß das Tierhautcorium mit zur enzymatischen Gasentwicklung befähigten Substanzen, beispielsweise Hexosen wie D-Glucose, D-Fructose, D-Mannose aber auch löslichen Oligosacchariden bzw. Polysacchariden bzw. solche Substanzen enthaltenden technischen Produkten wie Sulfitlaugen, in hoher Konzentration über den gesamten Querschnitt durchtränkt und anschließend mit den die Gasentwicklung auslösenden Fermenten, beispielsweise mit einem Holozymase-Komplex behandelt wird. Der Holozymase-Komplex, bestehend aus Zymase, Kofermenten, Aktivatoren und Magnesium-Ionen wird entweder als Substanz in Lösung gebracht oder frisch durch Vermehrung der auf das verwendete Saccharid eingestellten Heferasse in der Reaktionslösung gebildet. In beiden Fällen ist praktischerweise das mit einem Saccharid in hoher Konzentration durchtränkte Tierhautkollagen in die Fermente enthaltende Flüssigkeit zu überführen.

Die Einbringung eines Gases beispielsweise Stickstoff von außen in das Corium von Tierhäuten erfolgt nach Möglichkeit über Düsenbatterien, deren Düsen unterschiedlich weit in das Corium hineinreichen. Nach entsprechender Positionierung des Coriums von Tierhäuten wird auf alle Düsen gleichzeitig ein Überdruck angelegt und damit die pneumatische Auflockerung des Kollagenfasergefüges bewirkt.

Die pneumatische Auflockerung des Kollagengefüges ist nicht an die Entfernung des Unterhautbindegewebes gebunden, sondern kann auch in vorhergehenden oder nachfolgenden Stadien der Kollagenbearbeitung erfolgen.

Um einem proteolytischen Abbau des Kollagens durch unkontrolliertes Wachstum von Mikroorganismen vorzubeugen, ist während der im neutralen, leicht sauren und leicht alkalisch sauren Medien stattfindenden Arbeitsschritte mit Zusätzen von physiologisch unbedenklichen Bakteriziden bzw. Fungiziden zu arbeiten, beispielsweise mit Phenolderivaten.

Die unter Umständen infolge der schonenden chemischen Behandlung des Tierhaut-Kollagens noch vorhandenen antigenen Proteine werden erfindungsgemäß durch eine Desantigenisierung, beispielsweise mit 20 %iger Wasserstoffperoxidlösung, aber auch mit anderen Peroxiden unmittelbar vor der mechanischen Zerkleinerung entfernt.

Weitere Verfahrensschritte, wie milde Alkaliquellen, Neutralisation mit Säure, Zerkleinerung, Vliesbildung, Gefriertrocknung, Verpackung und Strahlensterilisation erfolgen nach bekannten Verfahren.

Ausführungsbeispiel

Das Beispiel soll die Erfindung erläutern ohne sie einzuschränken.

Mechanisch entspeckte, salzkonservierte Schweinhäute werden einem milden Weichprozeß unterzogen. Nachfolgende Prozentangaben beziehen sich auf entspeckte Hautmasse. Dem ersten Weichwasser in einer Menge von 250 % werden 1 % bis 2,5 % Natriumkarbonat zugesetzt, Temperatur 36 °C, Weichdauer maximal 1 Stunde.

In das zweite Weichwasser in einer Menge von 250 %, das wie das erste Weichwasser Leitungs- oder Brunnenwasser sein kann, werden zur Eindämmung des Wachstums von Mikroorganismen Phenolderivate in einer Menge von 0,1 % zugegeben, Temperatur 36 °C, Weichdauer maximal 90 Minuten.

In einem weiteren Waschvorgang werden die Schweinhäute bei 36 °C in 50 % Wasser mit 0,1 % bis 3,0 %, vorzugsweise mit 0,5 % eines nichtionogenen Emulgators gewaschen, Dauer 1 Stunde.

In dem folgenden Bad werden die Schweinhäute bei 250 % Wassermenge und 36 °C bis 38 °C mit 1,0 % bis 1,8 % Natriumkarbonat und 0,2 % bis 0,4 % Natriumsulfid 3 bis 5 Stunden behandelt.

Nach der mechanischen Entfernung eines großen Teils des Borstenkleides von den Schweinhäuten werden sie 2 Stunden in einem Bad, das 10 bis 12 g Natriumsulfid pro Liter enthält, behandelt. Unter Zugabe von Wasser bis zu einer Menge von 200 % wird soviel Kalziumhydroxid zugebessert, daß eine gesättigte Lösung entsteht, Badtemperatur maximal 30 °C.

Die Behandlung in diesem Bad wird abgebrochen, wenn die vollständige Zerstörung der Schweinsborsten auch im Hautinnern erreicht ist.

Es wird mit Frischwasser gespült, bis der Ca^{2+} -Ionengehalt unter 0,6 g/l Spülwasser beträgt.

Eine zur Entfernung nichtkollagener Bestandteile unter Erhaltung der nativen Kollagensubstanz notwendige Behandlung mit einer gesättigten Kalziumhy-

droxidlösung erfolgt so kurz wie möglich, ca. 48 Stunden. Anschließend wird durch Zusatz von Ammoniumchlorid entkalkt, bis der Ca^{2+} -Ionengehalt der Spülflotte unter 1 g/l liegt.

Entwässerung durch Abquetschen der Schweinshäute zwischen Walzensystemen und das Spalten der abgequetschten Schweinshäute folgen. Zur Verwertung gelangen die Narbenspalte in einer Dicke von 1,5 bis 1,9 mm.

Von den Narbenspalten werden Brühränder und Hautpartien mit Narbenschäden entfernt.

Die Narbenspalte werden bei 36 °C mit einer 15 %igen Lösung von Natriumkarbonat vollständig durchtränkt. Durch Spalten von Schweinshautprobestücken in Schichten von etwa 0,2 mm Dicke und Nachweis von Karbonationen in der innersten Schicht ist die Vollständigkeit der Durchtränkung zu überprüfen. Die mit Natriumkarbonatlösung gleichmäßig durchtränkten Schweinshäute werden in ein Bad überführt, das 2 %ige Salzsäure im Überschuß enthält.

Der Verfahrensschritt ist beendet, wenn die durch die Kohlendioxidentwicklung aufgeblähten Schweinshäute über die gesamte Fläche erweicht sind.

Nach intensivem Waschen mit destilliertem Wasser werden die Schweinshäute in Stücke von ca. 10 cm x 10 cm zerkleinert und maximal 24 Stunden einer Behandlung mit Natronlauge 0,4 bis 0,8 n unterworfen.

Nach mehrfachem Waschen folgt eine 20-stündige Behandlung mit 0,2 n Salzsäure. Die Säure wird durch Waschen entfernt, bis das Waschwasser einen pH-Wert von 3,7 bis 4,2 aufweist. Die sich anschließende Desantigenisierung erfolgt mit frisch bereiteter 20 %iger Wasserstoffperoxidlösung bei 20 °C über 30 Minuten unter Bewegung.

Die Schweinshautstücken werden peroxidfrei gespült, mechanisch zerkleinert und in destilliertem Wasser suspendiert.

Eine Zugabe von Glycerin oder anderen mehrwertigen Alkoholen zur Erhöhung der Weichheit des Endproduktes ist möglich.

Nach einer Zwischenfrostung bei -40°C wird die Suspension in einer Kolloidmühle bei einer maximalen Endtemperatur von 20°C homogenisiert. Das Homogenisat wird einer Gefriertrocknung unterworfen. Die zur Trocknung vorgesehenen Schichtdicken betragen 5 bis 15 mm. Die Trocknungsgeschwindigkeit des Gefriertrocknungsverfahrens wird so gesteuert, daß das in der Suspension enthaltene Wasser nur so schnell sublimiert bzw. verdampft, wie es durch die vorhandenen Poren und Hohlräume an die Oberfläche gelangen kann. Die Temperatur der bei -40°C vorgefrorenen Schicht wird bei einem Systemdruck von 30 bis 3 Pa nur allmählich erhöht, wobei längere Zeit ein Bereich von -20°C bis $+5^{\circ}\text{C}$ gehalten wird. Mit wachsender Austrocknung kann später die Trocknungstemperatur gesteigert und/oder das angelegte Vakuum erhöht werden. Die Trocknung endet bei $+25^{\circ}\text{C}$ unter Normaldruck. Das erhaltene vliesartige Kollagen wird verpackt und strahlensterilisiert.

Das so gewonnene Kollagenpräparat wird durch folgende Eigenschaften charakterisiert:

Es besitzt eine gute hämostatische Wirkung, wird vom Organismus rückstandsfrei resorbiert und ruft keinerlei Unverträglichkeitserscheinungen hervor. Bei einer Flächenmasse von 70 bis 120 g/m^2 besitzt das Kollagenvlies eine hohe Weichheit und ein großes Wasser- und Serumaufnahmevermögen. Das kollagene Produkt besitzt einen hohen Reinheitsgrad, gekennzeichnet durch einen Gehalt an Natrium-Ionen von unter 0,2 %, einen Chlorid-Gehalt von kleiner 1,6 % und einen Faktor $\frac{\text{Hydroxyprolin}}{\text{Stickstoffgehalt}}$ von größer 0,8.

Erfindungsansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von Hämostyptika aus Tierhautkollagen, vorzugsweise Schweinhautkollagen, bei denen Tierhäute mit kollagenschonenden Methoden geweicht, entfettet, enthaart, von nichtkollagenen Bestandteilen chemisch gereinigt und mit mechanischen Mitteln auf die gewünschte Dicke gearbeitet wurden, gekennzeichnet dadurch, daß eine pneumatische Auflockerung des Kollagenfasergefüges vorgenommen wird.
2. Verfahren nach Punkt 1, gekennzeichnet dadurch, daß die pneumatische Auflockerung des Kollagenfasergefüges durch chemische Gasentwicklung innerhalb des gereinigten Coriums von Tierhäuten vorgenommen wird.
3. Verfahren nach Punkt 2, gekennzeichnet dadurch, daß zur chemischen Gasentwicklung das gereinigte Corium von Tierhäuten mit zur Gasentwicklung befähigten chemischen Verbindungen, beispielsweise Alkalikarbonaten, über den gesamten Querschnitt durchtränkt und anschließend mit den die Gasentwicklung auslösenden Chemikalien, beispielsweise Chlorwasserstoffsäurelösungen in Verbindung gebracht wird.
4. Verfahren nach Punkt 1, gekennzeichnet dadurch, daß die pneumatische Auflockerung des Kollagenfasergefüges durch enzymatische Gasentwicklung innerhalb des gereinigten Coriums von Tierhäuten vorgenommen wird.
5. Verfahren nach Punkt 4, gekennzeichnet dadurch, daß zur enzymatischen Gasentwicklung das gereinigte Corium von Tierhäuten mit zum fermentativen Abbau unter Gasentwicklung befähigten Substanzen, beispielsweise Hexosen, wie D-Glucose, D-Fructose, D-Mannose aber auch löslichen Oligo- und Polysacchariden bzw. solche Substanzen enthaltenden technischen Produkten, wie Sulfitablaugen, über den gesamten Querschnitt durchtränkt und anschließend mit den die Gasentwicklung auslösenden Enzymen, beispielsweise mit einem Holozymase-Komplex in Verbindung gebracht wird.

6. Verfahren nach Punkt 1, gekennzeichnet dadurch, daß die pneumatische Auflockerung des Kollagenfasergefüges durch Einbringen von chemisch reaktionsträgen, physiologisch inerten Gasen, beispielsweise Stickstoff, über eine Vielzahl von unterschiedlich weit in das gereinigte Corium von Tierhäuten hineinreichende Düsen, an die gleichzeitig Überdruck angelegt wird, vorgenommen wird.
7. Verfahren nach Punkt 1, gekennzeichnet dadurch, daß während der vor der pneumatischen Auflockerung des Kollagenfasergefüges im neutralen, schwach sauren bzw. schwach alkalischen Medium stattfindenden Verfahrensschritte mit Zusätzen von physiologisch unbedenklichen Bakteriziden bzw. Fungiziden unkontrollierbare Mikroorganismen-tätigkeit unterdrückt wird.
8. Verfahren nach Punkt 1, gekennzeichnet dadurch, daß das pneumatische aufgelockerte Kollagenfasergefüge mit Peroxiden, beispielsweise frisch bereiteter 20-prozentiger Wasserstoffperoxidlösung, desantigenisiert wird.